

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TERAPIA CELULAR EN EL  
TRATAMIENTO DE LA  
MIOCARDIOPATÍA DILATADA  
IDIOPÁTICA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

**Laura Cejudo Díaz del Campo**

Bajo la dirección de los doctores

José Suarez de Lezo Cruz-Conde  
Miguel Romero Moreno

**Córdoba, 2015**

TITULO: *Terapia celular en la miocardiopatía dilatada*

AUTOR: *Laura Cejudo Díaz del Campo*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2015  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**



**TESIS DOCTORAL**

**«TERAPIA CELULAR EN EL  
TRATAMIENTO DE LA  
MIOCARDIOPATÍA DILATADA  
IDIOPÁTICA»**

**Autora: Laura Cejudo Díaz del Campo  
Directores: José Suarez de Lezo Cruz-Conde  
Miguel Romero Moreno**

**Córdoba, 2015**





**TÍTULO DE LA TESIS: TERAPIA CELULAR EN EL TRATAMIENTO DE LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA IDIOPÁTICA**

**DOCTORANDO/A: LAURA CEJUDO DÍAZ DEL CAMPO**

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Don JOSÉ SUAREZ DE LEZO CRUZ-CONDE, Catedrático de Medicina de la Universidad de Córdoba y Don MIGUEL ROMERO MORENO, Profesor Asociado de Medicina de la Universidad de Córdoba

**CERTIFICAN**

Que Doña LAURA CEJUDO DÍAZ DEL CAMPO, Licenciada en Medicina por la Universidad de Córdoba, ha realizado bajo su dirección en el Hospital Universitario Reina Sofía el trabajo titulado "*Terapia Celular en el Tratamiento de la Miocardiopatía Dilatada Idiopática*", habiendo generado comunicaciones en congresos así como publicaciones en revistas de impacto.

El trabajo tiene calidad suficiente para ser defendido como tesis doctoral ante el tribunal correspondiente.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 20 de marzo de 2015

Firma del/de los director/es

Fdo.: José Suárez de Lezo

Fdo.: Miguel Romero



# Agradecimientos

---

Terminar una tesis de doctorado es la culminación de largo tiempo de trabajo, estudio y esfuerzo y esto sería muy difícil lograrlo si no es con el apoyo y el estímulo de muchas personas.

En primer lugar quisiera agradecer a los directores de esta tesis, Dr. Suárez de Lezo y Dr. Romero, no solo su supervisión y tutela durante la realización de la misma, sino también por los conocimientos transmitidos, que sin duda alguna han contribuido a mejorar mi formación.

A Amador López Granados, por estar siempre en el despacho al fondo del pasillo y ser un gran confidente. Por ser mi referencia y un ejemplo en el trato humano a los pacientes. A José María Arizón por ser “el padre” de todos nosotros. A Francisco Mazuelos, por seguir siendo nuestro eterno residente mayor; no cambies nunca.

Sería injusto olvidarme de todos aquellos que durante mi formación como médico interno residente en Cardiología, me han dado su tiempo, intentado transmitirme parte de su gran conocimiento, Dr. Anguita, Dr. Castillo, Dra. Mesa, Dra. Delgado, Dr. Romo, Dr. Ruiz, Dr. Pan, Dr. Segura, Dra. Ojeda, Dr. Suarez, Dr. Pavlovic y por supuesto, al Dr. Tejero. Gracias a todos, espero que nunca perdáis las ganas de formar nuevas generaciones.

A los celadores, auxiliares, administrativas y personal de enfermería del Servicio de Cardiología del Hospital Universitario Reina Sofía, por hacerme sentir durante este tiempo, que formo parte de una gran familia y contagiarme su alegría, ganas de trabajo y sobre todo transmitirme que el bienestar del paciente y sus familiares es el primer paso para el correcto tratamiento de la enfermedad.

A todos mis compañeros, tanto residentes mayores como los más pequeños, por todos los momentos que hemos pasado juntos, gracias a los cuales hemos formado siempre “una piña”.



A Elena Villanueva, mi compañera y amiga, el pilar en el que me he apoyado desde el principio, por su saber escuchar, sus sabios consejos y sus palabras de aliento, siempre desinteresadas, porque sin ella nada habría sido igual. GRACIAS por estar siempre a mi lado.

Además un agradecimiento y reconocimiento personal a mis padres, porque gracias a su incansable esfuerzo me han demostrado que es posible cambiar las cosas y que los sueños por muy difíciles que parezcan, se pueden hacer realidad.

Quiero agradecerle profundamente a Aarón su comprensión, su tolerancia e infinita paciencia, porque sin él esto no habría sido posible; por haberme cedido su tiempo para permitirme así llevar adelante un proyecto, que pasó de ser una meta personal a otro emprendimiento más de familia. GRACIAS por haber creído en mí desde el principio, hacérmelo saber todos los días y sobre todo, por seguir formando parte de este equipo.

# Glosario de Términos

---

Ao	Aorta
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARA-II	Antagonista de los receptores de la angiotensina-II
ARM	Antagonista del receptor mineralocorticoide
BAV	Bloqueo aurículo-ventricular
BB	Beta-bloqueantes
BCRIHH	Bloqueo completo de la rama izquierda del haz de his
BMC ó CMNMO	Células mononucleares de médula ósea
BNP	Péptido natriurético atrial
CD	Arteria coronaria derecha
CFR	Flujo de reserva coronaria
CFU-EC	Unidades formadoras de colonias de células endoteliales
CFU-GM	Unidades formadoras de colonias de granulocitos macrófagos
CK	Creatin-kinasa
CK-MB	Fracción MB de la creatín-kinasa
CINa	Cloruro sódico
CMN	Células mononucleares
CMNMO ó CMMO ó BMC	Células mononucleares de médula ósea
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Cr	Creatinina
Cx	Arteria circunfleja
DA	Arteria descendente anterior
DAI	Desfibrilador autoimplantable
DAVI	Dispositivo de asistencia ventricular izquierda
DS	Desviación estándar
ECO	Ecocardiograma
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FA	Fibrilación auricular
FC	Frecuencia cardiaca
FE	Fracción de eyección
FEVI	Fracción de eyección ventrículo izquierdo
F	French
FV	Fibrilación ventricular
G-CSF	Factor estimulante de colonias granulocíticas
HBAIHH	Hemibloqueo anterior izquierdo del haz de his
HDL ó c-HDL	Lipoproteína de alta densidad
HSC	Células madre hematopoyéticas
IAM	Infarto agudo de miocardio
IC	Insuficiencia cardiaca
IECA	Inhibidor de la enzima convertidor de angiotensina

IGF-1	Factor de crecimiento 1 insulina like
IM	Insuficiencia mitral
K+	Potasio sérico
LDL	Lipoproteína de baja densidad
lpm	Latidos por minuto
LV	Ventrículo izquierdo
MAPCs	Células progenitoras adultas multipotenciales
MCD	Miocardiopatía dilatada
MSC	Células madre mesenquimales o estromales
NYHA	New York Heart Association
ONT	Organización Nacional de Trasplantes
PTDVI	Presión telediastólica del ventrículo izquierdo
Post-PVC	Tras el latido postextrasistólico
PSP	Precursos endoteliales de sangre periférica cultivados
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RV	Ventrículo derecho
SCA	Segmentos de contracción anormal
SDF-1	Factor derivado de célula del estroma
SP	Side population cells
SPe	Células CD34+ de sangre periférica movilizadas por G-CSF
TRC	Terapia de resincronización cardiaca
TRC+DAI ó DAI+R	Terapia de resincronización cardiaca junto a desfibrilador autoimplantable
TV	Taquicardia ventricular
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VO2	Consumo máximo de oxígeno
VTD ó VTD-I ó VTDVI	Volumen telediastólico o volumen telediastólico índice o volumen telediastólico ventrículo izquierdo
VTS ó VTS-I ó VTSVI	Volumen telesistólico o volumen telesistólico índice o volumen telesistólico ventrículo izquierdo

# ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>1.- Introducción</b>	
1.1. Miocardiopatía dilatada: definición, pronóstico y tratamiento	17
1.1.1 Tratamiento farmacológico	20
1.1.2. Tratamiento no farmacológico	27
1.2. Bases de la medicina regenerativa	33
1.2.1 Características de las células madre	33
1.2.2 Clasificación según su potencialidad	35
1.2.3 Células madre derivadas de la médula ósea	38
1.2.4. Pluripotencialidad y células madre no derivadas de la médula ósea	44
1.2.5. Hipótesis sobre el mecanismo de actuación de las células madre	46
1.3 Experiencia con células madre derivadas de la médula ósea en la cardiopatía isquémica	50
1.3.1 Uso del factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) en el infarto agudo de miocardio	52
1.3.2 Infusión intracoronaria de células madre derivadas de médula ósea en el infarto agudo de miocardio	54
1.3.3 Tratamiento regenerativo en la cardiopatía isquémica crónica	57
1.3.4. Tratamiento regenerativo en la miocardiopatía dilatada idiopática	60

---

	<b>Página</b>
1.4 Perspectivas de futuro	62
1.4.1. Cardiopatía isquémica	62
1.4.2. Ingeniería de Tejidos. Corazón Bioartificial	65
1.4.3. Terapia celular en la población pediátrica	76

## **2.- Justificación y Objetivos**

2.1. Justificación	85
2.2.- Objetivos	89

## **3.- Material y Métodos**

3.1. Pacientes	93
3.2. Estudios clínicos	97
3.3. Estudios ecocardiográficos de la función ventricular	98
3.4. Cateterismo cardiaco diagnóstico y terapéutico	100
3.4.1 Estudio de la función ventricular izquierda mediante angiografía	101
3.4.2. Estudio vascular: medición de reserva coronaria	104
3.5. Obtención y preparación de células madre	105
3.6. Infusión intracoronaria de células madres	108
3.7. Estudio biológico	110
3.8. Estudio estadístico	112

---

---

	<b>Página</b>
<b>4.- Resultados</b>	
4.1. Hallazgos clínicos y de laboratorio	115
4.2. Hallazgos ecocardiográficos y ergoespirometría	122
4.3. Hallazgos angiográficos y hemodinámicos	126
4.4. Factores que influyen en la mejoría funcional	134
<b>5.- Discusión</b>	147
<b>6.- Conclusión</b>	161
<b>7.- Bibliografía</b>	165
<b>8.- Anexos</b>	
8.1.- Anexo 1.- Índice de tablas	189
8.2.- Anexo 2.- Índice de figuras	190

---



# **1. INTRODUCCIÓN**





## 1.- INTRODUCCIÓN

### 1.1 Miocardiopatía dilatada: definición, pronóstico y tratamiento

Las miocardiopatías idiopáticas se definen como enfermedades del músculo cardíaco caracterizadas por la alteración en el tamaño de las cámaras cardíacas, en el grosor de la pared ventricular o por una contracción anormal en ausencia de enfermedad coronaria, hipertensión arterial, enfermedad valvular o cardiopatía congénita que lo justifique<sup>1,2</sup>.

La miocardiopatía dilatada (MCD) afecta a personas de cualquier edad, incluso niños y neonatos. La prevalencia de la enfermedad en adultos se estima en 1:3000 individuos<sup>3,4</sup>, con una incidencia en torno al 0,5:10.000 personas/año<sup>3,4</sup>; es más frecuente hacia la mitad de la vida y afecta a los hombres con mayor frecuencia que a las mujeres.

En el 50% o más de los pacientes con MCD no se identifica la causa y se denomina MCD idiopática. Sus manifestaciones clínicas pueden ser muy variables y no se conoce bien por qué determinados pacientes presentan una disfunción ventricular izquierda asintomática, otros, síntomas que aparecen de forma progresiva y una minoría de ellos, una insuficiencia cardíaca congestiva grave (insuficiencia cardíaca fulminante) que puede precisar una intervención mecánica intensiva.

El pronóstico de la MCD dilatada y de la insuficiencia cardíaca ha mejorado de forma llamativa con la introducción de nuevos agentes farmacológicos, el desarrollo de la terapia de resincronización cardíaca y la implantación de desfibriladores. En la década de los 80 se publicaban series de pacientes adultos afectados de MCD idiopática avanzada sintomáticos, con

## Introducción

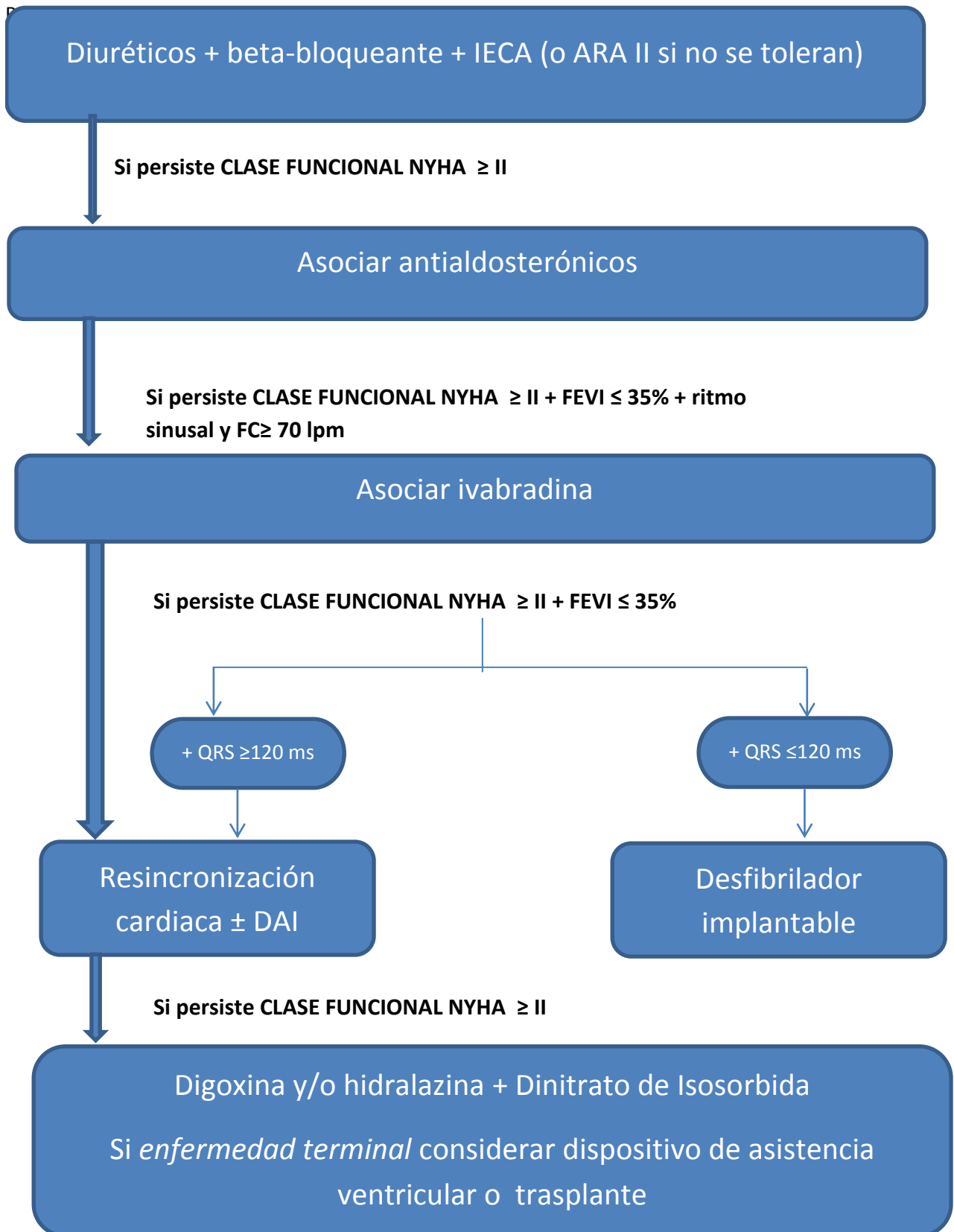
---

mortalidad del 25 al 50% a los 5 años<sup>1,4</sup>, reduciéndose al 20% en trabajos recientes; siendo la complicación más frecuente su evolución hacia la necesidad de trasplante cardíaco o en su defecto la muerte por fallo cardíaco en las 2/3 partes de los casos. Algo más de un tercio de los que fallecen lo hacen por muerte súbita.

Los objetivos del tratamiento en pacientes con insuficiencia cardíaca van orientados a aliviar sus síntomas, evitar el ingreso hospitalario y mejorar la supervivencia. Aunque anteriormente, el enfoque de los ensayos clínicos fue reducir la mortalidad, ahora se reconoce que la prevención de la hospitalización es importante. La reducción en las tasas de ingreso hospitalario y de mortalidad, reflejan la eficacia de los tratamientos para prevenir o retardar el progresivo empeoramiento de la insuficiencia cardíaca, que suele ir acompañado de la inversión del remodelado ventricular y una reducción de los niveles del péptido natriurético atrial.

La mayoría de los ensayos clínicos sobre la insuficiencia cardíaca (IC) se han dedicado al estudio de pacientes con disfunción sistólica y una fracción de eyección (FE) inferior al 35-40%. En la siguiente figura se presenta una estrategia de tratamiento para el uso de fármacos y dispositivos médicos en pacientes con disfunción sistólica e IC sintomática.

Figura 1.- Estrategia de tratamiento en pacientes con disfunción sistólica e insuficiencia cardiaca sintomática



### 1.1.1 Tratamiento farmacológico.

#### *- Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA)*

Se administrarán a todos los pacientes con IC sintomática y FE  $\leq$ 40%, excepto cuando no sea tolerado o esté contraindicado (angiedema, estenosis bilateral arterias renales, concentración de potasio sérico  $>$  5 mmol/l; creatinina sérica  $>$  2,5 mg/dl y estenosis aórtica grave), ya que mejora la función ventricular y el estado del paciente, reduce los ingresos hospitalarios por empeoramiento clínico y mejora la supervivencia<sup>5,6</sup>. En pacientes hospitalizados, se iniciará el tratamiento con IECA antes del alta<sup>7</sup>.

#### *- Bloqueadores beta*

Los principales estudios con beta-bloqueantes se llevaron a cabo en pacientes sintomáticos con disfunción ventricular, en tratamiento con IECA y en la mayoría de los casos, diuréticos. Debido a esto, existe consenso en que estos tratamientos son complementarios y que ambos deben iniciarse tan pronto como sea posible después del diagnóstico. Esto en parte es debido a que los IECA tienen un efecto modesto sobre la remodelación ventricular, mientras que los beta-bloqueantes a menudo conducen a una mejora sustancial de la función ventricular. Por otra parte, los beta-bloqueantes al tener efecto antiisquémico, son probablemente más eficaces para reducir el riesgo de muerte súbita y conducir a una reducción temprana y notable en la mortalidad general<sup>8</sup>.

El tratamiento betabloqueante ha supuesto un avance importante en el tratamiento de los pacientes con fracción de eyección reducida e insuficiencia cardiaca. Su uso está indicado en todos los pacientes con IC sintomática y una FE  $\leq 40\%$ , salvo cuando no se tolere o bien esté contraindicado (asma, bloqueo cardiaco de segundo o tercer grado, síndrome del seno enfermo en ausencia de marcapasos o bradicardia sinusal( $<50$  lpm)), ya que mejora la función ventricular y el bienestar del paciente, reducen el número de ingresos por empeoramiento clínico y aumentan la supervivencia, como fue demostrado en tres estudios importantes realizados con beta-bloqueantes, el CIBIS II, COPERNICUS y MERIT-HF<sup>9-13</sup>

Como en el uso de los IECA, los betabloqueantes deben comenzarse en dosis bajas seguidas de incrementos graduales si se han tolerado bien las dosis inferiores. Pero, al contrario que los IECA, que pueden aumentarse de forma relativamente rápida, la dosis de los betabloqueantes no debe aumentarse con una periodicidad inferior a las dos semanas porque su inicio o aumento de la dosis, puede empeorar la retención de líquidos. En términos generales, debe instaurarse el tratamiento en pacientes estables, dado que en aquellos ingresados por un empeoramiento de la IC, podría ser necesario reducir la dosis e incluso considerar la interrupción temporal del tratamiento en situaciones graves y tan pronto como lo permita el estado del paciente y preferiblemente antes del alta, se reiniciará a dosis bajas, aumentándolas progresivamente<sup>7</sup>. Sin embargo, en el estudio COPERNICUS se inició el tratamiento con bloqueadores beta en pacientes recientemente descompensados sin complicaciones<sup>11</sup>.

## Introducción

---

### *- Antagonistas de la aldosterona*

Aunque clasificados como diuréticos ahorradores de potasio, los fármacos que bloquean los efectos de la aldosterona, tienen efectos beneficiosos independientes de los efectos de estos fármacos sobre el equilibrio del sodio.

Se considerará la administración de antagonistas de la aldosterona a dosis bajas en todos los pacientes con una FE  $\leq 35\%$  e IC grave (GF III o IV de la NYHA), que ya están en tratamiento con dosis óptima de un beta bloqueante e IECA o ARA II, salvo intolerancia o contraindicación (potasio sérico  $>5$  mmol/l, Cr sérica  $>2,5$  mg/dl, tratamiento concomitante con diuréticos ahorradores de potasio o suplementos de potasio y tratamiento combinado de IECA y ARA)<sup>8</sup>, dado que mejoran la clase funcional del paciente, reducen los ingresos hospitalarios por empeoramiento de la IC y aumentan la supervivencia cuando se añaden al tratamiento prescrito previamente<sup>14,15</sup>.

### *- Antagonistas de los receptores de la angiotensina (ARA)*

Se recomienda la administración de un ARA como tratamiento alternativo en pacientes con intolerancia a los IECA, excepto cuando éste esté contraindicado o no sea tolerado<sup>16</sup>.

Aunque ambos inhiben el sistema renina-angiotensina, lo hacen mediante mecanismos distintos. Mientras que los IECA bloquean la enzima responsable de convertir la angiotensina I en angiotensina II, los ARA bloquean los efectos de la angiotensina II sobre el receptor de

la angiotensina tipo I. El tratamiento con un ARA mejora la función ventricular, los síntomas y la calidad de vida del paciente, reduce los ingresos por empeoramiento de la IC y disminuye el riesgo de muerte por causas cardiovasculares<sup>16-19</sup>.

Si bien, los ARA II ya no son el tratamiento adicional de elección en pacientes con IC y FE  $\leq 40\%$  que siguen sintomáticos a pesar de recibir tratamiento óptimo con IECA y bloqueadores beta. Esto es así porque el estudio EMPHASIS-HF, demostró que la eplerenona produce una mayor reducción de la morbi-mortalidad, así como de la mortalidad por todas las causas, que la observada al añadir ARAII al tratamiento convencional<sup>8,20</sup>.

### *- Ivabradina*

Ivabradina es un fármaco que inhibe los canales  $I_f$  del nodo sinusal, produciendo una reducción de la frecuencia cardíaca en pacientes en ritmo sinusal. El estudio SHIFT demostró que el tratamiento con ivabradina reduce la mortalidad de origen cardiovascular y la hospitalización, dado que mejora la función ventricular izquierda y mejora la calidad de vida<sup>21</sup>.



## Introducción

---

### *- Hidralazina y dinitrato de isosorbida*

En pacientes sintomáticos con una FE  $\leq$  40%, se puede usar la combinación de hidralazina y dinitrato de isosorbida como tratamiento alternativo cuando haya intolerancia a IECA y ARA. Se considerará su adicción al tratamiento en pacientes con síntomas persistentes a pesar del tratamiento con IECA, bloqueadores beta y ARA o antagonistas de la aldosterona, ya que puede reducir el riesgo de muerte<sup>7</sup>. Hay dos ensayos clínicos controlados con placebo, el estudio V-HeFT-I, en el que se observó una tendencia a la reducción de la mortalidad por todas las causas, aumentó la capacidad de ejercicio y la fracción de eyección comparado con el grupo placebo y el estudio A-HeFT, que se interrumpió anticipadamente, después de un seguimiento medio de 10 meses, debido a una significativa reducción de la mortalidad, riesgo de hospitalización por IC y mejoría de la calidad de vida<sup>22-24</sup>.

### *- Digoxina*

En pacientes con insuficiencia cardiaca sintomática y fibrilación auricular (FA), se puede utilizar digoxina para reducir la frecuencia ventricular rápida, aunque se prefieren otros tratamientos. En pacientes con fibrilación auricular y una FE  $\leq$ 40, se debe usar para controlar la frecuencia cardiaca además de un bloqueador beta o antes que éste. En pacientes, en ritmo sinusal con IC sintomática y una FE  $\leq$ 40%, el tratamiento con digoxina, además de un IECA, mejora la función ventricular y el bienestar del paciente y reduce los ingresos hospitalarios

por empeoramiento de la insuficiencia cardíaca, pero no tiene ningún efecto sobre la supervivencia<sup>8</sup>.

### - *Diuréticos*

Los efectos de los diuréticos sobre la morbimortalidad en pacientes con insuficiencia cardíaca a diferencia de lo que ocurre con los IECA y beta-bloqueantes, no han sido estudiados. Sin embargo, los diuréticos alivian la disnea y reducen el edema, por lo que se recomienda su administración en pacientes con IC y signos o síntomas de congestión venosa pulmonar y sistémica, con independencia de la fracción de eyección<sup>8</sup>.

Activan el sistema renina-angiotensina-aldosterona en los pacientes con síntomas leves de insuficiencia cardíaca y deben prescribirse normalmente en combinación con un IECA/ARA.

Los diuréticos de asa producen una diuresis más intensa y más corta que las tiazidas, que causan una diuresis más suave y prolongada. Por lo general, en la IC moderada o grave es necesaria la administración de diuréticos de asa y en caso de edema resistente se pueden usar en combinación con una tiazida, extremando la precaución para evitar deshidratación, hipovolemia, hiponatremia o hipopotasemia, si bien los diuréticos tiazídicos son inefectivos en pacientes con un aclaramiento de creatinina  $< 30$  ml/minuto. Durante el tratamiento con diuréticos es esencial monitorizar las concentraciones de potasio, sodio y creatinina.

## Introducción

Tabla 1. Tratamiento farmacológico en la insuficiencia cardíaca con disfunción sistólica

<b>Betabloqueantes</b>	
Objetivo	Reducción de la mortalidad
Indicación	FEVI < 40 % con o sin síntomas de IC. La evidencia disponible únicamente avala el empleo de bisoprolol, carvedilol, nebivolol y succinato de metoprolol
Contraindicaciones	Asma grave, EPOC con hiperreactividad bronquial (HRB), BAV de 2.º y 3.º grado, FC < 50 lpm, hipotensión arterial grave, IC aguda descompensada
Efectos secundarios	Hipotensión ortostática, bradiarritmias, descompensación de IC, broncoespasmo, vasoconstricción periférica, disfunción eréctil, hipercolesterolemia, hiperglucemia, inhibición de respuesta neuroglucopénica
<b>Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina</b>	
Objetivo	Reducción de la mortalidad
Indicación	FEVI < 40 % con o sin síntomas de IC
Contraindicaciones	Estenosis bilateral de arterias renales, Cr > 2,5 mg/dl, K <sup>+</sup> > 5 mEq/l
Efectos secundarios	Hipotensión ortostática, hiperpotasemia, deterioro de la función renal, tos, disgeusia, angioedema
<b>Antagonistas del receptor de la angiotensina II</b>	
Objetivo	Reducción de la mortalidad
Indicación	Alternativa al IECA en pacientes con efectos secundarios (más frecuente, la tos)
Contraindicaciones	Igual al IECA
Efectos secundarios	Igual al IECA, salvo que no producen tos
<b>Antagonistas del receptor mineralocorticoide/aldosterona</b>	
Objetivo	Reducción de la mortalidad
Indicación	IC sintomática (NYHA II-IV) y FEVI < 35 %
Contraindicaciones	K <sup>+</sup> > 5 mEq/l, Cr > 2,5 mg/dl
Efectos secundarios	Hipotensión ortostática e hiperpotasemia. Pérdida de la libido y ginecomastia, solo con espironolactona (no con eplerenona)
<b>Ivabradina</b>	
Objetivo	Reducción de la mortalidad cardiovascular y las hospitalizaciones
Indicación	IC sintomática (NYHA II-IV), FEVI < 35 % y ritmo sinusal con FC > 70 lpm, pese a tratamiento con BB en la dosis máxima tolerada. Es posible beneficio en pacientes sin BB, pero existe evidencia escasa al respecto
Contraindicaciones	FC < 50 lpm
Efectos secundarios	Bradycardia sinusal, fosfenos
<b>Diuréticos de asa y tiazidas</b>	
Objetivo	Mejoría de los síntomas
Indicación	Pacientes con síntomas y/o signos de retención hidrosalina
Contraindicaciones	No tienen
Efectos secundarios	Disfunción renal, hipovolemia, trastornos hidroelectrolíticos, hiperuricemia, alcalosis metabólica, dislipemia, ototoxicidad (diuréticos de asa)
<b>Digoxina</b>	
Objetivo	Mejoría de los síntomas y reducción de las hospitalizaciones
Indicación	FEVI < 45 %, ritmo sinusal y síntomas persistentes de IC, pese a tratamiento médico óptimo con IECA/ARA II, BB, ARM y diuréticos. También para el control de respuesta ventricular en pacientes con IC y fibrilación auricular
Contraindicaciones	FC < 50 lpm, BAV 2º y 3º grado, síndrome de preexcitación, insuficiencia renal grave, miocardiopatía hipertrófica obstructiva
Efectos secundarios	Bradiarritmias, BAV, taquiarritmias supraventriculares y ventriculares, náuseas, vómitos, diarrea, alteraciones visuales
<b>Dinitrato de isosorbide + hidralazina</b>	
Objetivo	Reducción de mortalidad (pacientes de raza negra)
Indicación	Pacientes de raza negra con IC sintomática (NYHA II-IV), FEVI < 45 % y tratamiento óptimo con IECA/ARA II, BB, ARM y diuréticos. También como alternativa a IECA y ARA II en pacientes intolerantes
Contraindicaciones	Hipotensión arterial, inhibidores de la guanilato-ciclasa
Efectos secundarios	Hipotensión ortostática, cefalea, náuseas, síndrome <i>lupus-like</i>

ARA II: antagonistas del receptor de la angiotensina II; ARM: antagonistas del receptor mineralocorticoide; BAV: bloqueo aurículo-ventricular; BB: betabloqueantes; Cr: creatinina; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; FC: frecuencia cardíaca; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; HRB: hiperreactividad bronquial; IC: insuficiencia cardíaca; IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; lpm: latidos por minuto; K<sup>+</sup>: potasio sérico; NYHA: New York Heart Association.

### 1.1.2 Terapias no farmacológicas

#### - *Terapia de resincronización cardíaca*

La aplicación de la terapia de resincronización cardíaca (TRC) en pacientes con insuficiencia cardíaca se ha basado en la detección de una activación eléctrica anormal que afecta a cerca del 30% de los pacientes. Estas anomalías eléctricas consisten principalmente en un intervalo PR alargado y en un aumento en la duración del complejo QRS, que en la mayoría de los casos es atribuible a un bloqueo completo de la rama izquierda del haz de his. Estas alteraciones eléctricas comportan una disincronía mecánica a nivel interauricular, atrioventricular, interventricular e intraventricular, lo que ocasiona una prolongación de la contracción y relajación isovolumétrica, un incremento ligero en la duración de la sístole, una disminución sustancial en el tiempo de llenado ventricular, la aparición o el aumento de la regurgitación mitral y finalmente un deterioro de la eficiencia del corazón como bomba.

Se recomienda esta terapia en pacientes en clase funcional III-IV de la NYHA que permanecen sintomáticos a pesar de tratamiento médico óptimo y que tienen una fracción de eyección disminuida ( $FE \leq 35\%$ ) y prolongación QRS (ancho QRS  $\geq 120$  ms) para reducir la morbimortalidad. En los estudios MADIT-CRT<sup>25</sup> y REVERSE<sup>26</sup>, los pacientes con duración del QRS  $\geq 150$  ms, obtuvieron los mayores beneficios de la TRC. En el estudio REVERSE<sup>26</sup>, además se observó una tendencia hacia menos eficacia clínica entre los pacientes en clase funcional I comparados con los pacientes en clase II. No hay pruebas convincentes de que la TRC esté indicada en pacientes sin síntomas o síntomas leves transitorios, por lo que la

## Introducción

---

recomendación queda limitada a los pacientes en clase II de la NYHA, con FE  $\leq 35\%$ , QRS  $\geq 150$  mseg, en ritmo sinusal y con terapia médica óptima<sup>27</sup>.

Si bien no se han investigado adecuadamente las ventajas de la TRC+DAI frente a TRC en cuanto a la supervivencia, a partir de la evidencia disponible sobre la eficacia de los desfibriladores implantables en la prevención de la muerte súbita, en la práctica clínica se prefiere por lo general, la combinación TRC+DAI, en pacientes que cumplen criterios para la implantación de TRC, incluida una expectativa de vida con buen estado funcional  $> 1$  año.

Como sabemos la TRC se utiliza para sincronizar la contracción interventricular e intraventricular en pacientes con insuficiencia cardiaca en los que hay evidencia de desincronización eléctrica (QRS  $\geq 120$  ms), si bien en algunos casos se han implantado dispositivos de TRC en pacientes sin evidencia electrocardiográfica de desincronización (ancho QRS  $< 120$  ms), basándose en los hallazgos ecocardiográficos, pero no existe evidencia que respalde esta práctica<sup>28</sup>, como se puso de manifiesto en el estudio PROSPECT, el cual no respalda el uso de índices ecocardiográficos y de Doppler tisular de desincronización mecánica en la selección de pacientes<sup>29</sup>.

Los primeros estudios sobre el papel de la TRC en el manejo de los pacientes en clase funcional III y IV de la NYHA, una FE reducida y un QRS ancho, demostraron que la TRC mejora la clase funcional (descendió de media en unos 0,5-0,8 puntos), la duración del ejercicio y la calidad de vida<sup>30-33</sup>. En dos estudios importantes se investigó el efecto de la TRC sobre la mortalidad por todas las causas en pacientes con IC, en clase funcional III-IV y desincronización: en el estudio COMPANION<sup>31</sup>, tanto la TRC como la TRC+DAI, se asociaron a una reducción del 20% de mortalidad y hospitalización por todas las causas

( $p < 0,01$ ) y en el estudio CARE-HF, el descenso medio del volumen sistólico fue del 18% a los 3 meses y del 26% a los 18 meses, con un aumento medio de la FE del 6,9% a los 18 meses<sup>34</sup>. El efecto fue mucho mayor en pacientes con cardiopatía no isquémica frente a los que tenían cardiopatía isquémica. Estos resultados indican que, a largo plazo, la TRC reduce el riesgo de efectos clínicos secundarios a la IC y previene o reduce el avance de la enfermedad por su efecto considerable, progresivo y persistente de remodelación inversa del ventrículo izquierdo. No obstante, son necesarios más estudios para determinar si la remodelación inversa del ventrículo izquierdo genera mejores resultados clínicos a largo plazo y si la supervivencia se prolonga gracias a la TRC en pacientes con síntomas leves.

Existe un perfil de pacientes (respondedores e hiperrespondedores) donde se describen una serie de predictores de buena respuesta clínica de la terapia de resincronización cardiaca, como son, sexo femenino, etiología no isquémica de la insuficiencia cardiaca, presencia de bloqueo completo de rama izquierda típico, anchura QRS >150 mseg, hospitalización previa por insuficiencia cardiaca, volumen telediastólico del ventrículo izquierdo >125 ml/m<sup>2</sup> y volumen auricular izquierdo <40 ml/m<sup>2</sup>.

## Introducción

---

Sin embargo, la resincronización tiene dificultades:

1) No es una técnica sencilla, ya que existen dificultades en la implantación del cable en seno coronario, y hasta en un 10% de los casos no es posible, teniendo que implantarse epicárdico.

2) Un número no desdeñable de pacientes, que podría alcanzar hasta un 30%, no son respondedores

3) La indicación inicial necesita un ensanchamiento del QRS superior a 120-150 mseg, y en ritmo sinusal.

### - *Desfibrilador automático implantable (DAI)*

Se recomienda la implantación de un DAI para la prevención secundaria en pacientes que han sobrevivido a la fibrilación ventricular (FV) y en pacientes con taquicardia ventricular (TV) documentada y hemodinámicamente inestable y/o taquicardia ventricular con síncope, una fracción de eyección  $\leq 40\%$ , tratamiento médico óptimo y una expectativa de vida con buen estado funcional  $> 1$  año<sup>7</sup>. Aproximadamente la mitad de las muertes sucedidas en pacientes con IC están relacionadas con la muerte súbita.

Los datos sobre el papel de los DAI en pacientes con MCD no isquémica son escasos. El estudio SCD-HeFT<sup>35</sup>, que incluía a pacientes con MCD no isquémica y pacientes con disfunción ventricular izquierda de origen isquémico, mostró una reducción del 23% de la mortalidad. Un metaanálisis de estudios en los que sólo participaban pacientes con MCD no isquémica mostró una reducción de la mortalidad del 25%<sup>36</sup>. Estos datos indican que la etiología de la insuficiencia cardiaca no justifica una estrategia diferente para la prevención primaria de la muerte súbita.

### *- Dispositivos de asistencia ventricular izquierda. (DAVI)*

En los últimos años, tanto los dispositivos de asistencia ventricular izquierda como el corazón artificial han tenido un rápido progreso. Los pacientes con insuficiencia cardiaca terminal, tienen mala calidad de vida y una tasa de mortalidad muy alta, por lo que son candidatos potenciales para la implantación de un DAVI. Las mejores técnicas y el éxito demostrado de los DAVI implantables, han hecho de ellos una opción de tratamiento razonable para estos pacientes, bien como puente hacia el trasplante o bien como terapia de destino<sup>27</sup>. Debido a la naturaleza de la población a la que están destinados, la documentación recabada en los ensayos clínicos es escasa y las recomendaciones que se proponen reflejan esta falta de evidencia. Por esta razón, no hay consenso en cuanto a las indicaciones de los dispositivos de asistencia ventricular izquierda ni sobre la población a la que deberían estar destinados<sup>37,38</sup>. Es muy posible que la tecnología de estos dispositivos sufra cambios



## Introducción

---

considerables en el futuro próximo y, por consiguiente, las recomendaciones deberán ser revisadas.

En la actualidad, los dispositivos de asistencia ventricular izquierda temporales están indicados en pacientes en espera de trasplante cardíaco y para el manejo de pacientes con miocarditis aguda grave, ya que el apoyo hemodinámico con éste dispositivo puede prevenir o reducir el deterioro clínico y así su mortalidad o mejorar su situación antes del trasplante; si bien el uso de estos dispositivos a largo plazo aumenta el riesgo de complicaciones, como infección y embolización.

### *- Trasplante cardiaco.*

El trasplante cardiaco es el tratamiento de elección en la insuficiencia cardiaca terminal de pacientes sin otra opción terapéutica, siempre y cuando no presenten contraindicaciones. Aunque no se han realizado estudios controlados, hay consenso en que el trasplante comparado con el tratamiento convencional y siempre que se apliquen criterios adecuados de selección, aumenta significativamente la supervivencia, la capacidad de ejercicio, la reincorporación a la vida laboral y la calidad de vida.

Además de la escasez de donantes, el reto fundamental del trasplante cardíaco es la prevención del rechazo del injerto, que causa un gran porcentaje de muertes durante el primer año del postoperatorio y reducir las consecuencias del tratamiento inmunosupresor indefinido (infección, hipertensión, insuficiencia renal, tumores y enfermedad coronaria).

### 1.2 Bases de la medicina regenerativa

Uno de los campos de la medicina que más expectativas ha levantado en los últimos años es la terapia regenerativa con células madre. El aislamiento desde 1998 de células embrionarias humanas, la aparente potencialidad de las células madre adultas y el desarrollo de la terapia génica nos proporciona un futuro esperanzador para un importante número de enfermedades que en la actualidad tienen un tratamiento limitado.

#### 1.2.1 Características de las células madre

Conceptualmente, las células madre tienen dos características básicas que las diferencian del resto de las células somáticas: capacidad de división asimétrica y capacidad de diferenciación en más de un tipo celular especializado.

**1.2.1.1 Capacidad división asimétrica:** consiste en generar en una misma mitosis dos células diferentes entre sí: una célula indiferenciada idéntica a la célula original y otra célula hija con un mayor grado de diferenciación. Esta capacidad única de las células madre permite por una parte la autorrenovación del pool de células madre, básica para la persistencia de las mismas a lo largo de la vida del individuo, y por otra, la diferenciación necesaria para el mantenimiento de la funcionalidad de los distintos tejidos adultos. La capacidad de autorrenovación y proliferación in vitro es común a las células madre embrionarias y a las de

## **Introducción**

---

origen adulto; sin embargo, en el caso de las embrionarias es muy superior o prácticamente ilimitada

**1.2.1.2 Diferenciación:** es el proceso por el cual células madre no especializadas se transforman en células especializadas. Por definición, las células madre tienen la capacidad de diferenciarse a más de un tipo celular, ya que en caso contrario se trata simplemente de células inmaduras precursoras de una determinada estirpe. Dicha diferenciación está regulada por una serie de señales que desencadenan este proceso. Las señales internas están controladas por los genes que se encuentran en las cadenas de ADN. Las señales externas para la diferenciación celular incluyen sustancias químicas secretadas por otras células, el contacto físico con células vecinas y ciertas moléculas reguladoras que se encuentran en el microambiente celular.

Aún quedan cuestiones sin resolver sobre la diferenciación celular, como si las señales externas e internas que desencadenan la diferenciación son iguales en todos los tipos de células madre, o si se pueden identificar las señales que determinan la diferenciación a un tipo específico de células.

### 1.2.2 Clasificación según su potencialidad

Por tanto, una célula madre o troncal es aquella que es capaz de dividirse indefinidamente y diferenciarse a distintos tipos de células especializadas, no sólo morfológicamente sino también de forma funcional.

Las células madre se pueden clasificar según su potencial de diferenciación:

**1.2.2.1 Células madre totipotenciales:** son capaces de producir tejido embrionario y extraembrionario.

**1.2.2.2 Células madre pluripotenciales:** tienen la habilidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias: endodermo, ectodermo y mesodermo (figura 2).

**1.2.2.2 Células madre multipotenciales:** son capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria<sup>39</sup>.

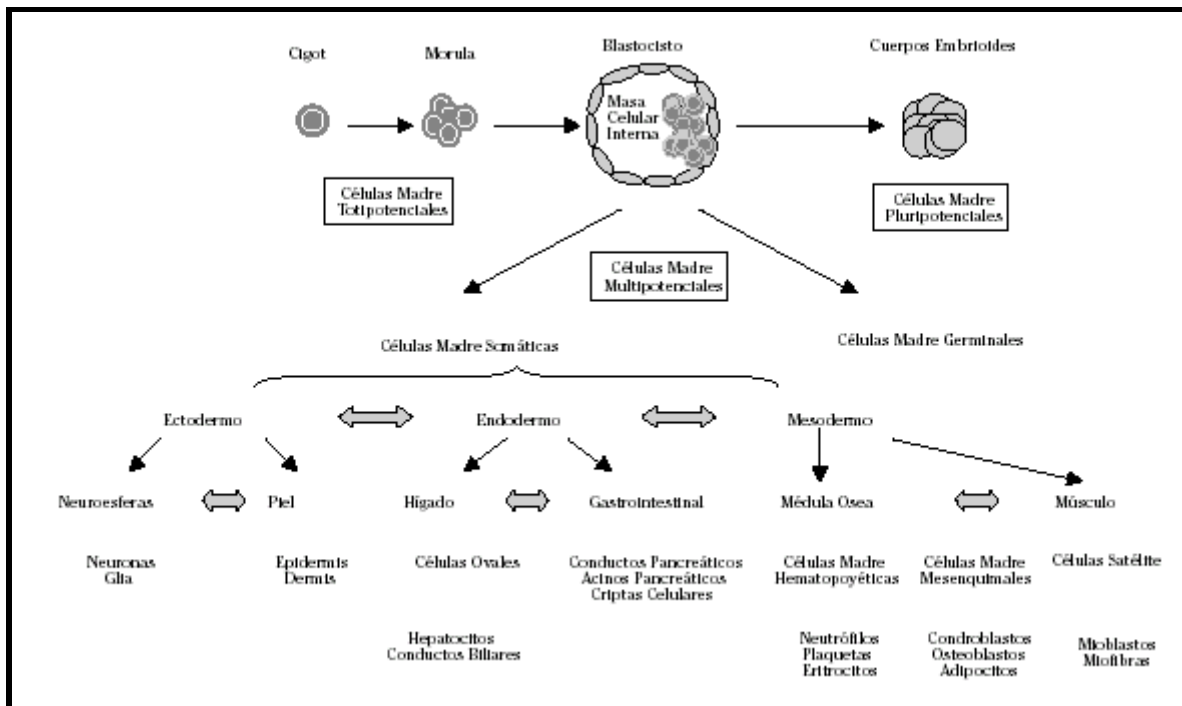


Figura 2. Modelo jerárquico de las células madre en función de su potencialidad

Tradicionalmente se han considerado a las células madre embrionarias como células pluripotenciales, a diferencia de las células madre adultas que se han caracterizado sólo como multipotenciales. Sin embargo, trabajos publicados sugieren que la potencialidad de algunos tipos de células madre adultas podría ser mayor de lo esperado, existiendo células troncales pluripotenciales en algunos órganos adultos con capacidad de diferenciarse en tejidos derivados de cualquiera de las capas embrionarias<sup>40-41</sup>. Es importante destacar que para que una célula madre pueda considerarse pluripotencial tiene que cumplir las siguientes condiciones: en primer lugar, una única célula debe ser capaz de diferenciarse a células

especializadas procedentes de cualquier capa embrionaria; en segundo lugar, demostrar la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de las células a las que se han diferenciado y, finalmente, que se produzca un asentamiento claro y persistente de estas células en el tejido diana, tanto en presencia o ausencia de daño en los tejidos en los cuales se injerta. En estos momentos no existe ningún estudio que cumpla todos estos criterios de forma estricta, aunque algunos trabajos indican de manera bastante evidente la posible existencia de células madre adultas pluripotenciales<sup>40-41</sup>.

La existencia de células madre adultas en distintos tejidos, incluyendo hematopoyético, neuronal, epidérmico, gastrointestinal, músculo esquelético, músculo cardíaco, hígado, páncreas o pulmón no admite controversia. Sin embargo, cada vez parece más evidente que las células madre adultas derivadas de estos órganos, no sólo pueden generar células maduras de dicho tejido sino también tejidos derivados de otras capas embrionarias, siendo el caso más típico el de las células madre hematopoyéticas capaces de diferenciarse a tejidos como hepatocitos<sup>42</sup>, músculo cardíaco<sup>43</sup>, endotelio<sup>41</sup> o a tejidos derivados de las tres capas embrionarias<sup>44</sup>. Este fenómeno, denominado versatilidad, plasticidad o capacidad de transdiferenciación de las células madre adultas, no está exento de controversia, ya que mientras algunos estudios lo apoyan, otros trabajos cuestionan la existencia de una auténtica versatilidad de las células, justificando algunos de los hallazgos de versatilidad en función de fenómenos de fusión celular<sup>45-47</sup> o incluso cuestionando abiertamente los resultados experimentales<sup>48</sup>. En las siguientes líneas revisaremos los

distintos tipos de células madres así como algunas de las evidencias que apoyan la existencia de versatilidad y los mecanismos que la justifiquen.

### 1.2.3 Células madre derivadas de la médula ósea

Se han descrito diferentes tipos de células madre en la médula ósea: hematopoyéticas (HSC)<sup>39</sup>, mesenquimales (MSC)<sup>49</sup>, las llamadas Side Population Cells (SP)<sup>50</sup> y recientemente las células progenitoras adultas multipotenciales o MAPCs<sup>45</sup>.

#### 1.2.3.1 Células madre hematopoyéticas (HSC)

Las HSC han sido identificadas tanto *in vitro* como *in vivo* por varios laboratorios y utilizadas clínicamente desde hace más de 50 años. El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos ha demostrado definitivamente que existen células madre multipotenciales hematopoyéticas en la médula ósea y en la sangre periférica<sup>51</sup>.

Además del potencial hematopoyético, diversos trabajos indican que las HSC bajo ciertas circunstancias pueden ser más potentes de lo esperado dando lugar a tejidos derivados de distintas capas embrionarias. Las células madre hematopoyéticas de médula ósea y de sangre periférica son capaces de contribuir a la angiogénesis y vasculogénesis *in vivo* de tal forma que las células CD34+ no sólo contienen progenitores hematopoyéticos sino también células progenitoras endoteliales. Hoy en día se acepta que existe un progenitor común

endotelial y hematopoyético (hemangioblasto), lo cual vendría apoyado por estos hallazgos de potencialidad endotelial de las células troncales hematopoyéticas de la médula ósea<sup>41</sup>. También se han publicado trabajos que apoyarían la capacidad de las HSC de diferenciarse en células de músculo cardíaco. El grupo de Orlic y Anversa han demostrado, en un modelo de infarto de miocardio murino, que una inyección de células de médula ósea  $\text{Lin}^-$  y  $\text{c-kit}^+$  (fenotipo de marcadores de superficie típico de HSC) en el corazón dañado, resulta de la colonización de estas células en más de la mitad del área infartada. Estas posibles HSC adquirieron un fenotipo característico de células de miocardio y contribuyen a la mejora clínica y supervivencia de los animales<sup>43</sup>. La contribución de las células madre adultas a la regeneración cardíaca ha sido sugerida en modelos de trasplante cardíaco en humanos: en un grupo de pacientes varones trasplantados con corazones de donantes mujer, el análisis de biopsias cardíacas permitió identificar que un porcentaje de entre el 7-10% de los cardiomiocitos provenían del propio receptor ya que en ellos se podía identificar el cromosoma Y<sup>52</sup>. Aunque el origen de dichas células no se pudo determinar, estos hallazgos sugieren la capacidad de células adultas de diferenciarse a tejido cardíaco. Basándose en que las células ovas (células madre hepáticas) expresan marcadores de superficie tradicionalmente asociados a HSC ( $\text{c-kit}$ ,  $\text{flt-3}$ ,  $\text{Thy-1}$  y  $\text{CD34}$ ), se ha sugerido que éstas podrían diferenciarse a células ovas y hepatocitos. El grupo de Lagasse y col han demostrado que células madre hematopoyéticas de médula ósea con el fenotipo  $\text{Lin}^-$ ,  $\text{c-kit}^+$ ,  $\text{Thy-1}$ ,  $\text{Sca-1}$  son capaces de regenerar un hígado murino en un modelo de daño hepático fulminante;<sup>42</sup> mientras que utilizando modelos de quimerismo en pacientes sometidos a trasplantes de médula ósea o de hígado, y aprovechando la posibilidad de utilizar el



## Introducción

---

cromosoma Y como marcador del origen de la célula, también se ha podido demostrar que un porcentaje de hepatocitos provienen de células madre de origen no hepático<sup>53-54</sup>. El potencial de las HSC para adquirir características de músculo esquelético, neuronas adultas, así como células de la glía, y de contribuir a otros tejidos como el epitelio pulmonar, gastrointestinal, renal o a la piel ha sido descrito principalmente *in vivo*<sup>55</sup>. A pesar de todos estos esfuerzos, ninguno de los estudios publicados hasta el momento demuestra que una única célula madre hematopoyética contribuya de forma robusta y funcional a la regeneración de un tejido distinto del hematopoyético y por tanto, en sentido estricto no cumple los criterios necesarios para hablar de versatilidad. Cada uno de los trabajos mencionados puede ser criticado en este sentido; sin embargo, si tomamos los estudios de forma conjunta, sí que aportan evidencias de la existencia de HSC con estas características y potencialidades<sup>41-44,56</sup>.

### 1.2.3.2 Células madre mesenquimales (MSC)

La médula ósea también contiene células madre mesenquimales, también denominadas células madre estromales o MSC. En los últimos años se han descrito distintos marcadores de superficie que han permitido identificar y aislar células MSC, tales como SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90 y CD10621, dado que las MSC no expresan antígenos de superficie típicos de las HSC, como CD34, CD45 o CD14. Experimentos *in vitro* han demostrado que las MSC son capaces de diferenciarse a tejidos mesodérmicos funcionales, como osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos esqueléticos<sup>49</sup>. En nuestro grupo

se han aislado células mesenquimales y diferenciado bajo ciertos estímulos a osteoblastos, adipocitos y vasos sanguíneos (figura 3)

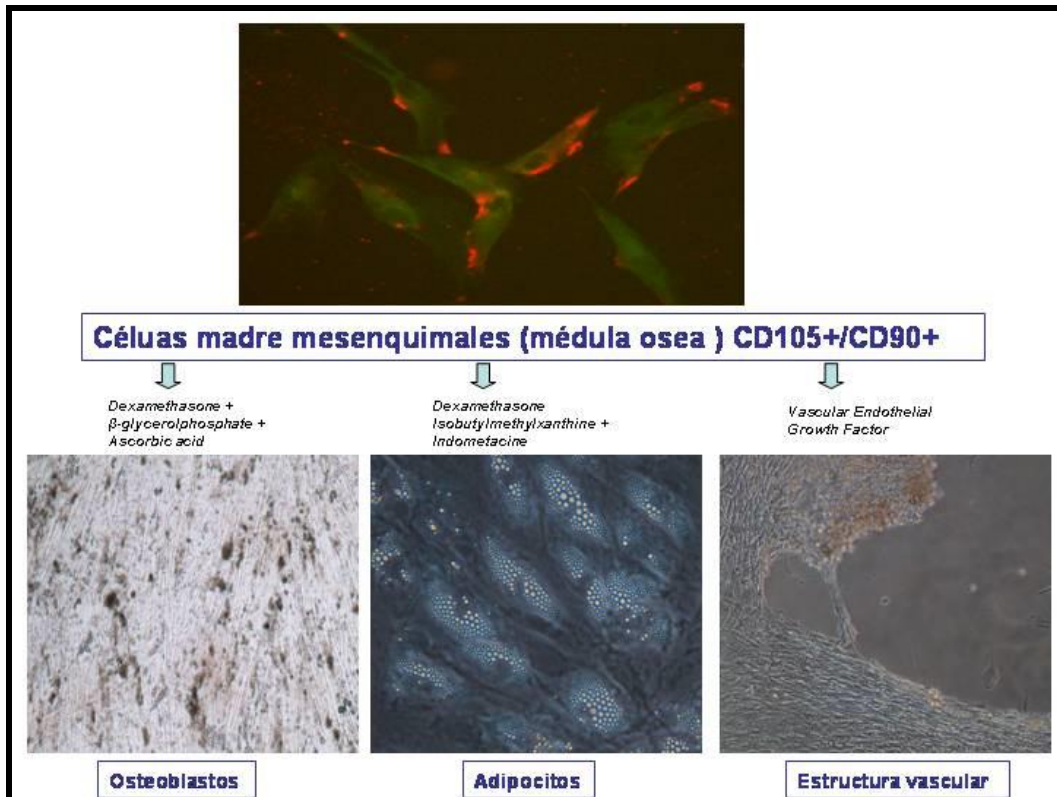


Figura 3. Diferenciación de células madre mesenquimales a adipocitos y vasos sanguíneos

Varios grupos afirman haber conseguido diferenciar MSC a células derivadas del neuroectodermo, basándose en la adquisición de ciertos marcadores de origen neuronal por parte de dichas células cuando son sometidas a sistemas de cultivo específicos. Sin embargo, los autores no llegan a demostrar que estas células adquieran características funcionales similares a neuronas o células de la glía<sup>57</sup>. A pesar de su probada multipotencialidad

## **Introducción**

---

mesodérmica y de su habilidad para diferenciarse a neuroectodermo, las MSC no se diferencian a tejido derivado del endodermo y, por lo tanto, no se pueden considerar estrictamente células madre pluripotenciales. Las MSC constituyen un modelo muy útil en aplicaciones clínicas para un número de enfermedades, tanto en terapia regenerativa como en terapia génica<sup>58</sup>.

### **1.2.3.3 Células “side population” (SP)**

Las llamadas células SP han sido aisladas tanto a partir de médula ósea como de músculo utilizando técnicas de citometría de flujo (FACS). Se sabe que las SP son capaces de diferenciarse a células madre hematopoyéticas en humanos, roedores y otras especies<sup>50,59</sup>. Además algunos estudios describen que las SP podrían dar lugar a otros tipos de células especializadas e integrarse en distintos tejidos in vivo. Así, el grupo de Jackson y col demostró en 1999 que las SP podían diferenciar a células con características de músculo cardíaco y endotelio en un modelo murino de infarto de miocardio<sup>59</sup>.

### **1.2.3.4 Células progenitoras multipotenciales adultas (MAPC)**

Esta población celular de la médula ósea ha sido descrita por el grupo de Catherine Verfaillie<sup>40</sup>. Su descubrimiento ha suscitado la atención del mundo científico ya que se han descrito como auténticas células pluripotenciales con una capacidad diferenciadora muy similar a las células madre embrionarias. Las MAPCs han sido aisladas tanto de médula

humana como murina. Estas células son capaces de proliferar in vitro más de 120 divisiones sin un aparente envejecimiento ya que mantienen unos niveles altos de telomerasa durante todo el tiempo de cultivo. Al igual que las células madre embrionarias, en las MAPCs se detecta la activación de los factores de transcripción Oct-4, nanog y Rex-1, factores que son necesarios para mantener la célula en un estado proliferativo e indiferenciado. Además se han realizado experimentos de clonaje que prueban que es una única célula la que es capaz de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo o ectodermo). In vitro, las MAPCs pueden ser inducidas a diferenciarse a tejidos derivados del mesodermo como hueso, cartílago, adipocitos, músculo esquelético, estroma hematopoyético o endotelio; pero de momento no han sido capaces de diferenciarse a tejido hematopoyético maduro o cardiomiocitos. Estas células también han sido capaces de diferenciarse a hepatocitos y funcionar como tales, ya que son capaces de producir urea, albúmina, inducir el citocromo p450 con fenobarbital y almacenar glucógeno. La diferenciación de las MAPCs a tejidos derivados del ectodermo como neuronas, astrocitos y oligodendrocitos también ha sido demostrada in vitro<sup>60</sup>. Aunque el proceso de aislamiento de las MAPC todavía es largo y laborioso, y aún no se han publicado experimentos que prueben que no existen fusiones celulares, estos experimentos con MAPCs son los que más se han aproximado a la demostración de la existencia de células madre pluripotenciales, mostrando su potencialidad no sólo en el campo terapéutico, sino como un instrumento para poder comprender mejor los eventos que inducen a las células madre a diferenciarse.

### 1.2.4 Pluripotencialidad y células madre no derivadas de la médula ósea

La existencia de células madre en diferentes tejidos como el sistema nervioso central, hígado, corazón, piel y músculo no admite controversia. La visión tradicional de que órganos como el corazón o el sistema nervioso central no son capaces de regenerarse ya que carecen de células con potencial de proliferar y diferenciarse ha quedado claramente obsoleta. A continuación vamos a hacer una breve referencia a algunos estudios que indican la posibilidad de que células madre obtenidas de alguno de estos órganos tengan un mayor potencial del esperado, es decir, que existan células pluripotenciales en estos órganos. Los argumentos tanto contrarios como a favor de la versatilidad de las células madre derivadas de tejidos adultos, que hemos mencionado en el párrafo anterior, son también válidos en este caso.

Uno de los mejores experimentos donde se prueba la existencia de células madre adultas pluripotenciales de origen neural y su capacidad diferenciadora fue el publicado por el grupo de Clarke y col<sup>61</sup>. Este grupo inyectó células madre neuronales o neuroesferas procedentes de un ratón transgénico para el gen reportero LacZ en embrión de ratón. Aproximadamente el 25% de los embriones presentaban quimerismo no sólo en el tejido neuronal, sino también en tejidos del mesodermo y del endodermo. Cuando estas mismas neuroesferas fueron inyectadas dentro de un blastocito de ratón, la contribución se extendió al sistema nervioso central, corazón, hígado, intestino y otros tejidos. Debido a que los animales no fueron evaluados después del nacimiento, no se pudo realizar una valoración objetiva de la funcionalidad de las células donadas.

El grupo de Qu-Petersen y col<sup>62</sup> ha sido capaz de aislar diferentes poblaciones de células madre musculares murinas basándose en su capacidad de adhesión y proliferación. Estas células pueden mantenerse en cultivo durante más de 60 divisiones celulares sin anomalías cromosómicas, siendo capaces de diferenciarse *in vitro* e *in vivo* a endotelio, músculo, y células del linaje neuronal. Una vez más, la crítica que los investigadores hacen es la ausencia de experimentos clonales que prueben que es una única célula y no una población heterogénea la causante del potencial diferenciador.

De la epidermis humana y murina se han aislado células madre con capacidad de diferenciarse a células especializadas procedentes de dos capas embrionarias distintas. Estas células se pueden mantener en cultivo durante más de 12 meses sin diferenciarse y se puede inducir diferenciación *in vitro* a neuroectodermo (neuronas y células de la glía) o a linajes mesodérmicos (adipocitos y músculo liso). Su potencial de diferenciación a tejidos derivados del ectodermo y mesodermo ha sido demostrado a nivel clonal, pero no existen evidencias de una multipotencialidad *in vivo* y tampoco que los tejidos diferenciados sean funcionales. Además el porcentaje de las células con características morfológicas neuronales o mesodérmicas es menor al 10%<sup>63</sup>.

De forma casi continua aparecen nuevos estudios en los que se aíslan células madre a partir de tejidos adultos con capacidad multipotencial. Uno de los trabajos que más expectativas ha levantado sugiere que es posible aislar en el músculo cardíaco, células madre multipotenciales capaces de diferenciarse *in vitro* e *in vivo* a cualquiera de los tejidos necesarios para reconstituir un corazón dañado, esto es endotelio, músculo liso y músculo

cardíaco<sup>58</sup>. Incluso más sorprendente es el hecho de que dichas células son fácilmente identificables en el corazón gracias a la expresión de c-kit junto con la ausencia de expresión de marcadores específicos de línea (c-kit<sup>+</sup>, Lin<sup>-</sup>). Si estos resultados pudieran ser reproducidos por otros grupos en animales así como en humanos, las perspectivas terapéuticas serían enormes.

### 1.2.5 Hipótesis sobre el mecanismo de actuación de las células madre

A pesar de los múltiples estudios publicados que sugieren la existencia de células madre adultas pluripotenciales o incluso de la capacidad de ciertas células madre de transdiferenciarse, existen importantes interrogantes e incluso nuevas evidencias científicas que han cuestionado la verdadera naturaleza de estos fenómenos de diferenciación: quizá la pregunta fundamental radica en cuál es el posible mecanismo(s) que justifica las observaciones que hemos comentado. Cuatro serían las hipótesis que se barajan en la actualidad:

**1.2.5.1 Población celular heterogénea:** la mayor parte de los estudios publicados hasta el momento que sugieren la existencia de células madre adultas pluripotenciales no han sido capaces de demostrar esta potencialidad a nivel clonal, es decir, una única célula dando origen a dos poblaciones celulares diferentes. Es posible que muchas de las observaciones realizadas correspondan realmente a la heterogeneidad de las células estudiadas, pudiendo

existir diversas células madre en la misma población, cada una con distintas capacidades. Sin embargo, si existen trabajos en los que se demuestra a nivel clonal, la potencialidad de las células madre identificadas<sup>41,64</sup>.

**1.2.5.2 Fusión celular:** varios trabajos han demostrado que al menos algunas de las observaciones de pluripotencialidad podrían estar justificadas por procesos de fusión entre las células madre transplantadas y las células residentes<sup>45,47</sup>. El fenómeno de fusión se suele acompañar con la formación de células con características de ambas poblaciones fusionadas y generalmente con doble dotación cromosómica, lo que induce una desventaja proliferativa. La existencia del fenómeno de fusión es indudable y la pregunta que cabe hacer es si podría justificar todas las observaciones de pluripotencialidad realizadas hasta la fecha, lo cual parece poco probable, e incluso hasta qué punto este fenómeno puede ser ventajoso para la regeneración de un órgano o tejido<sup>46,65</sup>.

**1.2.5.3 Transdiferenciación:** de igual forma que durante el proceso de clonación, el núcleo de la célula somática puede sufrir un proceso de reprogramación. Es posible que las células madre adultas, en determinadas circunstancias, pueden desdiferenciarse para posteriormente diferenciarse hacia células de distinta estirpe<sup>66,67</sup>.



## Introducción

**1.2.5.4 Existencia de células madre pluripotenciales:** finalmente, es posible que en el organismo adulto persistan células madre residentes indiferenciadas, remanentes de tejido embrionario con capacidad pluripotencial

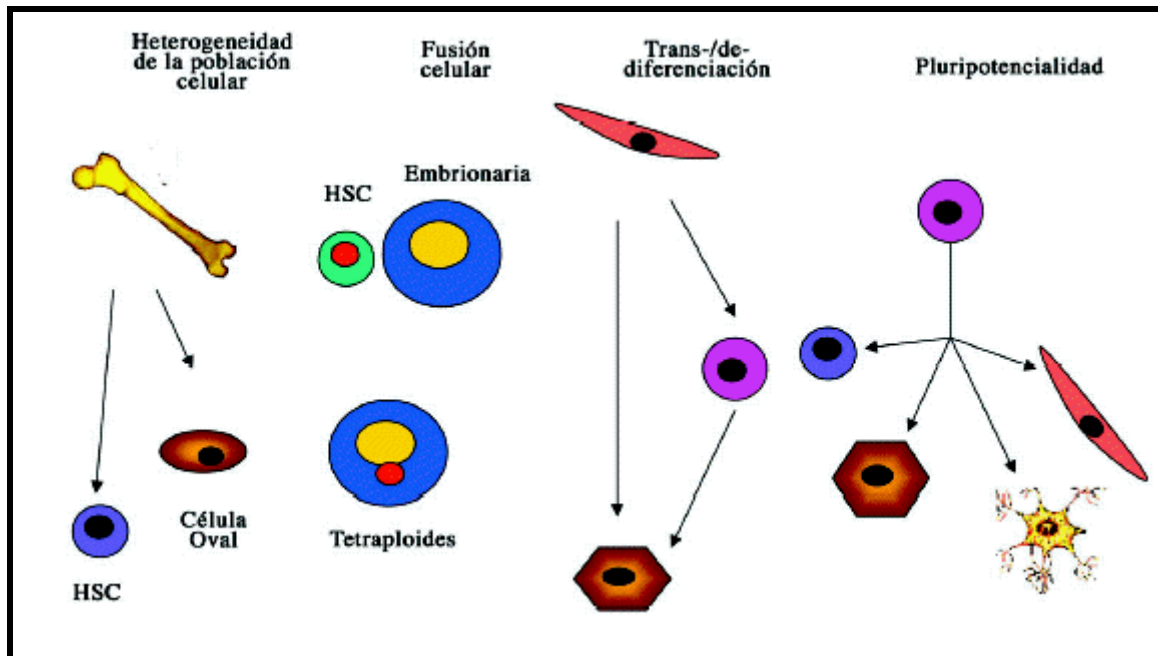


Figura 4. Posibles mecanismos de potencialidad de las células madre adulto

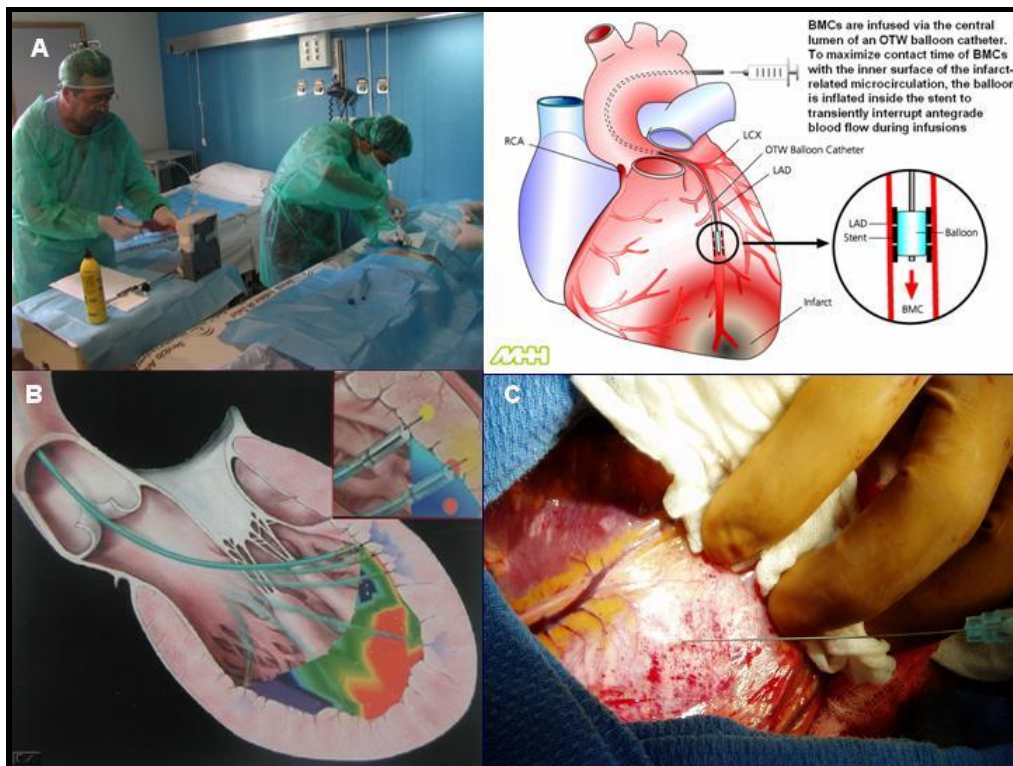
Cualquiera que sea la hipótesis cierta, todas pueden combinarse como mecanismos. Aún no sabemos cómo ocurre, pero sí que “algo” ocurre. La terapia celular regenera miocardio y otros tejidos. Como no es infrecuente, en la investigación clínica se investiga sobre los efectos sin conocer bien los mecanismos. Lo cierto es que el conocimiento avanza, y hoy día se tiene un concepto dinámico en el que los miocitos del corazón conllevan diferentes ciclos de renovación a lo largo de la vida. El corazón se regenera de forma

continua, existiendo un equilibrio entre la pérdida de miocitos y otros nuevos que nacen de forma ordenada. La velocidad de recambio parece acelerarse a edades avanzadas y en determinadas patologías, entre ellas la isquémica.

### 1.3 Experiencia con células madre derivadas de la médula ósea en la cardiopatía isquémica

Hasta no hace mucho se suponía que el corazón de los mamíferos era un órgano postmitótico y que estaba diferenciado hasta tal punto que era incapaz de regenerarse. Estudios experimentales han desafiado este concepto, pues sugieren que el miocardio adulto tiene cierta capacidad de renovación, de la que parece ser responsable células madre extracardíacas cuyo origen podría estar en la médula ósea. Así Beltrami et al<sup>68</sup> demostraron que los miocitos humanos pueden dividirse después de un infarto agudo de miocardio, siendo la división celular en el área colindante con las zonas necrosadas muy superior a las observadas en el grupo control. También existen estudios experimentales que sugieren que la capacidad regenerativa del corazón podría ser estimulada con células hematopoyéticas. En ratas, Orlic et al<sup>43</sup> inyectaron en la zona infartada células madre de la médula ósea de la propia rata o bien se administraban factores estimulantes que movilizaban a las células madre, demostrándose que tenían capacidad de colonizar el tejido necrótico y proliferar intensamente hasta conseguir la regeneración de las diferentes estructuras que constituyen el sincitio cardíaco. Otro estudio que aporta datos esclarecedores es el de Quaini et al<sup>69</sup> que estudiaron 8 corazones de mujeres que habían sido trasplantados a varones y demostraron que hasta el 10% de las células del endotelio vascular y de los miocitos tenían cromosoma Y y eran proliferativas. Además han sido identificadas un pool de células madre residentes en el miocardio<sup>70-73</sup>, capaces de diferenciarse a miocitos, músculo liso y endotelio, que podrían

tener un papel fundamental en los mecanismos de homeostasis y reparación tisular del corazón. Estos hallazgos, junto con el desarrollo en los últimos años de la terapia celular han generado un entusiasmo entre los investigadores que les ha impulsado a desarrollar ensayos clínicos en estos escenarios para evaluar el papel de la terapia celular en la cardiopatía isquémica. De estos ensayos hay que diferenciar aquellos que se realizan en la fase aguda del infarto de los realizados en la cardiopatía isquémica crónica; los que usan células madre derivadas de médula ósea, de los que utilizan factor de crecimiento estimulante de colonias granulocíticas, y los que utilizan la vía percutánea para su administración, de los que lo administran a través de una inyección intramiocárdica o transendocárdica (**figura 5**).



**Figura 5.** Obtención de células madre de la médula ósea y administración intracoronaria a través de un catéter balón coaxial (A). Administración endocavitaria a través de un catéter de mapeo electromecánico (B). Inyección intramiocárdica (C).

### **1.3.1 Uso del factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) en el infarto agudo de miocardio**

La administración del factor moviliza células madre de la médula ósea que se supone acuden al lugar donde se ha producido la injuria. Su administración es subcutánea, y por tanto menos traumático que la aspiración de médula ósea. A continuación exponemos los principales estudios con factor realizados en pacientes con IAM.

En el estudio MAGIC<sup>74</sup>, Kang et al estudiaron a 27 pacientes con IAM que tras implantar un stent en la lesión culpable se aleatorizaron a tres grupos: infusión de células movilizadas por el factor (10 pacientes), administración aislada de G-CSF (10 pacientes) y grupo control. A los 6 meses, se objetivó en los pacientes reevaluados del grupo de infusión de células movilizadas, un incremento de la perfusión miocárdica y de la función ventricular, pero hubo que suspender el estudio por documentarse una tasa de reestenosis inesperadamente alta en el grupo del G-CSF.

Valgimigli et al<sup>75</sup> reclutaron a 20 pacientes con IAM revascularizado percutáneamente y se aleatorizaron a recibir G-CSF o placebo. Se realizó un estudio basal con isótopos que se repitió a los 3 y 6 meses para estimar los cambios producidos en la perfusión miocárdica y en la función ventricular. A los 6 meses se objetivó un discreto incremento de la función ventricular y una disminución de los volúmenes telediastólicos en el grupo al que se administró G-CSF.

Zohlhofer et al<sup>76</sup> diseñaron un estudio aleatorizado doble ciego en 114 pacientes con IAM revascularizados percutáneamente, que se dividieron en 2 grupos, uno control (56) al

que se le administró placebo, y otro al que se le administró G-CSF (58), y tras analizar los resultados obtenidos concluyeron que la movilización de células madre con factor aunque segura, no tenía influencia alguna en la función ventricular, en el tamaño del infarto o en la tasa de reestenosis. Conclusiones similares se obtuvieron en el STEMI trial<sup>77</sup> (estudio doble ciego aleatorizado en 62 pacientes con IAM revascularizado), pues no se encontraron diferencias significativas en la función ventricular entre el grupo control y el grupo al que se le administró factor.

En un estudio realizado en nuestro grupo se reclutaron 13 pacientes con IAM que recibieron tratamiento trombolítico a su llegada con el objetivo de lograr una reperfusión precoz, fueron revascularizados con stent intracoronario en la arteria descendente anterior y posteriormente desde el quinto día, tratados con factor estimulante de colonias granulocíticas recombinado (G-CSF) (10 µg/kg/día durante 10 días), apreciándose una mejoría de la función global y regional en el seguimiento, (ganancia en la FE osciló entre -22 y +18% ( $6,2 \pm 12\%$ )), y se correlacionó de forma directa con el número total de células CD34<sup>+</sup> y CD38<sup>-</sup> circulantes en el quinto día de tratamiento con G-CSF ( $p < 0,003$ ) y de forma inversa con el pico de la fracción MB de la creatincinasa (CK-MB), ( $p < 0,002$ ); si bien, no hubo cambios significativos en los volúmenes cardíacos. Todos los pacientes evolucionaron favorablemente, sin complicaciones cardíacas. Un paciente presentó una rotura esplénica espontánea al octavo día del tratamiento, precisando una esplenectomía de urgencia, lo que obligó a interrumpir la administración del factor, con una evolución favorable ras la cirugía<sup>78</sup>.

### **1.3.2 Infusión intracoronaria de células madre derivadas de médula ósea en el infarto agudo de miocardio**

En la mayoría de los estudios realizados con células madre, éstas se obtienen del aspirado de médula ósea de la cresta iliaca. El aspirado se centrifuga y se separan con ficoll las células mononucleares, que son las que se administran vía intracoronaria a través de un catéter balón coaxial.

El primer estudio fue realizado por Strauer et al<sup>79</sup>, los cuales administraron a diez pacientes con IAM reperfundido, una infusión de células madre de 5 a 9 días tras el evento agudo y se comparó con un grupo control de 10 pacientes. A los 3 meses se les realizó un estudio de perfusión miocárdica con isótopos y aunque no se objetivaron cambios en la fracción de eyección si se evidenció una reducción significativa del área infartada en los pacientes tratados con células. El estudio TOPCARE AMI<sup>80</sup> reclutó a 59 pacientes con IAM revascularizado que fueron aleatorizados a recibir a los 5 días del infarto infusión de células madre derivadas de médula ósea (29 pacientes) o células progenitoras circulantes (30 pacientes). A los 4 meses fueron revisados angiográficamente, produciéndose un incremento en la fracción de eyección del 8% en ambos grupos y un remodelado favorable (reducción de 10 ml en el volumen telesistólico). Al año se les realizó una resonancia magnética nuclear (RMN) que evidenció una disminución de la zona infartada.

Fernández Avilés et al<sup>81</sup> realizaron un estudio no aleatorizado en 20 pacientes con IAM reperfundido a los que se les administró una infusión intracoronaria de células madre derivadas de médula ósea a los 13 días del infarto. A los 6 meses la RMN mostró un incremento medio de la FE del 6 % y un remodelado favorable. Paralelamente se cultivaron

muestras de las células madre obtenidas, mostrando un tropismo marcado para anidar en el tejido cardíaco dañado de ratón, y tras una semana adquirieron fenotipo de cardiomiocito.

En el BOOST trial<sup>82</sup> se estudiaron a 60 pacientes que se randomizaron a recibir infusión de células madre a los 4 días del infarto o a recibir terapia convencional (grupo control). A los 6 meses se les realizó una RMN, evidenciándose un incremento significativo de la fracción de eyección en el brazo de las células madre (incremento del 7% vs 1% del grupo control); sin embargo, a los 18 meses la RMN a los 18 meses no mostró diferencias significativas en la ganancia de FE de ambos grupos (5% vs 3%)<sup>83</sup>.

El estudio REPAIR AMI<sup>84</sup>, es un estudio multicéntrico en el que se reclutaron 204 pacientes con IAM revascularizado que se aleatorizaron a recibir a los 3-7 días del infarto infusión de células madre o placebo. A los 4 meses fueron sometidos a una reevaluación angiográfica que mostró una mayor ganancia en la fracción de eyección en el grupo de terapia celular (5.5 % vs 3%), llegando a ser del 8% en los pacientes con infartos más extensos.

Assmus et al<sup>85</sup> randomizaron 20 pacientes con infarto agudo de miocardio a recibir una infusión intracoronaria de células madre de médula ósea o de células progenitoras derivadas de la sangre y no encontraron diferencias significativas entre los dos grupos, en los que se demostró una mejoría de la función ventricular global y una disminución de los volúmenes telesistólicos a los 4 meses.

Jansens et al<sup>86</sup> realizaron un estudio randomizado en 67 pacientes con IAM (33 pacientes recibieron células madre de médula ósea tras el infarto, y 34 placebo) en los que la RMN realizada a los 4 meses no mostró diferencias significativas en la fracción de eyección,



## Introducción

---

si bien en el brazo que recibió células madre se objetivó una disminución de la zona infartada.

Lunde et al<sup>87</sup> estudiaron a 100 pacientes con IAM anterior los cuales fueron aleatorizados a recibir infusión intracoronaria de células madre a los 6 días del infarto o terapia convencional, y se reevaluaron a las 3 semanas y a los 6 meses con isótopos y con RMN, sin evidenciarse diferencias significativas en la función ventricular de ambos grupos.

La influencia de la revascularización precoz y del tratamiento regenerativo sobre la función ventricular en pacientes con infarto agudo de miocardio resulta difícil de separar. Así en nuestro centro se analizaron tres grupos de pacientes con IAM anterior revascularizado y función ventricular deprimida ( $FE < 45\%$ ), con el propósito de comparar los cambios en la función ventricular entre los pacientes con y sin tratamiento regenerativo. Los pacientes fueron asignados aleatoriamente para recibir una infusión intracoronaria de células mononucleares autólogas de médula ósea, la cual fue efectuada  $7 \pm 2$  días tras el IAM (grupo I; n=10), la administración sistémica de factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) por vía subcutánea ( $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) durante 10 días consecutivos, comenzando 5 días después del IAM (grupo II, n=10), o como grupo control (grupo III; n=10). La función ventricular fue estudiada basalmente y a los 3 meses de seguimiento, observándose un incremento neto medio del 20 % en la fracción de eyección en el grupo I, frente a un 4% ( $p < 0,01$ ) y un 6% ( $p < 0,05$ ) en los grupos II y III, respectivamente. Además, el porcentaje de los segmentos de contracción anormal y de los radios afectados se redujo significativamente al seguimiento en el grupo I, pero no mostró cambios significativos en los grupos II y III. Se

observó una reducción significativa en los volúmenes ventriculares al seguimiento en el grupo I, no así en los pacientes de los grupos II y III<sup>88</sup>.

### **1.3.3 Tratamiento regenerativo en la cardiopatía isquémica crónica**

El número de estudios sobre el efecto del tratamiento regenerativo en pacientes con cardiopatía isquémica crónica es menor que los realizados sobre pacientes con infarto en la fase aguda. De los estudio más esperanzadores cabe destacar el realizado por Strauer et al<sup>89</sup> en el que administró una infusión intracoronaria de células madre derivadas de la médula ósea a 18 pacientes con un infarto antiguo (entre 5 meses y 8 años), y se comparó con un grupo representativo control. A los 3 meses se produjo una mejora significativa de la función ventricular (incremento medio de la fracción de eyección del 15%) en el grupo tratado con terapia celular, mientras que en el grupo control no se evidenciaron cambios en la función ventricular.

Silva et al<sup>90</sup> realizaron un estudio en 5 pacientes con insuficiencia cardiaca severa de origen isquémico que estaban en lista de trasplante, a los que administró células madre derivadas de médula ósea vía transendocárdica tras mapeo electromecánico. Al seguimiento, se produjo un incremento significativo del consumo de oxígeno, lo que determinó que 4 de los 5 pacientes salieran de la lista de trasplante.

Huttmann et al<sup>91</sup> administraron G-CSF a 16 pacientes con insuficiencia cardiaca crónica, en 9 de los cuales era de origen isquémico y de ellos, 5 mejoraron su grado funcional

## Introducción

---

y aumentaron la distancia recorrida en el test de los 6 minutos, sin embargo, un paciente sufrió un episodio de fibrilación ventricular.

Archundia et al<sup>92</sup> estudiaron a 5 pacientes con infarto de miocardio de más de 1 año de evolución a los que se administró una inyección intramiocárdica en la zona perinfarto de células mononucleares CD 34+ obtenidas por aféresis tras la administración de G-CSF. A las 28 semanas de la revascularización y de la inyección de células se documentó un incremento de la fracción de eyección y una reducción de los volúmenes ventriculares.

En nuestra serie de 19 pacientes con IAM anterior crónico (más de un mes de evolución) revascularizado de forma percutánea y función ventricular deprimida que fueron tratados mediante infusión intracoronaria de células mononucleadas de médula ósea, se observó una ligera mejoría clínica y de la función ventricular a los 6 meses y al año del seguimiento, más acusada en un grupo de pacientes respondedores, los cuales se caracterizaban por haberse sometido a revascularización de forma más cercana a la terapia celular (siete meses de media)<sup>93</sup>. Al seguimiento, un paciente deterioró su grado funcional basal (de grado funcional III a grado funcional IV), 5 pacientes mantuvieron su grado funcional basal (2 en grado funcional I y 3 en grado funcional II) y 4 pacientes mejoraron con respecto a su condición basal (2 pasaron de grado funcional II a grado funcional I y los otros 2 de grado funcional III a grado funcional II) y no se objetivaron cambios significativos en el consumo de oxígeno ni en el umbral de anaerobiosis. Un paciente deterioró la función ventricular al seguimiento (del 26% pasó al 21%), documentándose reestenosis del stent implantado en la arteria descendente anterior, que se trató, presentando recurrencia clínica posterior, con nueva reevaluación angiográfica, objetivándose oclusión del stent, por lo que

fue incluido en la lista de trasplante. En el resto de pacientes del estudio se produjo un incremento de la fracción de eyección, con una ganancia absoluta de 7 %, el cual se consiguió a expensas de una disminución de segmentos hipoquinéticos en la pared anterior, tanto en el latido sinusal como el postextrasistólico. Se halló una correlación directa entre la ganancia de fracción de eyección y la disminución de radios afectados en la pared anterior ( $r = 0.76$ ,  $p < 0.01$ ), y una correlación negativa entre la fracción de eyección al seguimiento y el pico de creatín-kinasa (CK) en la fase aguda del infarto ( $r = -0.7$ ,  $p = 0.04$ ).

Del mismo modo, se incrementó la reserva contráctil tras la potenciación postextrasistólica. No obstante, esta mejoría funcional no se acompañó de una reducción de los volúmenes ventriculares ni de una disminución del sumatorio de Q al seguimiento. En cuanto al flujo de reserva coronaria (CFR) era normal basalmente y no se observaron diferencias significativas en el seguimiento. Por otro lado, se analizó la capacidad de migración in vitro de las células infundidas, y se halló una correlación positiva entre la potenciación de la fracción de eyección basal y distintos indicadores de migración (% de migración basal:  $r: 0.73$ ,  $p < 0.05$ , % de migración a VEGF:  $r: 0.68$   $p < 0.05$ ).

### 1.3.4 Tratamiento regenerativo en la miocardiopatía dilatada idiopática

La mejora de la función ventricular en pacientes con infarto de miocardio tras la administración intracoronaria de células madre derivadas de la médula ósea ha sido demostrada, tanto en nuestros estudios como en otros publicados en la literatura. Estos resultados obtenidos invitan a pensar que este tratamiento regenerativo, podría ser beneficioso en pacientes con miocardiopatía dilatada de origen idiopático.

En el estudio ABCD se incluyeron 85 pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática y fracción de eyección < 40%, los cuales se aleatorizaron a un grupo control y un grupo de estudio a los que se les infundió células mononucleares de médula ósea ocluyendo previamente el seno coronario; dos tercios se infundieron en arteria coronaria izquierda y el tercio restante en la arteria coronaria derecha, con un período de seguimiento de  $28 \pm 9$  meses. Se objetivó una mejoría de la clase funcional y calidad de vida, así como de la fracción de eyección, que aumentó un 5,9% en el grupo tratado con terapia celular, coincidiendo con una reducción del volumen telesistólico, sin apreciarse cambios en el volumen telediastólico, lo que sugiere que las células madre no causan ningún cambio en el proceso de remodelado, sino que mejoran la función de los miocitos. Con respecto a la mortalidad, no hubo diferencias significativas en ambos grupos. Este estudio estableció la seguridad y la eficacia a largo plazo de esta terapia en la miocardiopatía dilatada idiopática<sup>94</sup>.

Los resultados de otros estudios similares, sugieren un papel beneficioso de la terapia con células madre en la MCD idiopática<sup>95-97</sup>. Kalil et al.<sup>95</sup> mostró que la infusión intramiocárdica de células madre de médula ósea, se traducía en una mejoría en la clase

funcional, lo que suponía una reducción de la sintomatología y ganancia en la calidad de vida de los pacientes, sin cambios en la función ventricular izquierda. Wang et al.<sup>96</sup> también encontraron resultados similares después de la infusión intracoronaria de células madre mesenquimales de médula ósea autóloga. Kaparthy et al.<sup>97</sup> mostraron mejora en el estado funcional y la función ventricular izquierda después de la administración intracoronaria de células mononucleares autólogas de médula ósea.

Fischer et al.<sup>98</sup> han publicado recientemente sus resultados en una serie de 33 pacientes con miocardiopatía dilatada no isquémica y fracción de eyección < 40% determinada por ecocardiografía, a los que se infundió intracoronariamente células progenitoras derivadas de médula ósea, (21 pacientes en arteria descendente anterior (DA), en un paciente en arteria circunfleja (Cx) y en 11 pacientes se infundió 50% en DA y 50% en Cx), observándose una mejoría en la fracción de eyección en torno al  $3,2 \pm 4,1\%$ , el volumen telesistólico se redujo de forma significativa, no así el telediastólico, que no sufrió variaciones. También se describe una reducción en los valores del pro-BNP, lo que sugiere un efecto beneficioso sobre el remodelado ventricular izquierdo.

### 1.4 Perspectivas de futuro

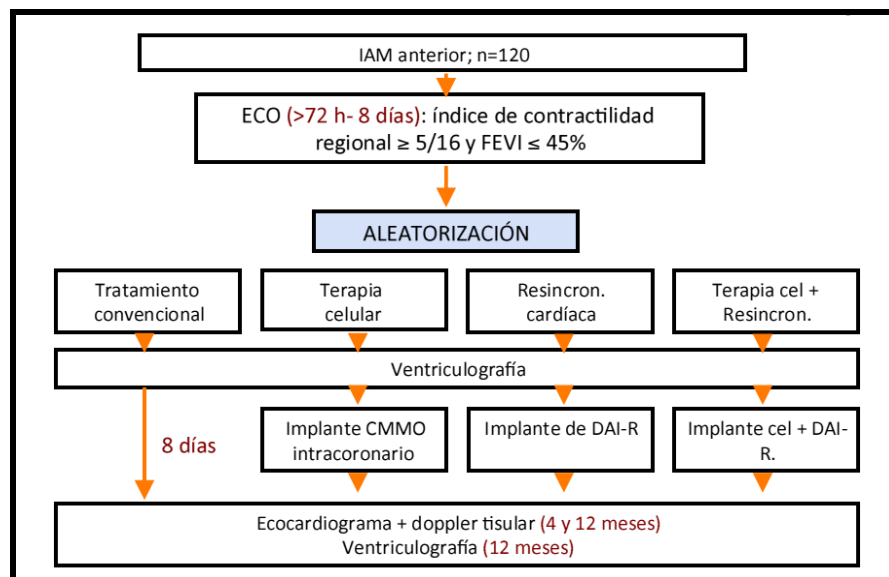
El campo de la terapia celular y regenerativa, si bien se encuentra todavía en su nacimiento, ha progresado de forma muy rápida. No hace mucho, el corazón era considerado como algo estático; un órgano sin capacidad regenerativa. Con el estudio de las células madre y la terapia celular en cardiología, hemos aprendido una serie de lecciones muy valiosas. Los ensayos con mioblastos esqueléticos, han advertido del potencial arritmogénico y las limitaciones de determinados tipos celulares para integrarse con las células nativas, aún sin ser capaces de acoplarse eléctricamente con los miocitos. La terapia con células mononucleares de médula ósea ha demostrado que tiene un gran perfil de seguridad, así como beneficio en la mejoría de la función ventricular izquierda. Los ensayos en curso están afinando detalles del tratamiento.

El estudio de las células madre nativas cardiacas presenta una perspectiva atractiva para nuevos estudios en terapia celular cardiaca.

#### 1.4.1 Cardiopatía isquémica

Con respecto a la **cardiopatía isquémica** y terapia celular, en España se está desarrollando un nuevo estudio multicéntrico y aleatorizado, el **TECAM-Pacing** en pacientes que han sufrido un infarto agudo de miocardio de localización anterior los ocho días previos, a los que se les realiza tratamiento coronario percutáneo en las primeras 24 horas desde el

inicio del dolor o bien trombolisis en las primeras 12 horas seguida de intervención coronaria percutánea en las 24 horas siguientes a la trombolisis, en los que la duración del QRS es inferior a 130 mseg en todos los electrocardiogramas tras el infarto, con una FEVI < 45% y evidencia de alteraciones de la contractilidad en al menos cinco segmentos de los 16 posibles, determinadas por ecocardiografía después de 72 horas y siempre antes de ocho días desde el inicio del infarto, los cuales serán aleatorizados en cuatro grupos de tratamiento: tratamiento convencional, implante de células mononucleares de médula ósea, implante de resincronizador cardiaco o tratamiento combinado de terapia celular y TRC.



**Figura 6.- Protocolo de estudio TECAM-Pacing**



## Introducción

---

Los *objetivos principales* de este estudio son:

- 1) Determinar la seguridad y factibilidad del trasplante intracoronario de células madre de médula ósea, de la estimulación del ventrículo izquierdo y de ambas combinadas, en pacientes con IAM y alto riesgo de un remodelado desfavorable postinfarto.
- 2) Evaluar la eficacia en la prevención del remodelado ventricular desfavorable de las dos terapias y del tratamiento combinado de ambas, en comparación con un grupo de tratamiento estándar.

Los *objetivos secundarios* de este estudio son:

- 1) Estudiar el impacto de la terapia celular y/o de la estimulación ventricular en la función ventricular mediante parámetros ecocardiográficos
- 2) Definir marcadores bioquímicos que identifiquen aquellos pacientes susceptibles de padecer un remodelado ventricular desfavorable y como consecuencia insuficiencia cardíaca e identificar a aquellos pacientes que puedan responder a este tipo de terapias.

Además a nivel mundial, todavía en fase de reclutamiento, se está preparando el **estudio BAMI**, estudio internacional, multicéntrico, en el que se aleatorizarán a 3000 pacientes, con el objetivo de demostrar que la infusión intracoronaria de células mononucleares autólogas de médula ósea es seguro y reduce la mortalidad por cualquier causa en pacientes con FEVI

≤45% después de la reperfusión exitosa de IAM en comparación con un grupo control de pacientes sometidos a tratamiento médico estándar.

### 1.4.2 Ingeniería de Tejidos. Corazón Bioartificial

La **ingeniería tisular cardiaca** es una novedosa y compleja tecnología basada en el uso de combinaciones de células con capacidad regenerativa, materiales biológicos y/o sintéticos, factores de crecimiento, diferenciación y proangiogénicos y sistemas de registro o monitorización online para inducir la regeneración de un órgano o tejido dañado. Los principales objetivos de la ingeniería tisular cardiaca consisten en generar matrices celulares, establecer acoplamiento celular electromecánico, avalar una función contráctil estable y una vascularización funcional<sup>99</sup>.

El corazón tiene unas propiedades funcionales dinámicas que requieren de una arquitectura tisular sofisticada con componentes celulares y extracelulares especializados. Una de las características clave para actuar como motor circulatorio y satisfacer las demandas variables durante el reposo y el ejercicio reside en la arquitectura asimétrica de la banda miocárdica helicoidal. Recientemente se ha descrito una participación más significativa de la matriz extracelular en los aspectos electromecánicos de lo que previamente se suponía. El tejido cardiaco artificial ideal debe reproducir estas propiedades estructurales, mecánicas y

## Introducción

---

electrofisiológicas óptimas para mantener viables las células trasplantadas, además de estimular la vasculogénesis en el propio tejido implantado. Así, el uso de materiales poliméricos naturales o sintéticos y de matrices biológicas, aplicados directamente sobre el área infartada o bien utilizados como matriz de soporte, constituye una alternativa a la terapia celular. El uso de una matriz, no necesariamente de origen biológico pero sí biocompatible, permite que las células administradas dispongan de una estructura de soporte estable que facilita una correcta localización y retención cerca del tejido que requiere de su efecto terapéutico. La estructura de dichas matrices debe cumplir ciertos requisitos como el mantenimiento de un flujo permanente de nutrientes y oxígeno entre las células dispuestas en su interior y el microambiente que las rodea, y facilitar una migración eficaz y la supervivencia dentro del tejido isquémico. Además, la matriz ideal debería ser biodegradable sin producir ningún producto tóxico, para poder ser finalmente reemplazada por nuevo tejido viable. Algunos de los abordajes que se han estudiado hasta la fecha (**figura 7**) son:

- *Constructos de monocapas celulares.* Éstos se adhieren sobre la zona isquémica para favorecer la implantación intramiocárdica de las células que conforman la monocapa. Se han reportado la formación de nuevos vasos sanguíneos y una mejoría funcional mediante la implantación de varias monocapas juntas de células mesenquimales de origen adiposo en el modelo de infarto de miocardio crónico murino. A pesar de los beneficios observados dicha estrategia aún no puede trasladarse al corazón humano.
- *Inyección intramiocárdica de células en hidrogel.* Consiste en el desarrollo de distintos tipos de hidrogeles naturales como Matrigel®(laminina, colágeno tipo IV y heparán sulfato), colágeno o fibrina, en los que se embebe la población celular para su

posterior inyección intramiocárdica. Aunque el efecto del hidrogel sobre la retención celular ha sido positivo, la presión de inyección necesaria para su administración es demasiado elevada y provoca una alta mortalidad celular que disminuye notablemente sus posibles efectos terapéuticos. Alternativamente se han desarrollado hidrogeles sintéticos que minimizan dichos inconvenientes, pero su potencial citotóxico está aún bajo estudio. Un método alternativo es el uso de hidrogeles híbridos que aportarían las ventajas de ambos.

- *Formación de tejido ex vivo de células en hidrogel.* Con el fin de resolver los inconvenientes que generan las inyecciones intramiocárdicas de hidrogeles, se han estudiado una alternativa basada en la creación de nuevo tejido ex vivo a partir de células con potencial cardiovascular previamente incorporadas dentro del hidrogel.

El estudio clínico MAGNUM (Myocardial Assistance by Grafting a New Bioartificial Upgraded Myocardium) ha utilizado una matriz de colágeno tipo I de dimensiones suficientes para cubrir completamente la cicatriz miocárdica. Este ensayo comparativo entre la cardiomioplastia aislada y la combinación de cardiomioplastia con ingeniería tisular concluye que esta nueva alternativa ofrece mejores resultados en cuanto a recuperación de función y el remodelado ventricular<sup>100</sup>. Sin embargo, la similitud de los tejidos cardiacos artificiales testados con la matriz extracelular cardiaca no es perfecta y las células implantadas no colonizan más que la superficie o unos pocos micrómetros de espesor. Recientemente, se ha creado un consorcio europeo denominado RECATABI (REgeneration of CARDiac Tissue Assisted by Bioactive Implants)<sup>101</sup> para el desarrollo de una plataforma de bioingeniería cardiaca donde se

## Introducción

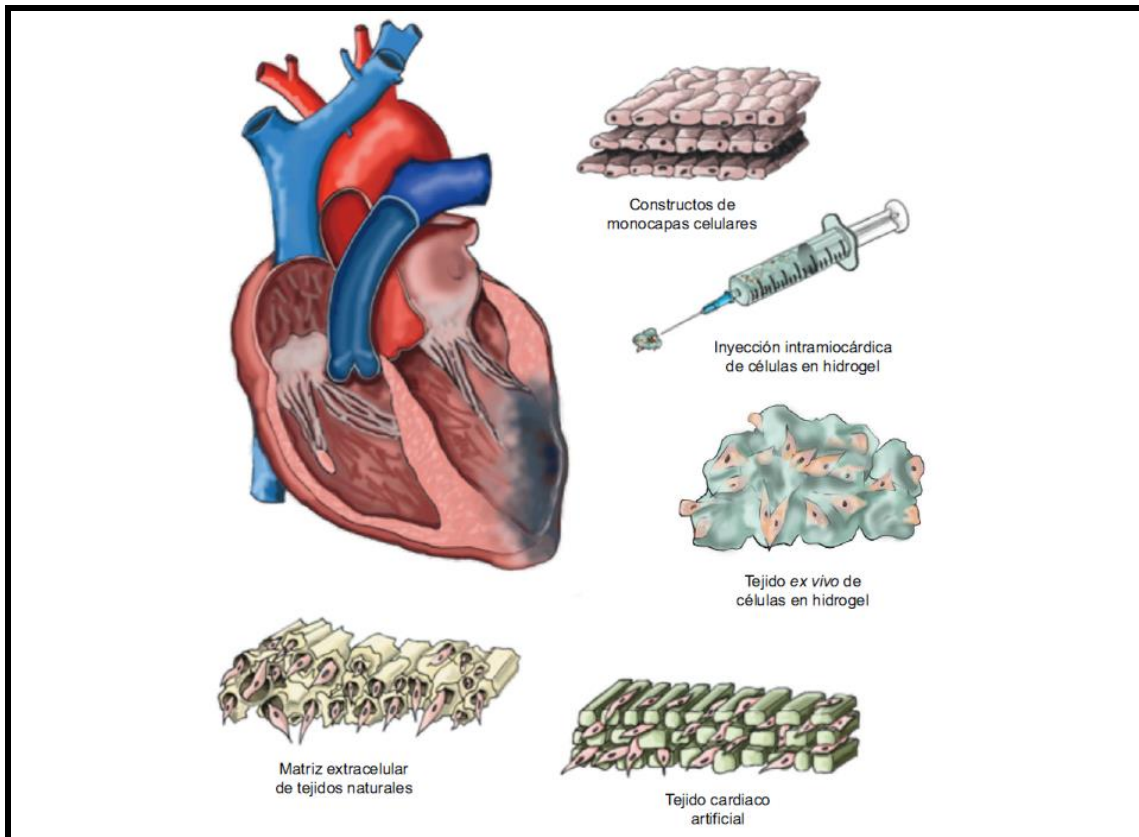
---

combinan biomateriales innovadores para mejorar la administración, supervivencia, migración y proliferación de las células implantadas. Los resultados preliminares muestran cierto grado de diferenciación cardiomiogénica de las células implantadas y conexiones vasculares entre los constructos y el miocardio adyacente.

- *Matriz extracelular derivada de tejidos naturales.* La matriz extracelular está compuesta por proteínas funcionales y estructurales como colágeno, elastina, laminina, fibronectina, proteoglicanos y muchas otras glucoproteínas, combinadas y organizadas espacialmente entre sí según cada tipo de tejido. Se conoce que participa en múltiples procesos y respuestas celulares, incluyendo la proliferación, diferenciación y migración. Estas propiedades le otorgan atractivo potencial como estructura de soporte en técnicas de ingeniería tisular cardíaca para implantar células regenerativas que sustituyan al miocardio dañado. Además existe la posibilidad de que esta matriz extracelular implantada pueda sustituir la del tejido dañado, contribuyendo de manera más eficaz a su regeneración. Se ha conseguido aislar láminas de matriz extracelular a partir de una gran variedad de tejidos incluyendo válvulas cardíacas y vasos sanguíneos. Para su correcta aplicación, las láminas de matriz extracelular deben ser convenientemente separadas del tejido nativo, descelularizadas y, a menudo, desinfectadas, liofilizadas y esterilizadas. Cabe considerar que este complejo procesado puede alterar la integridad y la arquitectura de la matriz. El uso de tejido animal como fuente de obtención, particularmente de tejido porcino, resuelve la escasez crítica de tejido humano. El protocolo ideal de descelularización de matrices

naturales es aquel capaz de eliminar selectivamente los antígenos alogénicos y xenogénicos, así como todo el contenido celular y nuclear del tejido preservando su composición, propiedades fisiológicas, integridad mecánica de la matriz extracelular y estructura vascular. Este proceso combina tratamientos físicos, químicos y enzimáticos específicos, según el tipo de tejido que se va a tratar. Numerosos estudios han demostrado que la implantación de matriz extracelular facilita el remodelado de distintos tipos de tejidos, tanto en modelos animales como en el ámbito clínico. Experimentalmente, en distintos modelos animales se ha reportado la colonización de las matrices extracelulares implantadas por células tanto de linaje cardiomiogénico como endotelial evitándose así el proceso de remodelado ventricular. Sin embargo, cuando se trata de una matriz extracelular de origen miocárdico, los resultados ya implican una mejoría en la función cardíaca con presencia de cardiomiocitos en la región del implante. Publicaciones recientes han demostrado que el uso de matrices extracelulares miocárdicas con la preservación de su arquitectura tridimensional es una alternativa clave para facilitar el soporte y la diferenciación celular necesarios para favorecer el proceso de regeneración cardíaca.

## Introducción

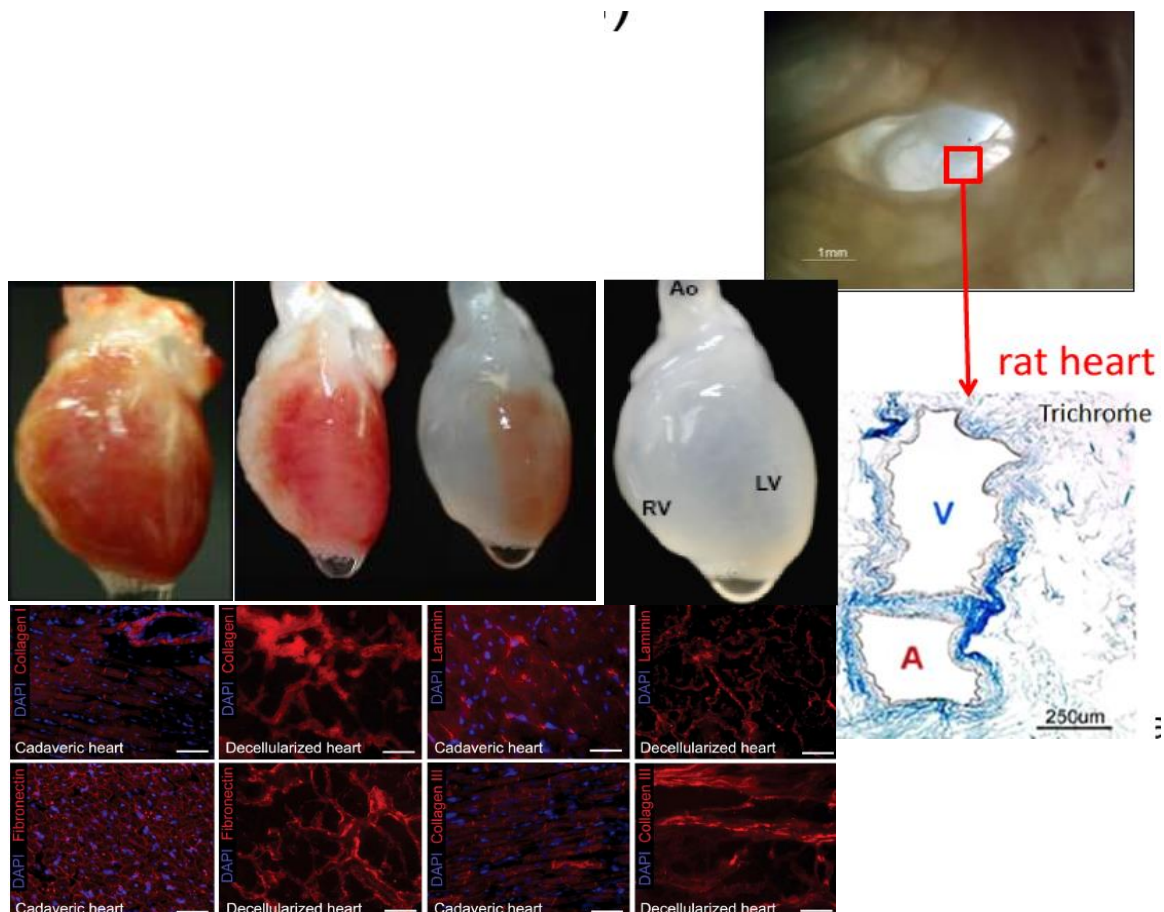


**Figura 7.- Ingeniería tisular cardíaca. Dibujos de los diferentes abordajes**

Un paso más según algunos estudios pioneros realizados en animales, sería generar corazones bioartificiales de novo, descelularizándolos y preservando sus estructuras de soporte para repoblarlos con un nuevo tejido muscular contráctil y vascular. Este nuevo abordaje comportaría finalmente el trasplante del corazón “reconstruido” restableciendo la función cardíaca del receptor.

Los estudios de descelularización con matriz extracelular anteriormente comentados constituyen la prueba de concepto para la obtención de corazones descelularizados. Hasta la

fecha, los procesos de descelularización por inmersión directa han sido suficientes para generar matrices de soporte a partir de distintos tejidos cardiovasculares, incluyendo la pared vascular, el pericardio y las valvas valvulares. En cambio, para poder descelularizar un corazón entero, se ha demostrado que la perfusión coronaria con detergentes es el método más eficaz. Así, en 2008, se consiguió descelularizar corazones cadavéricos de ratas, obteniendo una compleja matriz extracelular cardiaca con el árbol vascular preservado, válvulas competentes y la geometría intacta de las aurículas y los ventrículos. **(Figura 8)**

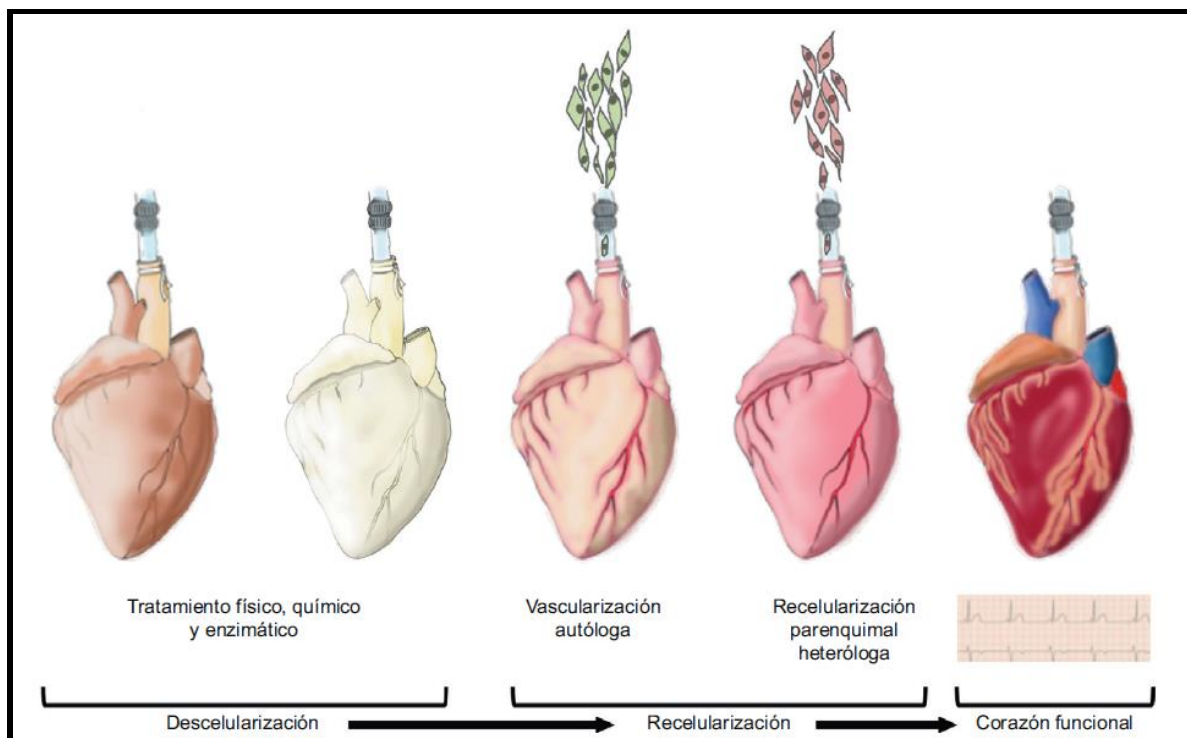


**Figura 8.-** Imágenes de los diferentes pasos de decelularización en corazón de rata donde se objetiva que conserva su geometría característica. Inmunoflorescencia en tejido cardiaco de corazones de cadáver y decelulados, sin observarse en estos últimos núcleos celulares. LV: Ventrículo izquierdo. RV: Ventrículo derecho. Ao: Aorta



## Introducción

Posteriormente, se recelularizaron estos constructos con células endoteliales (vascularización autóloga) y células cardíacas neonatales (recelularización heteróloga parenquimal) mediante perfusión coronaria en un biorreactor simulando la fisiología cardíaca y favoreciendo la maduración del órgano (**figura 9**). Tras 8 días de incubación fisiológica y estimulación eléctrica se detectaron contracciones macroscópicas con una función de bomba equivalente al 2% del corazón adulto o al 25% de la función cardíaca de un feto de 16 semanas<sup>102</sup>.



**Figura 9.- Neorganogénesis: corazón bioartificial. Esquema gráfico de los diferentes pasos de la descelularización y recelularización de un corazón.** Inicialmente la descelularización física, química y enzimática cuyo objetivo es la preservación de la matriz extracelular cardíaca y del árbol vascular. A continuación se induce la vascularización autóloga seguida de la recelularización parenquimal heteróloga para finalmente, generar un nuevo corazón funcional.

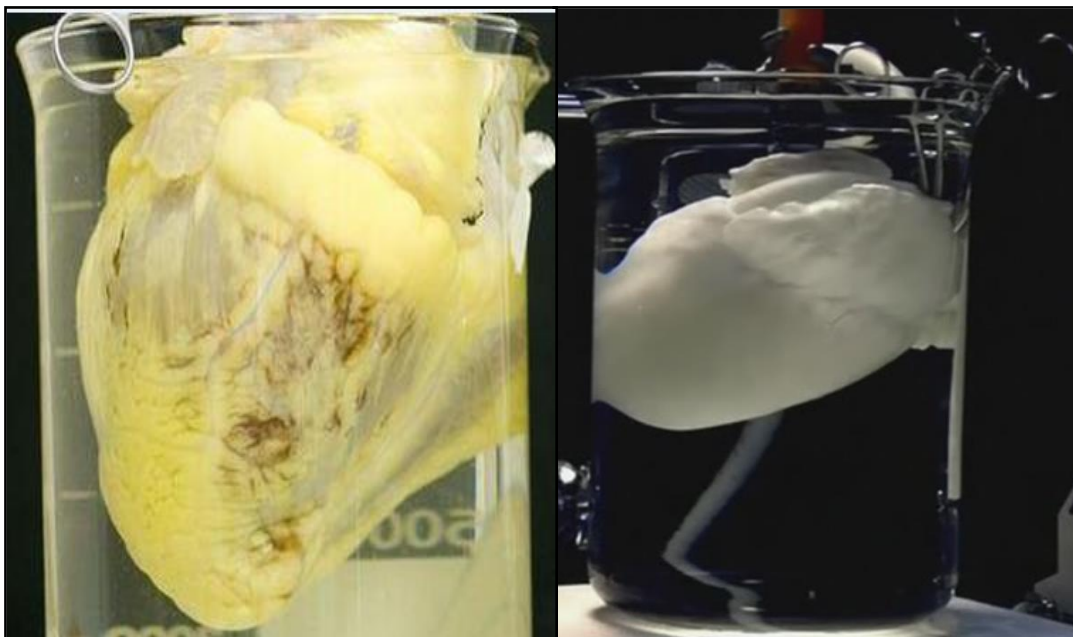
Estudios más recientes han reportado la descelularización de corazones porcinos como modelo escalable al humano. Un aspecto importante que hay que considerar en la aplicación de órganos enteros o matrices bioartificiales, es la necesidad de obtener una correcta vascularización sin la cual la viabilidad del constructo pueda verse comprometida. Este problema resulta especialmente crítico cuando el espesor de la matriz es superior a la barrera de difusión (unos 100  $\mu\text{m}$ ), donde el suministro de oxígeno y nutrientes queda limitado y se acumulan subproductos celulares de desecho citotóxicos. Con la descelularización de corazones enteros se ha conseguido mimetizar el tejido miocárdico vascularizado y repoblarlo con células a través de estructuras vasculares con cierto grado de preservación. A pesar de su éxito, esta estrategia puede verse limitada con respecto a las tecnologías disponibles para la expansión de células a gran escala, particularmente de cardiomiocitos, necesaria para la repoblación de todo el órgano. Todavía queda camino por recorrer hasta poder disponer de un corazón bioartificial para su uso en humanos. Sin embargo, un grupo de investigación español pionero en este campo está llevando a cabo, como primera prueba del concepto, el desarrollo de un corazón bioartificial mediante la decelularización de corazones humanos y su posterior recelularización con células mesenquimales humanas y cardiomiocitos de origen murino.

La iniciativa se enmarca en el **proyecto SABIO** (Scaffolds And **BI**oartificial **O**rgans for transplantation), en el que intervienen el Gregorio Marañón, el Ministerio español de Ciencia e Innovación, la Universidad estadounidense de Minnesota y la Organización Nacional (española) de Trasplantes (ONT), que proporciona los órganos no aprovechables para trasplantes -un 40% del total de donaciones- que servirán de matrices.

## Introducción

---

Han demostrado que la decelularización del corazón humano es factible, permitiendo una preservación completa de su estructura macro y microscópica, con conductos vasculares perfundibles y válvulas morfológica y funcionalmente intactas. Estos hallazgos abren el camino de la ingeniería de órganos humanos complejos (estructuras bioartificiales trasplantables). **(Figura 10)**



**Figura 10.-** Imágenes de corazón humano previo a la decelularización y tras ella.

A día de hoy, el gran inconveniente en la mayoría de estudios de ingeniería tisular reside en la dificultad para extrapolar el modelo animal de rata/ratón al modelo porcino y, consecuentemente al ámbito clínico.

Gálvez Montón et al <sup>99</sup> han diseñado una nueva técnica quirúrgica basada en la transposición de un pedículo adiposo autólogo de origen pericárdico sobre la superficie miocárdica isquémica, con resultados muy prometedores en el modelo preclínico porcino de infarto de miocardio, mejorando la fracción de eyección y volúmenes cardiacos, motivo por el cual actualmente están reclutando pacientes para un ensayo clínico prospectivo y aleatorizado para valorar su efectividad y seguridad.

Hay otros dos ensayos clínicos vigentes basados en la inyección intramiocárdica de lagunato o la administración intracoronaria de lagunato sódico combinado con glucosado cálcico con el fin de generar una nueva matriz extracelular en el miocardio para que los progenitores cardiacos residentes en él migren y repueblen la cicatriz cardiaca.

El futuro en terapia celular parece prometedor y si finalmente, se consigue la regeneración cardiovascular, los beneficios serán enormes para los millones de personas en todo el mundo que viven con insuficiencia cardiaca.

### 1.4.3 Terapia celular en la población pediátrica

#### - *Terapia celular en la población pediátrica*

Se ha demostrado el enorme beneficio de la inyección intracoronaria de células madre autólogas en pacientes adultos, pero en niños la experiencia aún es limitada.

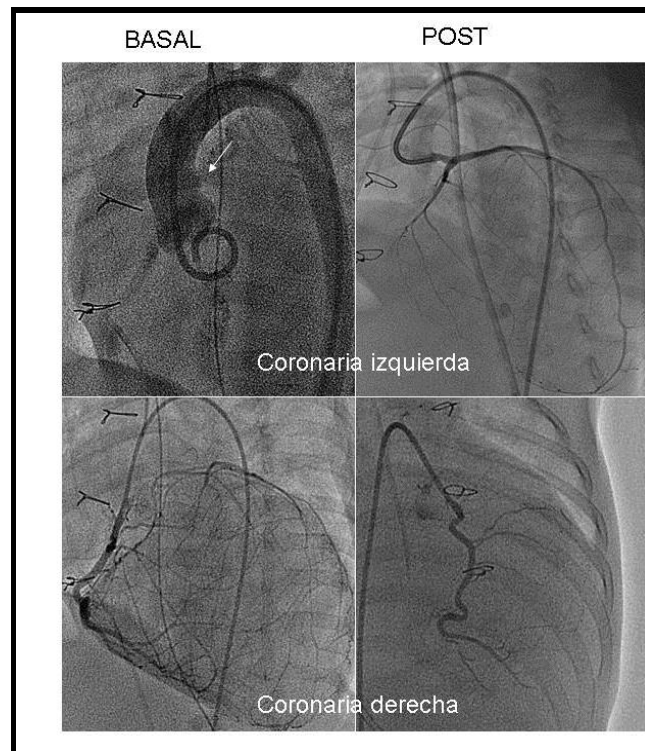
A pesar del tremendo progreso que ha experimentado en los últimos años el tratamiento médico y quirúrgico de las cardiopatías congénitas, para muchos niños con miocardiopatía dilatada y disfunción ventricular, el trasplante cardiaco es la única opción. Al menos la mitad de ellos o reciben un trasplante o mueren en los siguientes dos años; sin embargo, la infusión de células madre comienza a ser una opción terapéutica prometedora.

Lacis et al. reportan el caso de un lactante de cuatro meses con MCD en estado crítico, en el que tras la infusión de células madre, aumentó la fracción de eyección desde el 20% al 41% a los cuatro meses del seguimiento<sup>103</sup>. Rupp et al. trataron desde 2006 a 2010 nueve niños con MCD severamente enfermos, sin evidenciarse complicaciones durante el procedimiento, objetivándose mejoría tanto en la fracción de eyección como en la clase funcional, asociada a una disminución en los niveles séricos de BNP<sup>104</sup>.

En nuestro hospital también tuvimos un ejemplo del beneficio de la terapia celular en un lactante con MCD de origen isquémico. Se trataba de un lactante de 7 meses, diagnosticado a los 3 meses de edad de coronaria anómala. En esta cardiopatía congénita la coronaria izquierda nace de la arteria pulmonar, por lo que la perfusión coronaria es menor ya que sale de un circuito de baja presión y además lo hace con sangre no oxigenada, lo que da

lugar a infartos masivos. El diagnóstico de la cardiopatía fue tardío (normalmente la clínica aparece en las primeras semanas de vida), por lo que a los 3 meses presentaba una disfunción ventricular severa y una marcada dilatación del ventrículo izquierdo. Tras el diagnóstico fue sometido a una intervención quirúrgica en la que se desinsertó la coronaria izquierda de la arteria pulmonar y se insertó en la aorta. A pesar de la reparación quirúrgica tuvo una evolución clínica muy tórpida, persistiendo en insuficiencia cardiaca, sin ganancia de peso y con múltiples infecciones respiratorias. Dado que la mejoría fue nula y que persistía con disfunción ventricular severa (FE en torno al 13%) fue remitido de su hospital de referencia para ser incluido en la lista de trasplante. Ante la sospecha de que se pudiera haber acodado la coronaria izquierda tras la cirugía se decidió realizar un cateterismo cardiaco. El estudio confirmó la sospecha, objetivándose una oclusión completa de la coronaria izquierda que se rellenaba en su totalidad a través de circulación colateral desde la coronaria derecha (**Figura 11**). En el mismo procedimiento se consiguió avanzar una guía de 0.014 pulgadas distal al acodamiento de la arteria, y posteriormente dilatar el tronco de la coronaria izquierda e implantar un stent farmacoactivo de 2.25x12, quedando de este modo la arteria permeable (**Figura 11**).

Se inició entonces un régimen antitrombótico con doble antiagregación y heparina de bajo peso molecular ajustado al peso del lactante.



**Figura 11.- Coronariografía basal y postratamiento**

Tras el procedimiento la evolución fue favorable, y a los 3 días el electrocardiograma mostraba una disminución significativa del  $\Sigma Q$  y una normalización de las alteraciones del segmento ST-Onda T (**Figura 12**). Sin embargo a las dos semanas comenzó con un sangrado abdominal, por lo que hubo que suspender la heparina de bajo peso molecular. Esto determinó que se produjera una oclusión trombótica del stent cinco días después, comenzando con un episodio de insuficiencia cardíaca aguda que precisó intubación orotraqueal, elevación del segmento ST en precordiales y elevación de marcadores de necrosis miocárdica. Se realizó un nuevo cateterismo en el que se decidió optimizar el stent del tronco con un balón de 3 mm de diámetro, reintroduciéndose entonces la heparina.

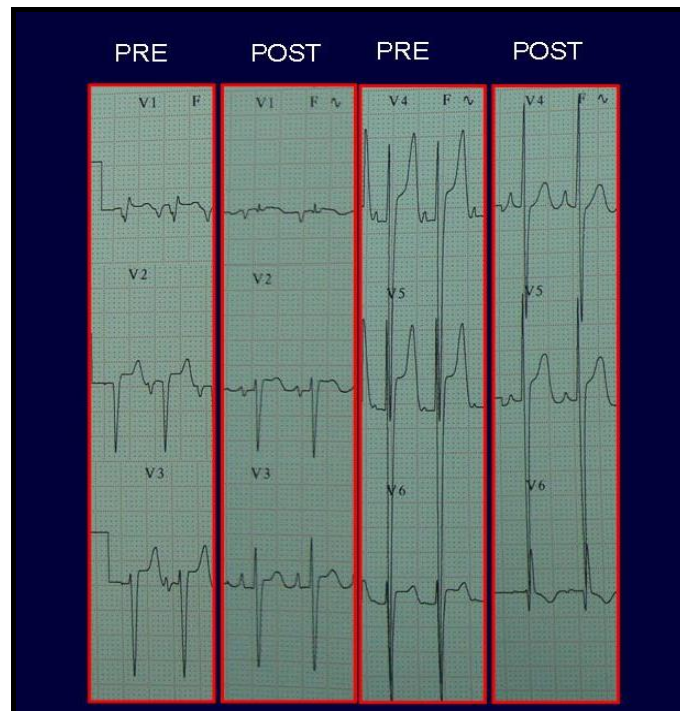


Figura 12: cambios producidos en el electrocardiograma tras recuperar la coronaria izquierda

Dado el nuevo infarto producido por la oclusión del stent y la persistencia de la disfunción ventricular, y basándonos en los buenos resultados obtenidos en adultos, se decidió de forma empírica administrar tratamiento regenerativo. Para ello se obtuvieron 25 c.c de aspirado medular de la cresta iliaca y se procesaron para obtener 100 millones de células mononucleares, que fueron resuspendidas en una jeringa de 5 c.c. para ser infundidas en el tronco coronario izquierdo en un tercer cateterismo (**Figura 13**).





**Figura 13.- Obtención de células madre**

A partir de aquí el paciente tuvo una mejoría clínica sorprendente. Al mes fue dado de alta, y comenzó a ganar peso. Los cambios electrocardiográficos se normalizaron, y las ecocardiografías seriadas en el seguimiento mostraron un incremento paulatino de la FE, llegando a ser del 45% en el último control.

Con este ejemplo mostramos el potencial de la terapia regenerativa y vislumbramos un horizonte esperanzador, en el que es posible que el abanico de enfermedades cardiovasculares que podrían beneficiarse de esta terapia aumente en los próximos años. Sin embargo, sería conveniente la realización de estudios clínicos con mayor número de pacientes pediátricos, que confirmaran la eficacia de dicho tratamiento.



## **2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



## 2.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### 2.1.- JUSTIFICACIÓN

Durante los últimos años estamos asistiendo a una auténtica explosión en la aplicación de la biología celular a la terapia de diversas enfermedades al producirse importantes avances en el conocimiento de las llamadas “stem cells”, células troncales o células madre.

El concepto de “Medicina Regenerativa”, que utiliza las propias células madre y factores de crecimiento de un organismo para reparar un órgano o sistema dañado, está comenzando a ser una realidad próxima. Desde que a finales de 1998 un grupo de científicos aislaron por primera vez células madre de un organismo adulto<sup>105,106</sup>, diferentes estudios experimentales y clínicos han demostrado la capacidad regenerativa del músculo estriado y del miocárdico. La plasticidad de las células madre de un adulto es mucho mayor de la esperada, lo que permitiría teóricamente generar linajes diferentes de las del órgano en que residen. Las células madre hematopoyéticas muestran capacidad para regenerar tanto miocitos como vasos coronarios (angiogénesis) y la inyección de estas células en el infarto mejora la función ventricular<sup>107,108</sup>.

Como se ha expuesto, determinados estudios en humanos han mostrado que el miocardio dañado por un infarto también puede regenerarse mediante la inyección quirúrgica, la infusión intracoronaria o la inyección transendocárdica de células madre previamente obtenidas de la propia médula ósea.

## **Justificación y Objetivos**

---

Sin embargo, si bien el papel de la terapia celular en el tratamiento de la cardiopatía isquémica ha sido ampliamente estudiado, no ocurre igual con otras causas de insuficiencia cardíaca congestiva que siguen constituyendo un motivo importante de mortalidad cardiovascular y que en la actualidad carecen de un tratamiento verdaderamente efectivo con la única salvedad del trasplante cardíaco. Tal es el caso de las miocardiopatías dilatadas de origen no isquémico, que constituyen un grupo de enfermedades primarias del miocardio caracterizadas por una pérdida de cardiomiocitos y un incremento de fibroblastos en el tejido cardíaco y que constituyen una causa importante de insuficiencia cardíaca. Evidentemente, la posibilidad de restaurar los cardiomiocitos a partir de células autólogas de médula ósea podría mejorar la insuficiencia cardíaca y constituiría teóricamente el tratamiento idóneo de una enfermedad que hoy por hoy carece de él.

Otro aspecto importante a considerar es el relativo desconocimiento que aún hoy tenemos respecto a los mecanismos biológicos exactos responsables de la reparación del miocardio mediada por células.

En resumen, al día de hoy contamos con evidencias preliminares suficientes para considerar la inyección intracoronaria de células progenitoras de médula ósea como un tratamiento viable, seguro y beneficioso en pacientes con MCD, si bien el mecanismo biológico de actuación de estas células en el miocardio no es conocido.

Por todo ello, en nuestro grupo se dan una serie de circunstancias favorables para abordar la investigación clínica de todas estas y otras muchas cuestiones con fundado optimismo. En primer lugar existe un amplio desarrollo de los métodos de análisis funcional miocárdico y los factores que influyen en la recuperación funcional tras la reperfusión precoz

en el infarto agudo de miocardio<sup>109-111</sup>. En segundo lugar, el Servicio de Hematología del Hospital Reina Sofía continúa siendo pionero en el aislamiento y cultivo de células madre, así como en el empleo de las mismas y de factores de crecimiento en el manejo de enfermedades que afectan al sistema hematopoyético. Todas estas circunstancias favorables, junto a una determinación de investigar conjuntamente sobre todas aquellas cuestiones que se plantean actualmente sobre la medicina regenerativa en nuestro medio, nos llevan a promover un estudio inicial que resulte ampliable en el futuro

### Modelo escogido:

La metodología angiográfica y hemodinámica para el análisis de los cambios funcionales. Ello nos permite estudiar la reserva contráctil mediante el análisis de la potenciación post-extrasistólica. De igual forma, el cambio observable en la motilidad regional sigue un método reconocido y diseñado para el infarto, como es el método de Sheehan.

### Fuente de células madre:

En la actualidad, son diversas las fuentes de obtención de células madre utilizadas en la terapia regenerativa aplicada al miocardio. Aunque el músculo estriado y el tejido adiposo suponen dos fuentes de fácil acceso, únicamente contienen un tipo de progenitor (mioblastos y células mesenquimales respectivamente). Sin embargo, en la médula ósea, habitan desde la vida embrionaria distintas poblaciones de células madre. De éstas cabe destacar los propios progenitores hematopoyéticos<sup>39</sup>, las células mesenquimales<sup>49</sup>, la side population<sup>50</sup>, las



## **Justificación y Objetivos**

---

células progenitoras adultas multipotentes<sup>50</sup> y los progenitores endoteliales. Nosotros nos decantamos por esta fuente porque creemos que esta diversidad de población puede determinar una regeneración más potente.

## **2.2.- OBJETIVOS**

El objetivo principal de esta tesis es determinar la eficacia y seguridad de la inyección intracoronaria de células progenitoras de médula ósea autóloga en 27 pacientes con miocardiopatía dilatada de origen idiopático con función ventricular deprimida valorando los cambios producidos en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo por métodos angiográficos entre la situación basal y el seguimiento a los 6 meses.

Los objetivos secundarios serían:

- 1) Análisis de los cambios en el grado funcional y en la situación clínica de los pacientes
  
- 2) Análisis de los cambios de la función ventricular izquierda medida por ecocardiografía y angiografía entre la situación basal y al seguimiento (3, 6 y 12 meses)
  
- 3) Investigar los mecanismos celulares básicos subyacentes al proceso de regeneración miocárdica mediante la correlación entre los parámetros hemodinámicos de mejora de la función ventricular y los biológicos correspondientes a la composición y funcionalidad de las células infundidas.

## Justificación y Objetivos

---

4) Analizar los factores clínicos, hemodinámicos y biológicos capaces de influir favorablemente en un mayor grado de recuperación funcional tras tratamiento regenerativo en MCD.

5) Demostrar la factibilidad y seguridad de la inyección intracoronaria de progenitores para regenerar miocardio con aplicación in situ de células madre extraídas de la médula ósea.

6) Diseñar, a la vista de los resultados obtenidos, el protocolo idóneo de aplicación de terapia celular al tratamiento de MCD, tanto en lo relativo a las características ideales del injerto medular como en cuanto a los pacientes más susceptibles de ser beneficiarios del mismo, con el fin de establecer una estrategia definitiva de inclusión de la terapia celular en el tratamiento estándar de la MCD en un futuro cercano si los resultados así lo aconsejan.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3.- MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Pacientes

En este estudio se muestran los hallazgos observados en un grupo de 27 pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática y función ventricular deprimida, a los que se les administró una infusión intracoronaria de células madre tras descartar enfermedad coronaria.

Se estudiaron prospectivamente a 27 pacientes con los siguientes criterios de inclusión:

- 1) Pacientes mayores de 18 años y menores de 80 años
  
- 2) Diagnosticados de miocardiopatía dilatada idiopática establecida mediante clínica, pruebas no invasivas y estudio hemodinámico, con disfunción ventricular, fracción de eyección < 50% y en ritmo sinusal
  
- 3) Sintomáticos a pesar tratamiento médico óptimo, que aceptaron el protocolo y seguimiento establecido

## **Material y Métodos**

---

En cuanto a los criterios de exclusión se desestimaron aquellos pacientes:

- 1) MCD de origen tóxico, enfermedades por depósito o de origen isquémico
- 2) Antecedentes recientes de miocarditis, con el fin de descartar pacientes con una posible evolución favorable de forma espontánea
- 3) Pacientes susceptibles de tratamiento con resincronización cardíaca
- 4) En lista de espera activa de trasplante cardíaco
- 5) Coexistencia de otras enfermedades sistémicas graves, tumores malignos o pre-malignos o cualquier tipo de enfermedad hematológica
- 6) Mujeres embarazadas, en periodo de lactancia o en edad fértil, que no estén usando un método anticonceptivo eficaz
- 7) Que hayan participado previamente en algún ensayo clínico de terapia celular
- 8) Pacientes que estén actualmente participando o hayan finalizado su participación en un ensayo clínico en un periodo inferior a 3 meses

El estudio fue aprobado por el comité ético y de ensayos clínicos de nuestro hospital y por el correspondiente autonómico.

Inicialmente se realizó a todos ellos estudios clínicos (determinación analítica, incluyendo la determinación del péptido natriurético atrial (BNP), electrocardiograma basal, monitorización Holter de 24 horas, determinación del grado funcional de la NYHA), ecocardiograma y ergoespirometría, siendo así preseleccionados para estudio.

Los pacientes recibían de forma concomitante el tratamiento farmacológico idóneo para su patología, según los estándares actuales, por lo que indudablemente es posible que se haya producido alguna mejoría debido al tratamiento farmacológico. Sin embargo, se trata de pacientes con MCD establecida en los que es difícil encontrar mejoras de la función ventricular con los tratamientos habituales en un año de evolución. En cualquier caso, todos los pacientes estaban tratados médicamente de forma similar con IECA o ARA II, en función de su tolerancia, b-bloqueantes, diuréticos, antagonistas aldosterona, ivabradina, digoxina.... El tratamiento médico se mantuvo estable durante todo el ensayo en la mayoría de los pacientes (n=20). A un paciente con dos episodios de agravamiento de su insuficiencia cardíaca, se le aumentó el tratamiento médico. A los seis pacientes restantes, se les redujo el número de fármacos cuando la mejoría de la clase funcional en el seguimiento lo hizo posible.

Por tanto, consideramos que no fue necesario el establecimiento de un grupo control, ya que los resultados de mejoría de la función ventricular en el seguimiento podían ser suficientemente significativos como para demostrar la eficacia de la intervención con terapia celular, sin que en ello pueda influir el tratamiento médico.



## Material y Métodos

---

Tras la preselección, a todos los pacientes se les efectuó un cateterismo cardiaco en el que se estudiaba la función ventricular y se comprobada la ausencia de enfermedad coronaria. Tras registrarse en el estudio y firmar el consentimiento informado, se programó a todos los pacientes para terapia celular.

Todos los pacientes se encontraban clínicamente estables y con medicación óptima al menos 12 meses antes de su inclusión en el estudio. El diagnóstico se realizó con una mediana de 86 meses antes del inicio de la terapia celular.

La edad los pacientes tratados varió desde 31 hasta 74 años (media  $53 \pm 12$ ). Veinte pacientes eran hombres y siete eran mujeres. Tres pacientes habían requerido un desfibrilador automático para prevenir las arritmias letales. Los datos basales quedan resumidos en la **Tabla 2.**

Una vez descartada la presencia de enfermedad coronaria se programó un nuevo cateterismo cardiaco en el que se realizó un estudio de función ventricular y reserva coronaria y se administraron las células madre obtenidas de la médula ósea del paciente la misma mañana. A los 6 meses de seguimiento se realizó un nuevo estudio hemodinámico en condiciones idénticas a las del estudio basal.

Además en este grupo de pacientes se realizó un ecocardiograma, así como una ergoespirometría, determinando el consumo máximo de oxígeno y analizando el umbral de anaerobiosis en cada uno de ellos, y se repitió el estudio a los 3 y 12 meses, comparando los resultados con los basales. De esta forma se podrían analizar los posibles cambios que se produjeran en la capacidad funcional del paciente tras el tratamiento regenerativo.

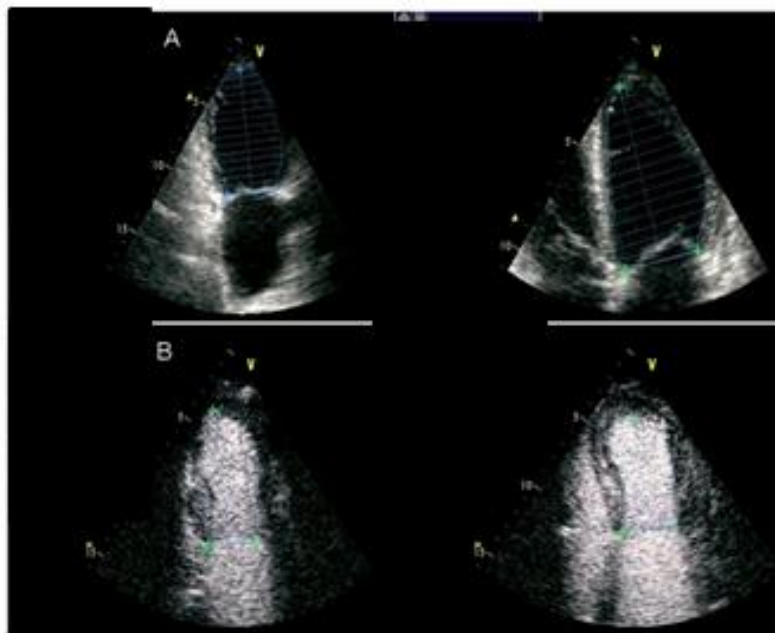
### **3.2 Estudios clínicos**

La evaluación clínica se basa en la clase funcional de la NYHA y se estableció claramente en todas las fases del estudio. Los pacientes en clase funcional I no presentan síntomas atribuibles a enfermedades del corazón, los de la NYHA clase II, III o IV presentan síntomas leves, moderados o graves respectivamente.

Además, la capacidad de ejercicio, fue evaluada mediante el consumo máximo de oxígeno (VO<sub>2</sub>) en ml/kg/min, que se determinó antes del tratamiento, a los 3 meses y un año después. La prueba de esfuerzo se realizó mediante tapete rodante Marquette Case 8000 system (GE Healthcare, Burr Ridge, Illinois, USA), utilizando el protocolo de Naughton, de conformidad con las directrices<sup>112</sup>. El intercambio de gases respiratorios durante el esfuerzo máximo se obtuvo con la estación de pruebas ergoespirometría (Oxycon Pro / Delta, Viasys Healthcare, Hochberg, Alemania). Las mediciones se obtuvieron y se expresaron en valores absolutos y como un porcentaje de los valores teóricos calculados para la edad y el área de superficie corporal. También se registró el tiempo máximo de ejercicio, siendo considerado como otro parámetro funcional.

### 3.3 Estudios ecocardiográficos de la función ventricular

En todas las condiciones (inicial, 3 meses y al año), se efectuaba un estudio ecocardiográfico completo (Philips iE33, Philips Ultrasound, EE.UU), con adquisición digital de imágenes bidimensionales del ventrículo izquierdo de, al menos, 3 ciclos cardiacos en las proyecciones apical de 4 y 2 cámaras, así como paraesternal, a nivel basal, medio y apical. En todos los casos, se optimizaba el sector de exploración y la profundidad del campo para obtener una frecuencia de, al menos, 60 imágenes por segundo y se utilizaron ecopotenciadores inyectados por vía intravenosa para optimizar la definición del borde endocárdico y conseguir una adecuada visualización. Las imágenes grabadas se enviaban a una estación de trabajo para su posterior análisis.



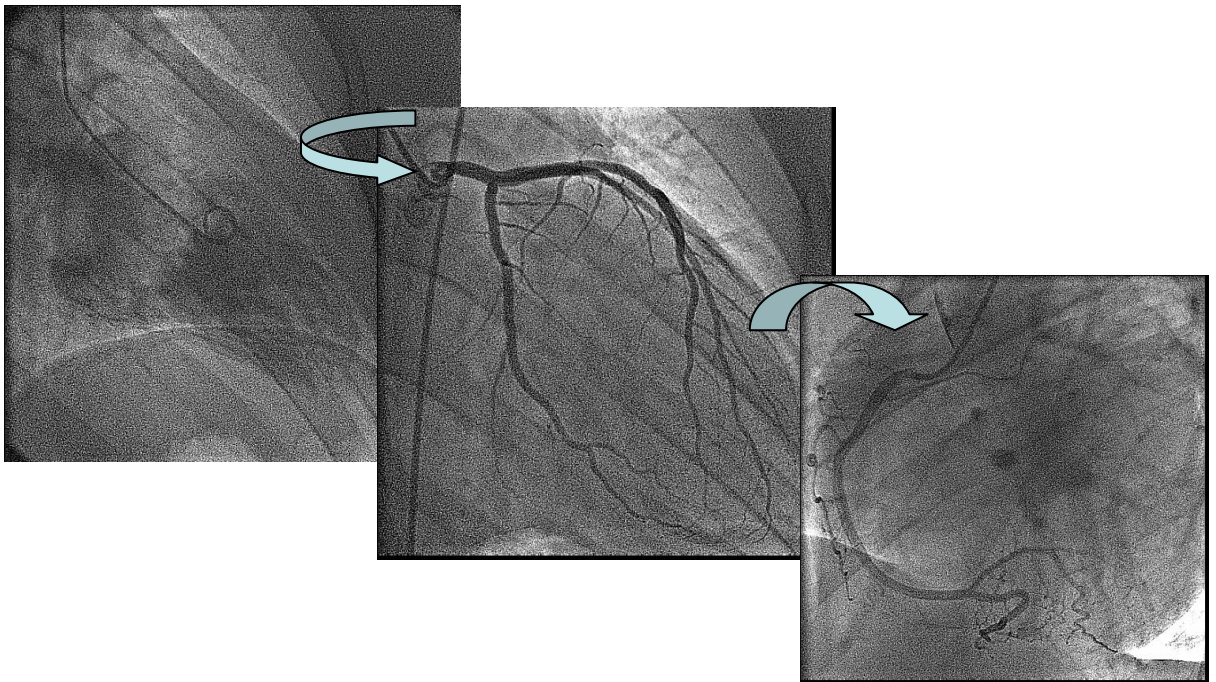
**Figura 14.- Estudio ecocardiográfico en las proyecciones apical de cuatro y dos cámaras. Cálculo de los volúmenes y de la FEVI con ecocardiografía bidimensional sin contraste ecocardiográfico intravenoso (A) y con contraste (B).**

Si existía insuficiencia mitral, ésta se estudiaba mediante doppler color y doppler continuo y su grado se cuantificó desde I a IV. Para definir cada grado de regurgitación mitral, se siguieron las recomendaciones de la Sociedad Americana de Ecocardiografía<sup>113</sup>.

Dos expertos ecocardiografistas, que desconocían la condición de estudio, midieron los volúmenes ventriculares y la fracción de eyección, utilizando el método de Simpson biplanar, y cuantificaron el grado de insuficiencia mitral.

### 3.4. Cateterismo cardiaco diagnóstico y terapéutico

En este estudio se realizaron 3 cateterismos, en el primero de ellos se realizó un estudio hemodinámico izquierdo completo, con fines diagnósticos, para registrar la presión sistémica y la telediástolica, así como la realización de al menos una ventriculografía izquierda y angiografía coronaria para descartar enfermedad coronaria.



Posteriormente se realizó un nuevo cateterismo para la infusión intracoronaria de células.

Después se retiró el introductor femoral y se efectuó el cierre de la punción arterial con un dispositivo Angioseal® de 6 F. A los 6 meses de seguimiento se realizó un nuevo estudio hemodinámico en condiciones idénticas al estudio basal.

### 3.4.1 Estudio de función ventricular izquierda mediante angiografía

El estudio de función ventricular se realizó en la condición basal y a los 6 meses del seguimiento.

En ambas condiciones del estudio practicamos al menos una ventriculografía izquierda en proyección oblicua anterior derecha de 30 grados. La ventriculografía izquierda se realizó con un catéter pigtail de 6 F. Se inyectaron 40-50 ml de contraste no iónico a una velocidad de 18 ml/seg. Durante cada ventriculograma de estudio, se intentó obtener un latido sinusal y otro postextrasistólico<sup>114</sup> para un posterior análisis, con vistas a estudiar la reserva contráctil del ventrículo izquierdo. Los latidos postextrasistólicos se obtuvieron mediante la inducción de latidos prematuros con el propio catéter, una vez obtenido un ciclo cardiaco sinusal bien opacificado. En todas las ocasiones, el intervalo R-R' del latido prematuro inducido y el R'-R de la pausa post extrasistólica fueron registrados y medidos.

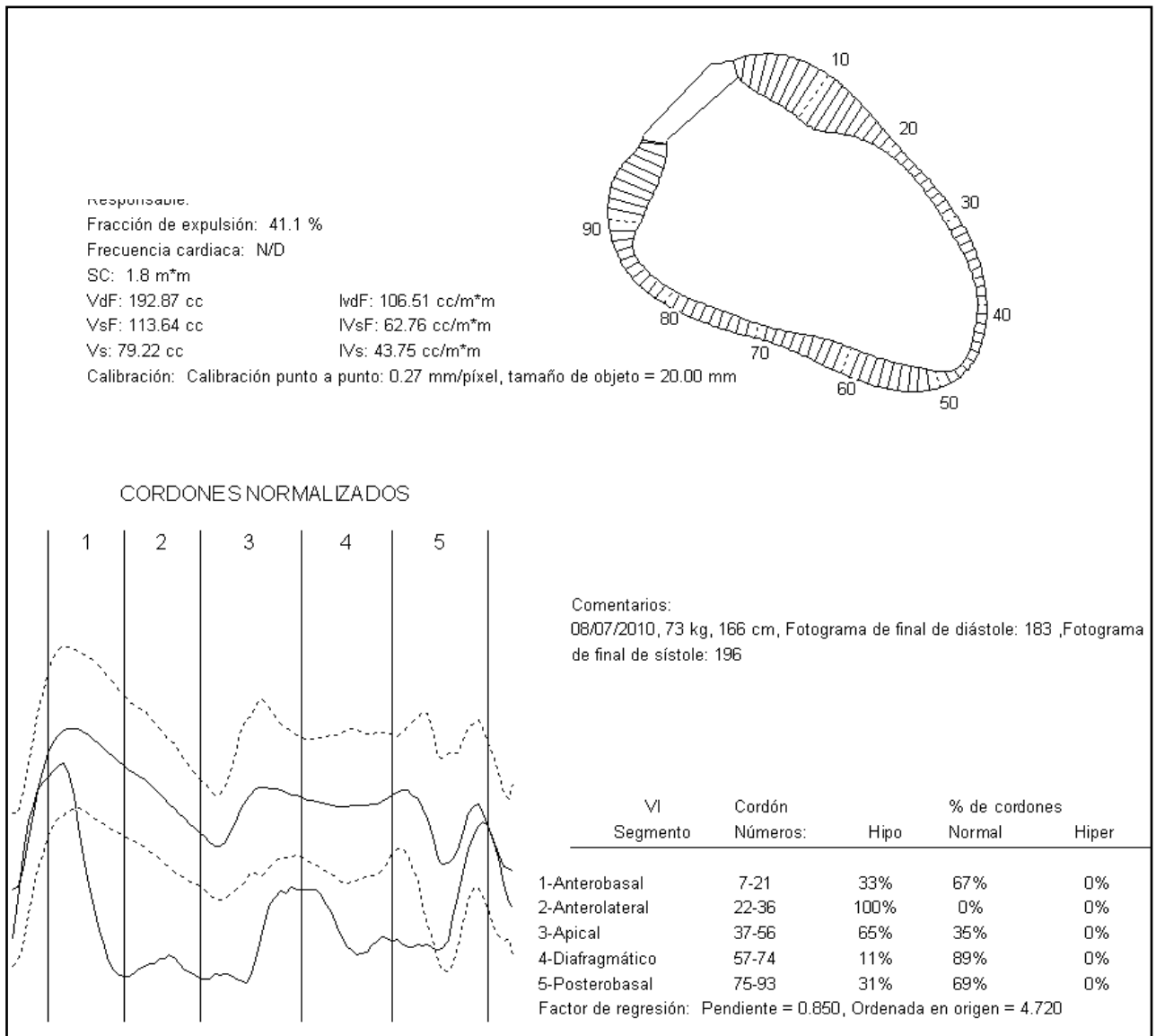
Se evaluó la competencia de la válvula mitral y el grado de insuficiencia cuando estaba presente, clasificando su severidad de I a IV.

Las mediciones y cálculos se realizaron off line en nuestro propio laboratorio por dos angiografistas expertos, desconocedores de las características del estudio, que dibujaron las siluetas telediastólica y telesistólica mediante el sistema CASS. Se calculó la fracción de eyección, los volúmenes ventriculares, y se efectuó un análisis de la motilidad regional de la pared. Se utilizó el método de Sheehan et al<sup>115</sup> para el estudio de asinergia, dividiendo las siluetas superpuestas en 100 radios de acortamiento sistólico de la pared, desde telediástole a telesístole. El segmento de contracción anormal (SCA) fue definido como el porcentaje de

## **Material y Métodos**

---

radios que mostraban aquinesia o disquinesia. El número de radios afectados se definió como la suma de radios aquinéticos, disquinéticos e hipoquinéticos. Así, se observó de forma seriada el comportamiento del miocardio tras el tratamiento, lo que permitió evaluar la posible respuesta. La evolución seriada de la reserva contráctil se valoró mediante el análisis de la potenciación postextrasistólica. La recuperación funcional se definió como la ganancia en la fracción de eyección, la reducción del número de segmentos de contracción anormal y del número de radios afectados entre la situación basal y la del seguimiento.



**Figura 15.- Ejemplo análisis angiográfico donde se dibuja la silueta ventricular telediastólica y telesistólica superpuestas y divididas en 100 segmentos, lo que nos permite saber el volumen telediastólico, volumen telesistólico, fracción de eyección, segmentos de contracción anormal y número de radios afectos.**



### 3.4.2 Estudio vascular: medición de reserva coronaria

Se utilizó el sistema Flow-map® (Cardiometrics; Mountain View, California, Estados Unidos) para medir la velocidad intracoronaria, así como el flujo de reserva coronaria (CFR)<sup>116</sup>. Los estudios de reserva coronaria se realizaron siempre antes de la infusión celular y a los 6 meses de seguimiento. En cada arteria, se introduciría una guía doppler intracoronaria de 0,014 pulgadas, cuya punta se ubica en el tercio proximal de su recorrido epicárdico, registrándose velocidades de flujo de forma continua. El pico de velocidad se registró tanto en situación basal como tras la administración de un bolo intracoronario de 60 µg de adenosina para la arteria coronaria izquierda y 40 µg para la derecha (**figura 16**). La CFR fue calculada como la relación entre la máxima velocidad de flujo tras la inyección de adenosina y la velocidad de flujo basal. La recuperación funcional de la microcirculación fue definida como la ganancia en CFR entre la fase aguda y el seguimiento.

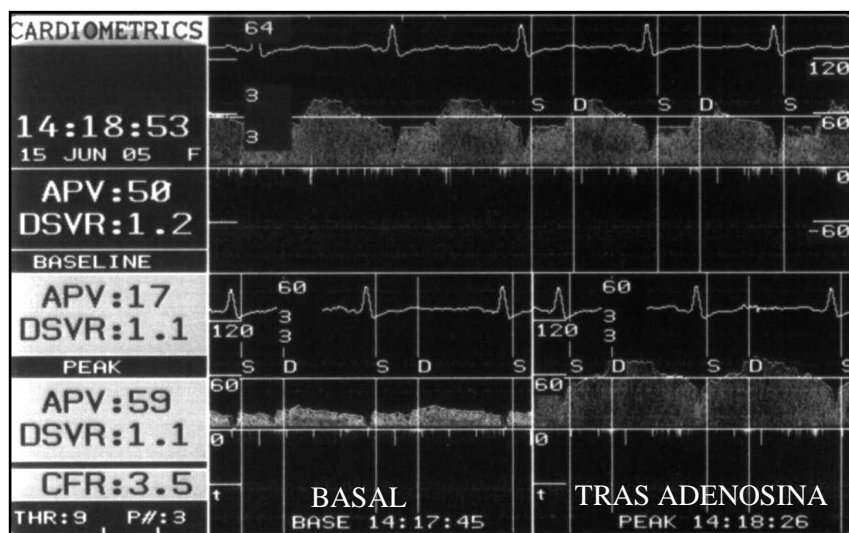


Figura 16. Reserva coronaria de flujo obtenido de la razón de la velocidad pico en condiciones basales y tras adenosina

### 3.5 Obtención y preparación de células madre

Cuatro horas antes del cateterismo en el que se administra la suspensión celular, se procede a la obtención de la muestra de médula ósea autóloga. El procedimiento de obtención se realiza en una habitación dotada con presión positiva para garantizar al máximo las condiciones de esterilidad. La médula ósea del paciente se obtiene bajo anestesia local, sin estimulación previa, mediante aspiraciones repetidas sobre la cresta ilíaca posterior, hasta alcanzar un volumen aproximado de 100-150 ml de médula, que es recolectada en una bolsa de transferencia conteniendo solución ACD-A como anticoagulante en una proporción de 1:5 del volumen de médula ósea.

El procesamiento de la médula ósea consiste únicamente en la eliminación de plasma, hematíes y granulocitos, obteniéndose exclusivamente Células Mononucleadas (CMN) **(Figura 17)**.

El procedimiento se realiza mediante una centrifugación en gradiente de densidad sobre Ficoll-Hypaque densidad 1077, en una procesadora de células semiautomática COBE-2991. La suspensión de CMN obtenida se somete a dos lavados con albúmina humana al 4% en la misma máquina con el fin de eliminar el Ficoll. Tras los dos lavados, las células son sometidas a una última centrifugación destinada a reducir el volumen de la suspensión celular, y finalmente son resuspendidas en 10 ml de CINA al 0.9% con 1% de heparina libre de preservativo. Una vez filtradas a través de un filtro de 150 $\mu$ , con el fin de eliminar posibles microagregados, serán distribuidas en dos-tres jeringas destinadas a la arteria descendente

## Material y Métodos

anterior, a la coronaria derecha y/o circunfleja en función de la dominancia coronaria del paciente, a través de la cual se inyectarán en el catéter.

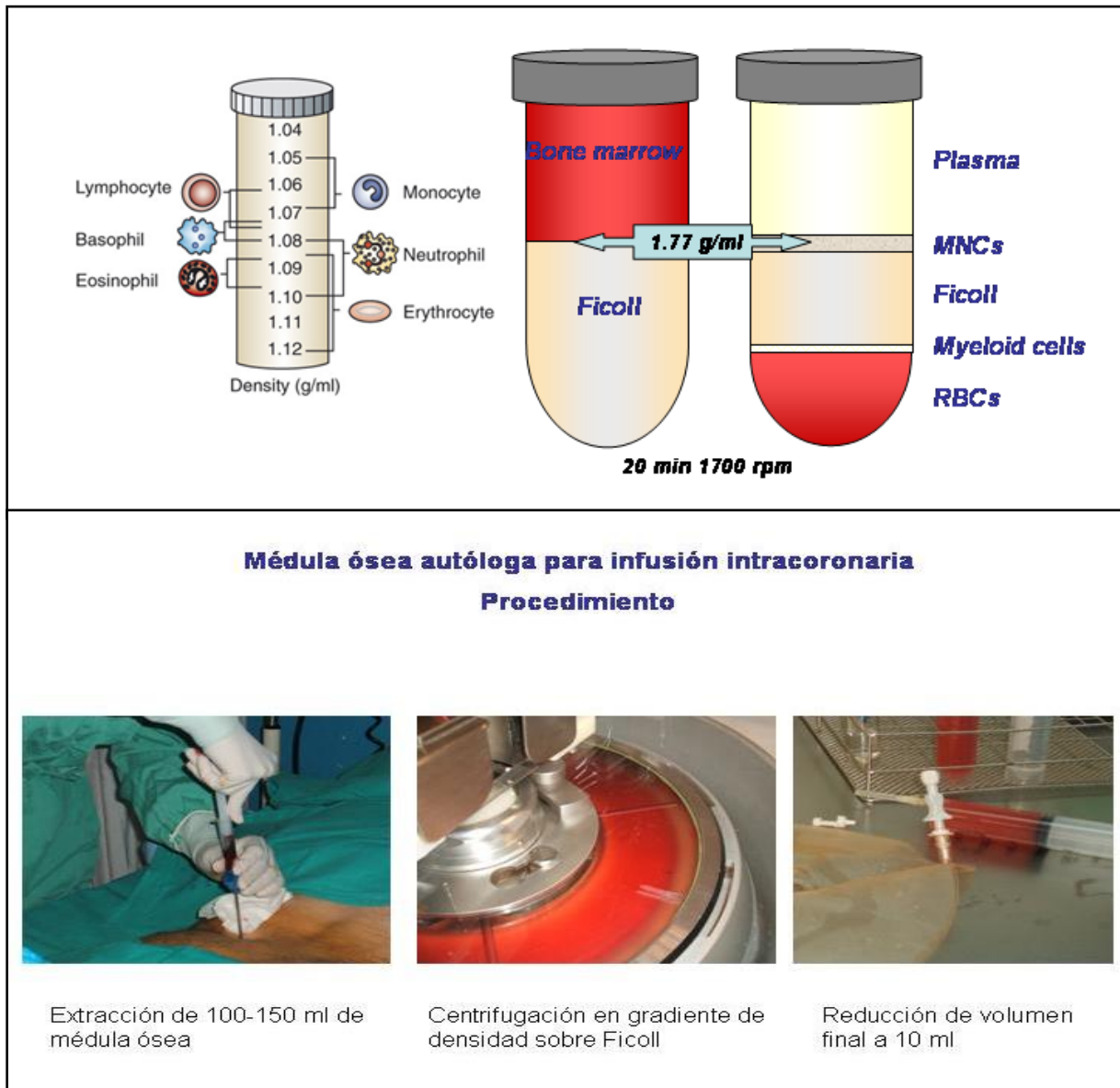


Figura 17. Procesamiento médula ósea

La suspensión celular final se transporta en condiciones de esterilidad por personal sanitario hasta la Unidad de Hemodinámica para su inmediata administración al paciente.

Toda la manipulación se realiza bajo estrictas condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar ubicada en el Laboratorio de Terapia Celular que dispone de aire filtrado mediante filtros HEPA.

Además se obtienen muestras de las células madre infundidas a los pacientes para un posterior estudio in vitro: recuento celular, viabilidad, capacidad migratoria de las mismas y control microbiológico.

### 3.6 Infusión intracoronaria de células madre

A los pacientes se les realizó ventriculografía izquierda y angiografía coronaria para determinar la fracción de eyección basal y descartar afectación coronaria antes de la infusión. La infusión selectiva en cada arteria se lleva a cabo a través de un microcatéter colocado en el segmento proximal de cada arteria coronaria. Cada infusión intracoronaria se prolongó durante dos-cuatro minutos, sin condiciones de flujo estancado y con un control estricto de la presión sistémica, los cambios electrocardiográficos y el ritmo cardiaco. Nunca durante o después de la infusión celular, se inyectó contraste para opacificar las arterias coronarias.

La suspensión celular se administrará en un volumen constante de 10 ml de suero salino al 0,9% de uso farmacéutico habitual, sin ningún otro aditivo, en 3-4 minutos, distribuidas en función de la dominancia coronaria.

Tras la infusión celular, el paciente pasa a planta de hospitalización donde se le monitoriza por electrocardiografía para detectar posibles cambios o arritmias. También se efectúan determinaciones enzimáticas seriadas en las primeras 24 horas. Tras 48-72 horas de observación clínica se procede al alta domiciliaria con tratamiento médico óptimo tal y como venía realizando y se le seguía estrechamente con llamadas telefónicas frecuentes.

Se realizaron dos estudios en régimen ambulatorio, a los 3 meses y al año de tratamiento para una nueva valoración clínica, ecocardiográfica y por ergoespirometría.

A los 6 meses de tratamiento, el paciente ingresó nuevamente como ya hemos indicado para un estudio clínico idéntico al realizado en condiciones basales, así como un posterior estudio hemodinámico, en el que se repetían los estudios funcionales con idéntica metodología.

Los pacientes supervivientes, en nuestro caso, la serie completa, continúan seguimiento clínico indefinido

### 3.7 Estudio biológico

Se diseñó un análisis biológico para relacionar la composición y la función de la médula ósea con los posibles cambios en la evolución clínica y funcional

Para ello, se obtuvieron alícuotas de la suspensión de CMNMO infundida para determinación del inmunofenotipo celular mediante citometría de flujo con tres colores. Las células se marcaron con anticuerpos monoclonales unidos a ficoeritrina-cianina-5 (PE-Cy5) o peridina-clorofil-proteína (Per-CP) frente a CD34 humano (BD Biosciences, San José, Estados Unidos), y los siguientes anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína isotiocianato o ficoeritrina: CD38, CXCR4, CD31, CD146, CD45 (BD Pharmingen, San Diego, Estados Unidos), CD133 (Miltenyi Biotec, Auburn, Estados Unidos), CD90, VEGFR2 (R&D Systems, Minneapolis, Estados Unidos), HLA-DR y CD117 (BD Biosciences) en un citómetro de flujo FACSCanto con doble láser mediante el Cell-Quest *software* (Becton Dickinson, San José, Estados Unidos). Al menos 2.000 eventos se analizan por cada marcador.

Para el cultivo *in vitro* de células progenitoras endoteliales las células se resuspendieron en medio EBM-2 (Cambrex Bio Science, Walkersville, Estados Unidos) con el 20% de suero bovino fetal a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml y se cultivaron en placas pretratadas con fibronectina (BD Biosciences Labware, Bedford, Estados Unidos) con cambio de medio cada 48 h durante 2 semanas, transcurridas las cuales las colonias formadas por las células progenitoras endoteliales se cuantificaron mediante recuento en microscopio invertido.

El análisis funcional de la capacidad quimiotáctica de las células infundidas se practicó en una cámara de Boyden modificada (BD Biosciences Labware) de la siguiente forma: la cámara superior de una placa de 24 pocillos Transwell con membrana de Matrigel de 6,5 mm de diámetro y poros de 8  $\mu$ mol se cargó con  $5 \times 10^4$  CMNMO y la parte inferior de la cámara, con EBM-2 + *stromal derived growth factor-1* (SDF-1, 100 ng/ml, R&D Systems), o con EBM-2 + *vascular endothelial growth factor* (VEGF, 100 ng/ml, R&D Systems) o con medio solo. Las placas se incubaron a 37 °C, con el 95% de humedad y el 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h, una vez transcurridas y tras observación bajo un microscopio invertido con sistema de recuento automático por campos, se calculó el porcentaje de células migradas.



### 3.8. Estudio estadístico

Los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre las proporciones fueron estudiadas mediante la chi cuadrado o la prueba exacta de Fisher, según corresponda. Pruebas no paramétricas se utilizaron (Wilcoxon para datos apareados y la prueba de U de Mann-Whitney para datos independientes) para comparar los valores de medias.

Las diferencias entre las 3 etapas de los parámetros no invasivos en el mismo paciente se analizaron mediante una prueba no paramétrica para k muestras relacionadas (prueba de Friedman). La correlación lineal entre las variables cuantitativas se analizó mediante la prueba de Pearson. Los valores de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

Para el análisis estadístico se ha utilizado el programa SPSS versión 18.0.

## **4. RESULTADOS**



## 4.- RESULTADOS

### 4.1.- Hallazgos clínicos y de laboratorio

Los 27 pacientes seleccionados tenían una edad media de  $53 \pm 12$ ; 20 eran varones y 7 mujeres. Los datos basales quedan resumidos en la **Tabla 2**.

<b>TABLA 2. Datos basales (n=27)</b>	
<b>Edad (años)</b>	<b>53±12</b>
<b>Varones</b>	<b>20 (74%)</b>
<b>Factores de riesgo</b>	
- <b>Diabetes</b>	<b>7 (26%)</b>
- <b>Hiperlipemia</b>	<b>12 (44%)</b>
- <b>Colesterol total (mg/dl)</b>	<b>174 ±40</b>
- <b>LDL colesterol (md/dl)</b>	<b>106 ± 26</b>
- <b>HDL colesterol (md/dl)</b>	<b>34 ± 11</b>
- <b>Triglicéridos (md/dl)</b>	<b>155 ± 106</b>
- <b>Hipertensión</b>	<b>10 (37%)</b>
- <b>Fumadores</b>	<b>13 (48%)</b>

## Resultados

---

<b>Grado funcional</b>	<b>II → 17 (63%)</b>
	<b>III → 9 (33%)</b>
	<b>IV → 1 (4%)</b>
<b>BCRIHH</b>	<b>13 (48%)</b>
<b>HBAIHH</b>	<b>2 (7%)</b>
<b>Insuficiencia mitral no severa</b>	<b>12 (44%)</b>
<b>BNP (pgr/ml)</b>	<b>403 ± 417</b>
<b>FE Simpson</b>	<b>27 ± 7</b>
<b>Volumen diastólico</b>	<b>178 ± 63</b>
<b>Volumen sistólico</b>	<b>131 ± 55</b>
<b>FE angiografía</b>	<b>28 ± 9</b>
<b>Volumen telediastólico</b>	<b>161 ± 64</b>
<b>Volumen telesistólico</b>	<b>118 ± 56</b>
<b>Dominancia coronaria</b>	<b>Izquierda → 25%</b>
	<b>Balanceada → 60%</b>
	<b>Derecha → 11%</b>

**BCRIHH:** Bloqueo completo rama izquierda haz de his; **BNP:** Péptido Natriurético Atrial; **FE:** Fracción de Eyección; **HBAIHH:** hemibloqueo anterior izquierdo

Todos los pacientes se encontraban con el tratamiento médico óptimo al menos 12 meses antes de su inclusión en el estudio.

La dosis total de células a administrar no está establecida en la literatura. De acuerdo con nuestra propia experiencia y los datos publicados en cardiopatía isquémica, la administración de la totalidad de las células mononucleadas obtenidas a partir de 100 ml de médula ósea representa entre  $5 \times 10^8$  y  $7 \times 10^8$  células totales. En nuestra serie de pacientes, en una suspensión de 10 ml de células madre, se infunde una media de  $10,2 \pm 2,9 \times 10^8$  células mononucleares de médula ósea autóloga, distribuidas de la siguiente manera en función de la dominancia coronaria:

- En 16 de los pacientes (59%), se infundió 50% en arteria descendente anterior, 25% en arteria circunfleja, 25% en coronaria derecha.
- En 6 pacientes (22%) con dominancia izquierda, se infundió el 50% en arteria circunfleja y 50% en DA.
- En 4 pacientes (15%), con dominancia derecha, se infundió 50% en arteria DA y 50% en arteria coronaria derecha
- En un paciente con codominancia, se infundió 33% en cada una de las arterias coronarias

El número de células infundidas que expresaban cada uno de los fenotipos estudiados mediante citometría de flujo y sus características funcionales en cuanto a migración y formación de colonias endoteliales quedan reflejadas en la **Tabla 3**.

<b>TABLA 3. Características de las células infundidas</b>	
<b>Número de células infundidas</b>	<b>Media±DS Basal</b>
<b>Células mononucleadas (x10<sup>8</sup>)</b>	<b>10.2±2.9</b>
<b>CD34+ (x10<sup>6</sup>) → marcador de pluripotencialidad</b>	<b>40.4±23.6</b>
<b>CD34+/CD117+ (x10<sup>6</sup>)</b>	<b>20.6±15.4</b>
<b>CD133+ (x10<sup>6</sup>)</b>	<b>22.8±15.3</b>
<b>CD34+/CD38+ (x10<sup>6</sup>)</b>	<b>9.9±11.8</b>
<b>CD34+/CXCR4+ (x10<sup>6</sup>)</b>	<b>1.9±2.8</b>
<b>CD90+ (x10<sup>6</sup>)</b>	<b>1.3±1.3</b>
<b>Células rojas contaminantes (x10<sup>8</sup>)</b>	<b>0.49±0.23</b>
<b>Hematocrito (%)</b>	<b>0.42±0.2</b>
<b>Características funcionales</b>	
<b>Migración específica a VEGF (x10<sup>8</sup>)</b>	<b>5.8±2</b>
<b>Migración específica a SDF-1 (x10<sup>8</sup>)</b>	<b>6.3±2.1</b>
<b>Frecuencia de CFU-EC (x10<sup>6</sup>)</b>	<b>8.2±13.9</b>

CFU-EC: colony forming unit endotelial cells. DS: Desviación estándar; VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular; SDF-1: Stromal cell derived factor.

No se produjeron complicaciones importantes relacionadas con la transferencia intracoronaria de células o cualquier otro procedimiento en el protocolo del estudio. Durante la infusión de la suspensión celular en la arteria coronaria derecha, en cinco pacientes se produjeron episodios de bradicardia e hipotensión, que se resolvieron adecuadamente con la administración de líquidos y al disminuir la velocidad de infusión, lo que permitió terminar el procedimiento sin complicaciones. No aparecieron arritmias dignas de mención o signos de daño miocárdico durante las siguientes 24 horas (pico de troponina I medio  $0,03 \pm 0,04$  ng / ml). Todos los pacientes recibieron el alta con tratamiento médico y seguimiento estrecho.

Durante el seguimiento de más de 1 año, sólo un paciente reingresó en dos ocasiones por la descompensación de su insuficiencia cardíaca. Los 26 pacientes restantes evolucionaron con mayor frecuencia a una mejor clase funcional. La **figura 18** muestra la evolución de la clase funcional de la NYHA en nuestros pacientes.



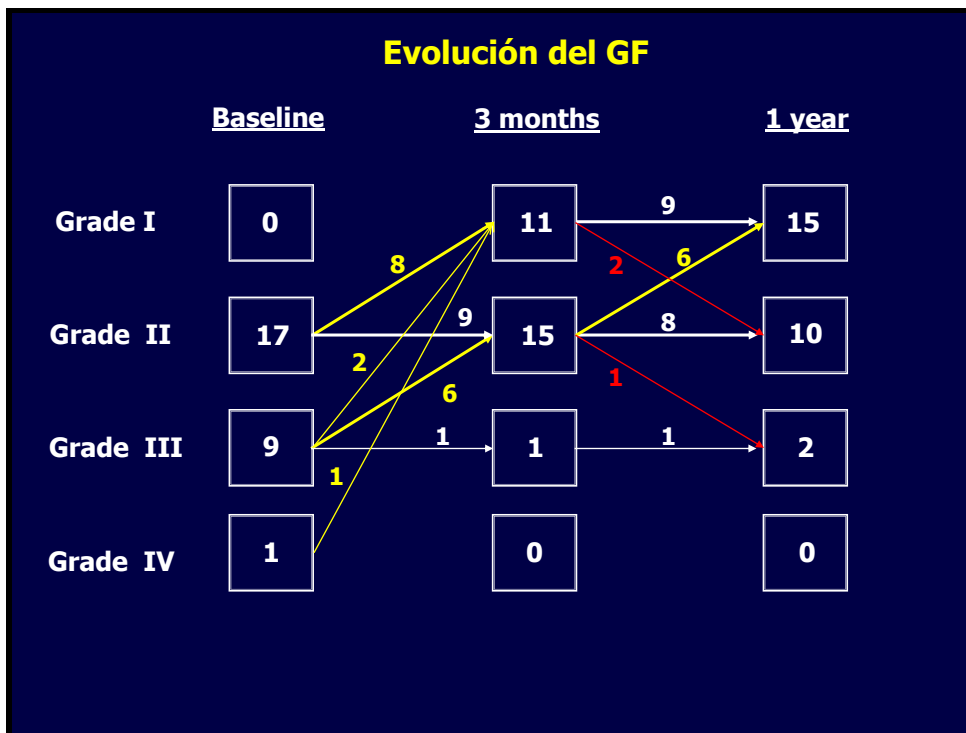


Figura 18.- Evolución del grado funcional

Al seguimiento, ningún paciente deterioró su grado funcional basal, 8 pacientes mantuvieron su grado funcional basal (6 en grado funcional II y 2 en grado funcional III) y 19 pacientes mejoraron con respecto a su condición basal (11 pasaron de grado funcional II a grado funcional I y cuatro de grado funcional III a grado funcional I, tres pacientes pasaron de grado funcional III a grado funcional II y el último paciente pasó de grado funcional IV a grado funcional II).

Esta mejoría clínica frecuentemente se asoció a una reducción significativa en los niveles circulantes de BNP durante el seguimiento, basal  $403 \pm 417$ , a los 3 meses  $129 \pm 169$  y al año  $122 \pm 190$  pg/ml ( $p < 0,05$ ). (Figura 19)

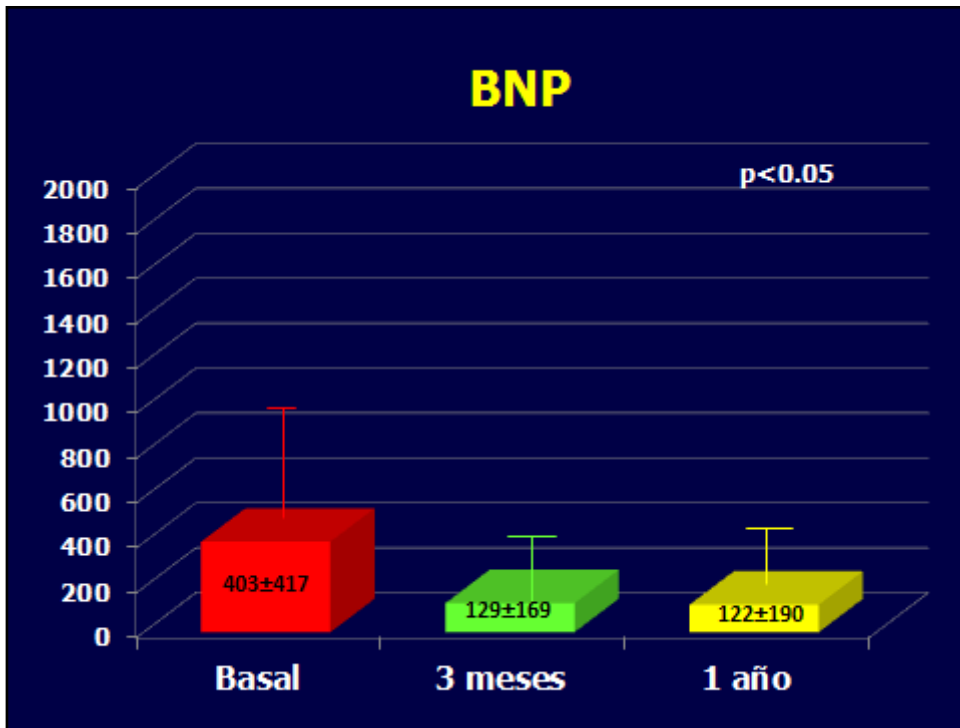


Figura 19.- Evolución BNP al seguimiento

## **4.2. Hallazgos ecocardiográficos y ergoespirometría**

La **Tabla 4** muestra la evolución observada en los parámetros no invasivos. La capacidad de ejercicio mejoró en la mayoría de los pacientes, así como el consumo pico de oxígeno y el tiempo de ejercicio. También hubo mejoras significativas en los volúmenes ecocardiográficos del ventrículo izquierdo y de la fracción de eyección, lo que sugiere un remodelado favorable del ventrículo después de la terapia celular.

**TABLA 4. Hallazgos ecocardiográficos y ergoespirometría**

	<b>Basal</b>	<b>3 meses</b>	<b>1 año</b>	<b>p</b>
<b>Volumen diastólico (ml)</b>	<b>178±63</b>	<b>161±60</b>	<b>176±78</b>	<b>ns</b>
<b>Volumen sistólico (ml)</b>	<b>131±55</b>	<b>107±47</b>	<b>112±65</b>	<b>0.05</b>
<b>Fracción de eyección (%). Simpson</b>	<b>27±7</b>	<b>35±11</b>	<b>38±11</b>	<b>0.001</b>
<b>Consumo de O2 pico (ml/min/Kg)</b>	<b>20±5</b>	<b>21±4</b>	<b>22±5</b>	<b>0.16</b>
<b>% O2 máximo teórico</b>	<b>73±17</b>	<b>77±16</b>	<b>83±18</b>	<b>0.04</b>
<b>Umbral de anaerobiosis</b>	<b>16±5</b>	<b>16±5</b>	<b>17±6</b>	<b>ns</b>
<b>Tiempo total de ejercicio</b>	<b>11±5</b>	<b>15±4</b>	<b>15±3</b>	<b>0.002</b>

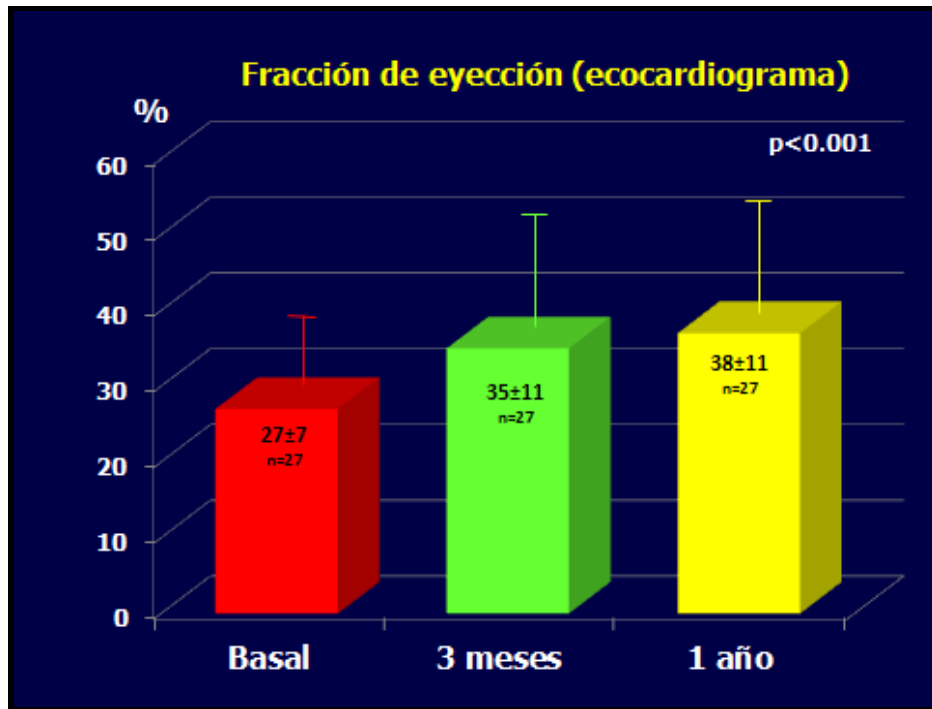
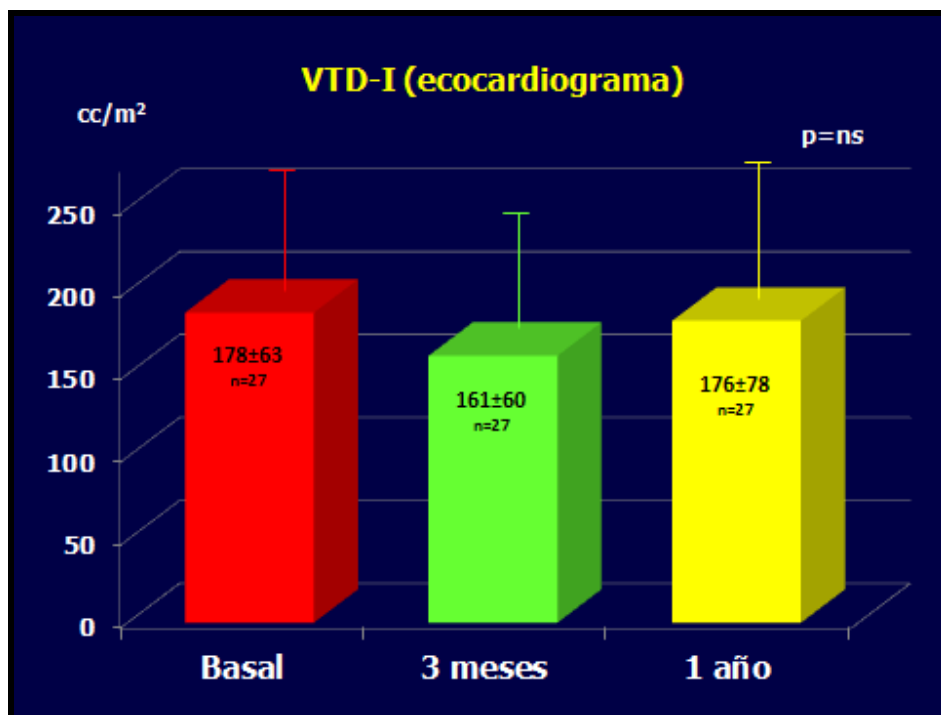
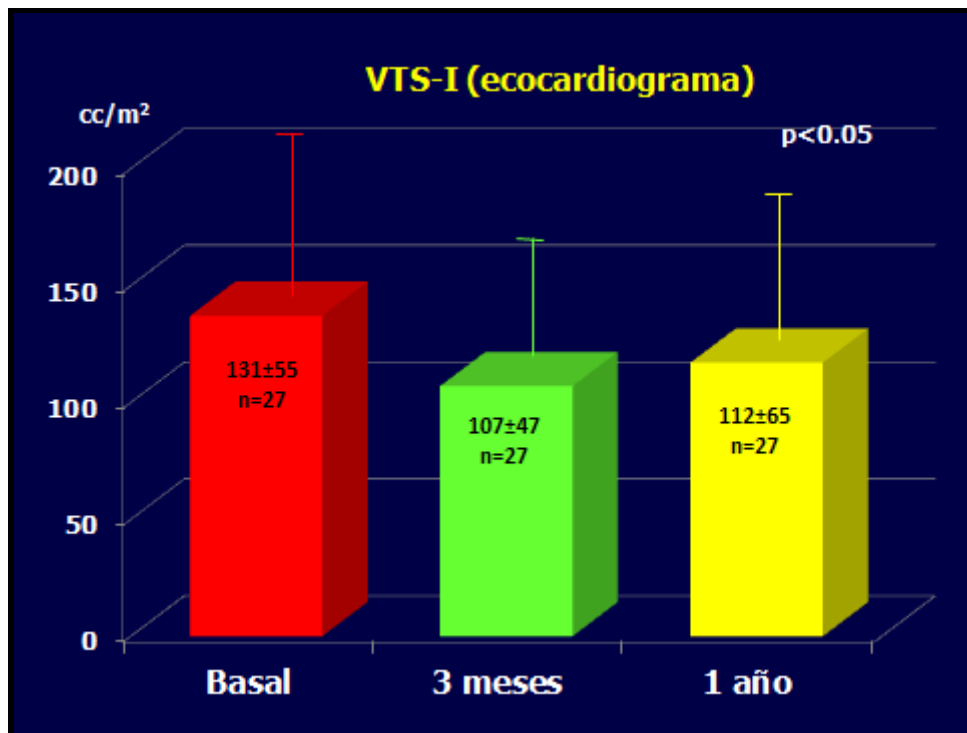


Figura 20.- Evolución ecocardiográfica de la función ventricular



## Resultados

---



Figuras 21 y 22.- Evolución ecocardiográfica de los volúmenes ventriculares.

VTD: volumen telediastólico. VTS: volumen telesistólico

Además, hubo una reducción en el grado de insuficiencia mitral, cuando está presente, tal como se evaluó mediante el análisis por eco-Doppler. La **figura 23** muestra los cambios observados en el grado de insuficiencia mitral a través del estudio ecocardiográfico.

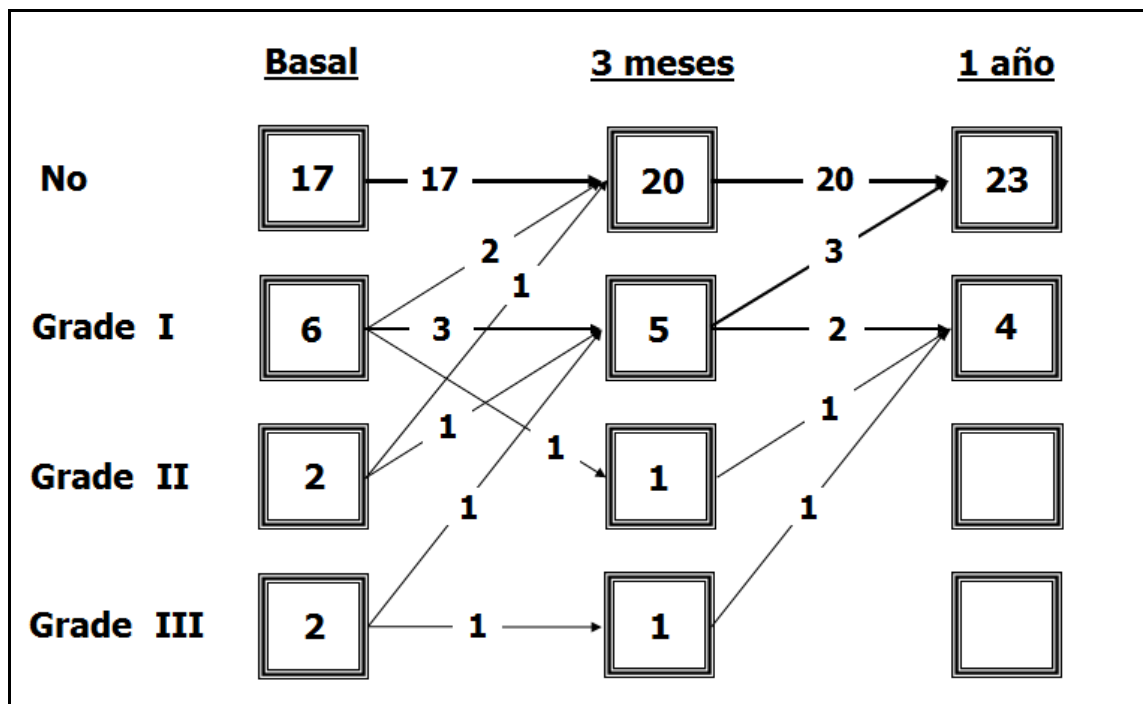


Figura 23 .- Reducción del grado de insuficiencia mitral por ecocardiografía a los 3 meses y al año

**4.3. Hallazgos angiográficos y hemodinámicos**

La tabla 5 muestra la evolución observada en los parámetros hemodinámicos y angiográficos evaluados. Todos los pacientes sobrevivieron al procedimiento y ningún paciente presentó complicaciones derivadas del cateterismo cardiaco, tanto en la fase aguda como en el seguimiento.

<b>TABLA 5. Hallazgos angiográficos y hemodinámicos</b>				
		<b>Basal</b>	<b>6-meses</b>	<b>p</b>
<b>PTDVI (mmHg)</b>		<b>17±8</b>	<b>15±9</b>	<b>0.21</b>
<b>CFR</b>	<b>DA</b>	<b>2.6±0.8</b>	<b>2.5±0.4</b>	<b>ns</b>
	<b>Cx</b>	<b>2.3±0.6</b>	<b>2.7±1</b>	<b>ns</b>
	<b>CD</b>	<b>2.5±0.8</b>	<b>2.8±0.8</b>	<b>ns</b>
<b>Sinusal</b>	<b>VTDVli (ml/m<sup>2</sup>)</b>	<b>161±64</b>	<b>144±48</b>	<b>0.001</b>
	<b>VTSVli (ml/m<sup>2</sup>)</b>	<b>118±56</b>	<b>93±42</b>	<b>0.001</b>
	<b>Fracción de eyección (%)</b>	<b>28±9</b>	<b>37±11</b>	<b>0.003</b>
	<b>SCA (%)</b>	<b>15±14</b>	<b>8±11</b>	<b>0.001</b>
	<b>% de radios afectos</b>	<b>55±16</b>	<b>43±22</b>	<b>0.04</b>
	<b>VTDVli (ml/m<sup>2</sup>)</b>	<b>176±62</b>	<b>164±59</b>	<b>0.001</b>

<b>Post-PVC</b>	<b>VTDVIi (ml/m<sup>2</sup>)</b>	<b>107±53</b>	<b>84±42</b>	<b>0.001</b>
	<b>Fracción de eyección (%)</b>	<b>41±1</b>	<b>50±12</b>	<b>0.01</b>
	<b>SCA (%)</b>	<b>5±9</b>	<b>2±4</b>	<b>0.12</b>
	<b>% de radios afectados</b>	<b>36±22</b>	<b>23±17</b>	<b>0.25</b>

**CFR:** reserva de flujo coronario; **PTDVI:** presión telediastólica del VI; **PVC:** latido ventricular prematuro; **SCA:** segmentos de contracción anómala; **VTDVI:** volumen telediastólico del VI; **VTSVI:** volumen telesistólico del VI;

A los 6 meses de seguimiento hubo una reducción significativa de los volúmenes del ventrículo izquierdo y un aumento en la fracción de eyección que se correlacionaron con los cambios ecocardiográficos observados. La ganancia media de la fracción de eyección ( $9,4 \pm 9,9\%$ ), estaba de acuerdo con una reducción del porcentaje de radios afectados (reducción media de los radios hipoquinéticos del  $12,9 \pm 20\%$ ) y una reducción de los segmentos acinéticos, cuando están presentes en el estudio basal (media reducción de los segmentos de contracción anormal  $7.1 \pm 9.4\%$ ).



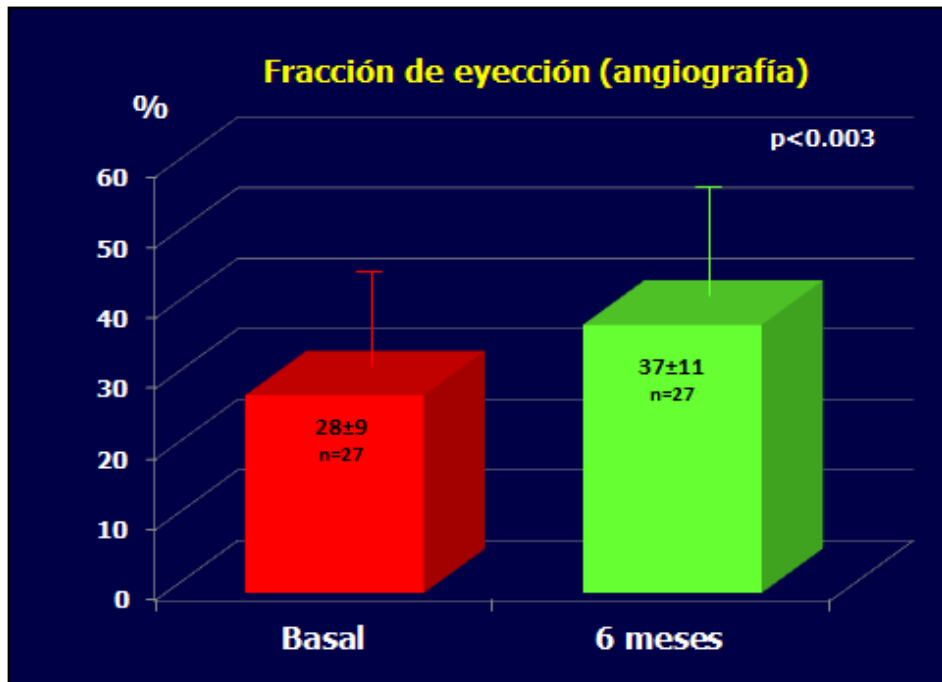
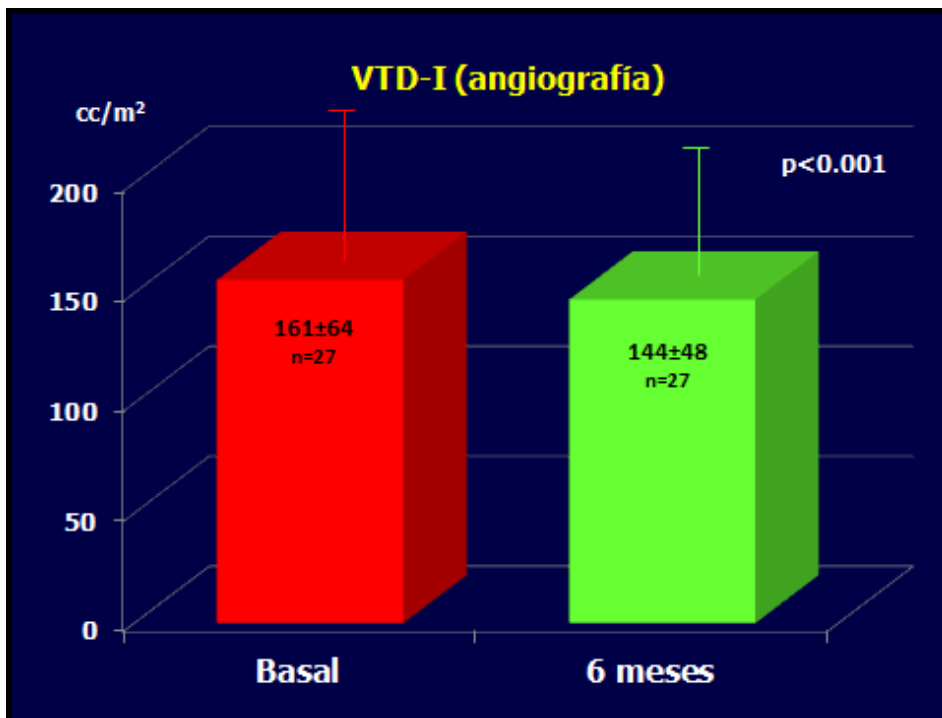
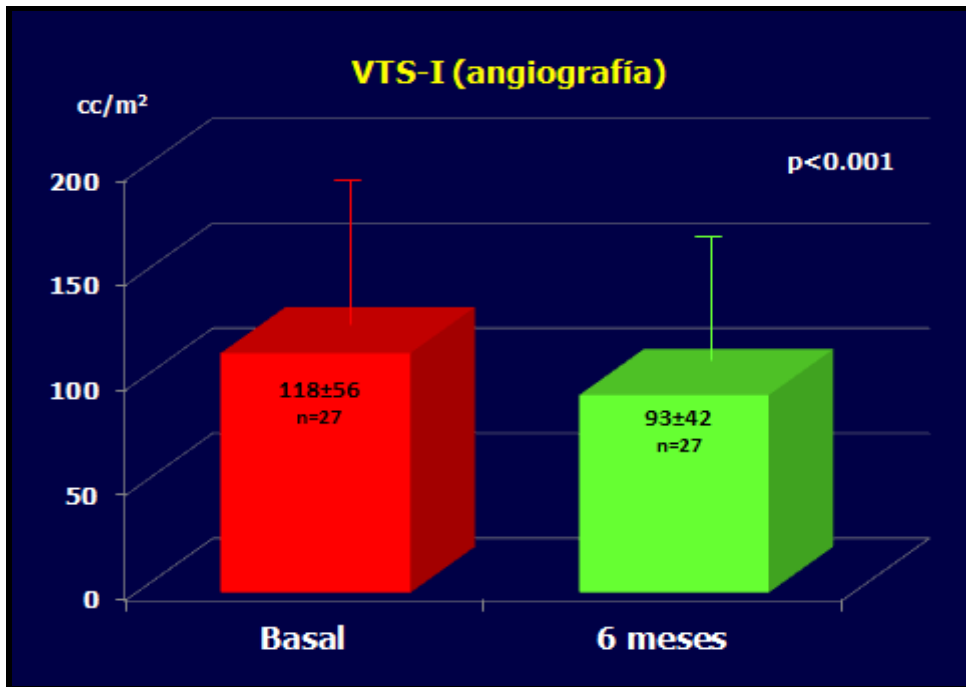


Figura 24.- Evolución angiográfica de la función ventricular





Figuras 25 y 26.- Evolución angiográfica de los volúmenes ventriculares.



Figura 27.- Evolución angiográfica del número de cuerdas hipoquinéticas

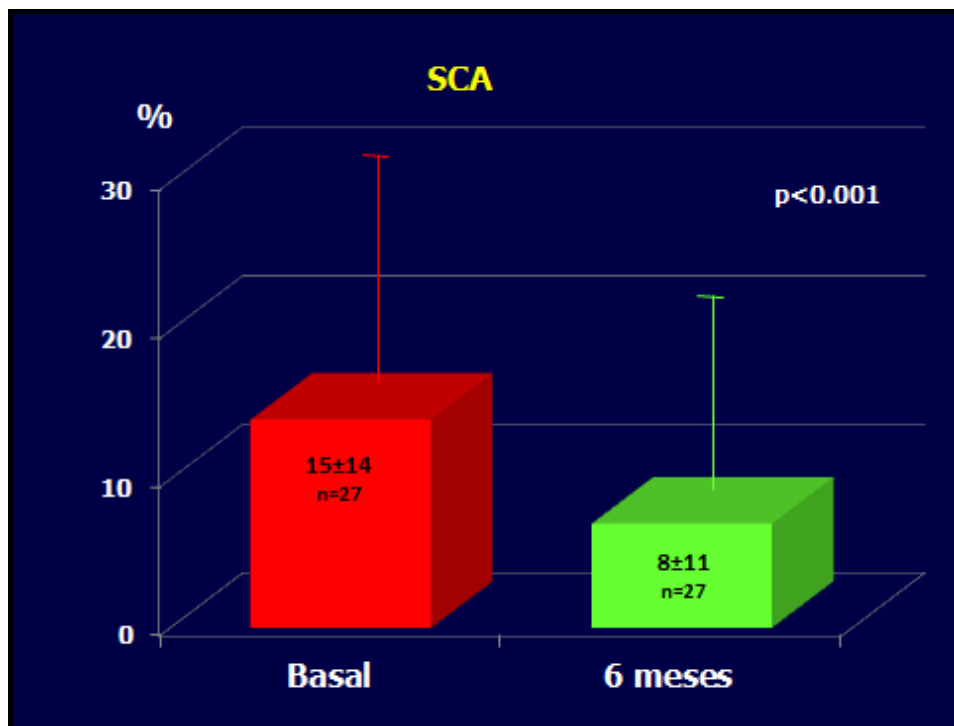


Figura 28.- Evolución angiográfica de los segmentos de contracción anormal

Este aumento de la fracción de eyección fue significativamente mayor en los pacientes con una fracción de eyección más baja ( $<25\%$ ) al inicio del estudio ( $16 \pm 8$  vs  $6 \pm 9\%$ ,  $p < 0,01$ ). En la **figura 29** se muestra la evolución en la ventriculografía en un paciente con una mejora significativa en la función ventricular izquierda.

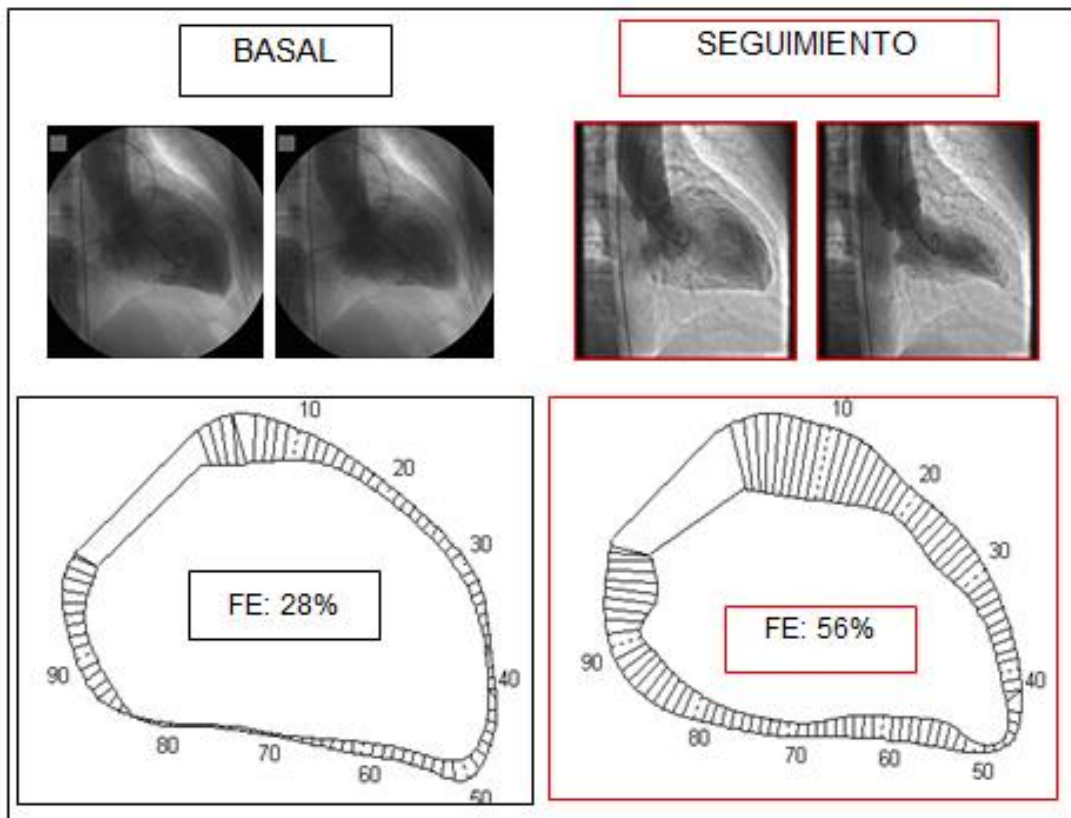
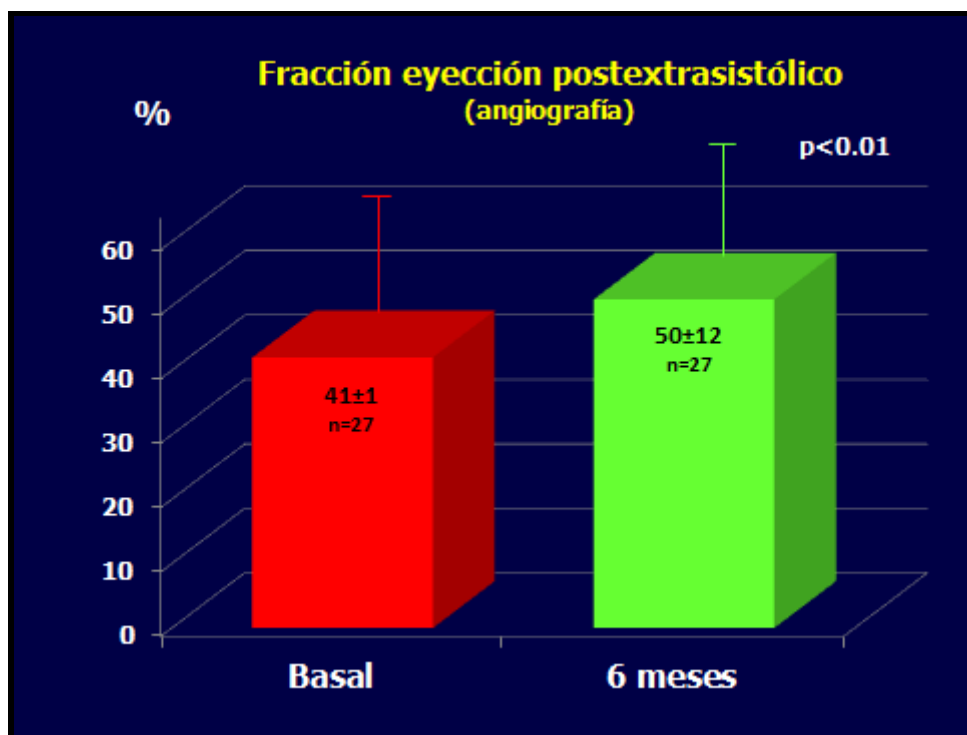


Figura 29.- Ventriculografía basal y al seguimiento. A los 6 meses se objetiva un incremento de la FE con una disminución del volumen telesistólico

## Resultados

---

La reserva contráctil del ventrículo evaluada mediante la potenciación postextrasistólica, también mejoró proporcionalmente 6 meses después de la terapia celular, dado que la fracción de eyección postextrasistólica experimentó un aumento significativo en el seguimiento ( $8.9 \pm 13,7\%$ ). **Figura 30**

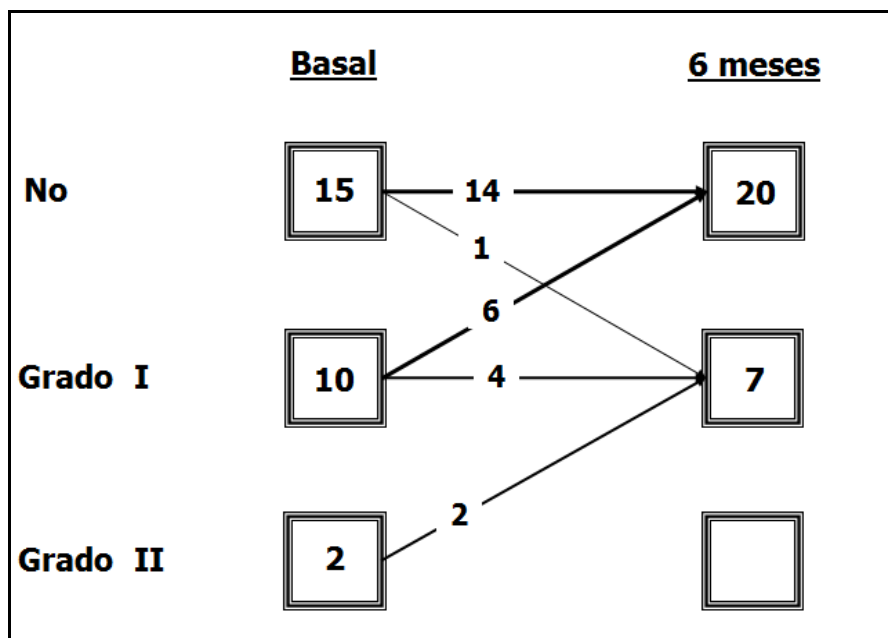


**Figura 30.- Evolución angiográfica de la fracción de eyección postextrasistólica**

Sin embargo, no se observaron cambios en la velocidad de flujo máxima por Doppler ni en la reserva de flujo coronario de las tres arterias coronarias en el seguimiento realizado a los 6 meses. La media de la reserva de flujo coronario fue normal en las tres arterias en la

determinación basal (arteria coronaria derecha,  $2.5\pm 0.8$ ; arteria descendente anterior izquierda  $2.6\pm 0.8$  y la arteria circunfleja  $2.3\pm 0.6$ ). A los 6 meses de tratamiento, la reserva de flujo coronario de las tres arterias se mantenía inalterada ( $2.8\pm 0.8$ ;  $2.5\pm 0.4$  y  $2.7\pm 1$ , respectivamente).

Doce pacientes (44%) tenían algún grado de insuficiencia mitral angiográfico antes del tratamiento. Seis meses después de la terapia celular, ocho de ellos mostraron una reducción en el grado de regurgitación mitral angiográfico y únicamente uno tuvo un aumento de 1 grado. La **Figura 31** muestra gráficamente la evolución observada en el grado de insuficiencia mitral angiográfica. Tendencia similar se observó también en la ecocardiografía, a los 3 meses y al 1 año de seguimiento.



**Figura 31.- Reducción de la insuficiencia mitral angiográfica en el seguimiento**

#### 4.4. Factores que influyen en la mejoría funcional

Como ya hemos comentado, el aumento de la fracción de eyección fue significativamente mayor en los pacientes con una fracción de eyección más baja (<25%) al inicio del estudio ( $16 \pm 8$  vs  $6 \pm 9\%$ ,  $p < 0,01$ ). Los cambios individuales en la fracción de eyección se representan en la **figura 32**.

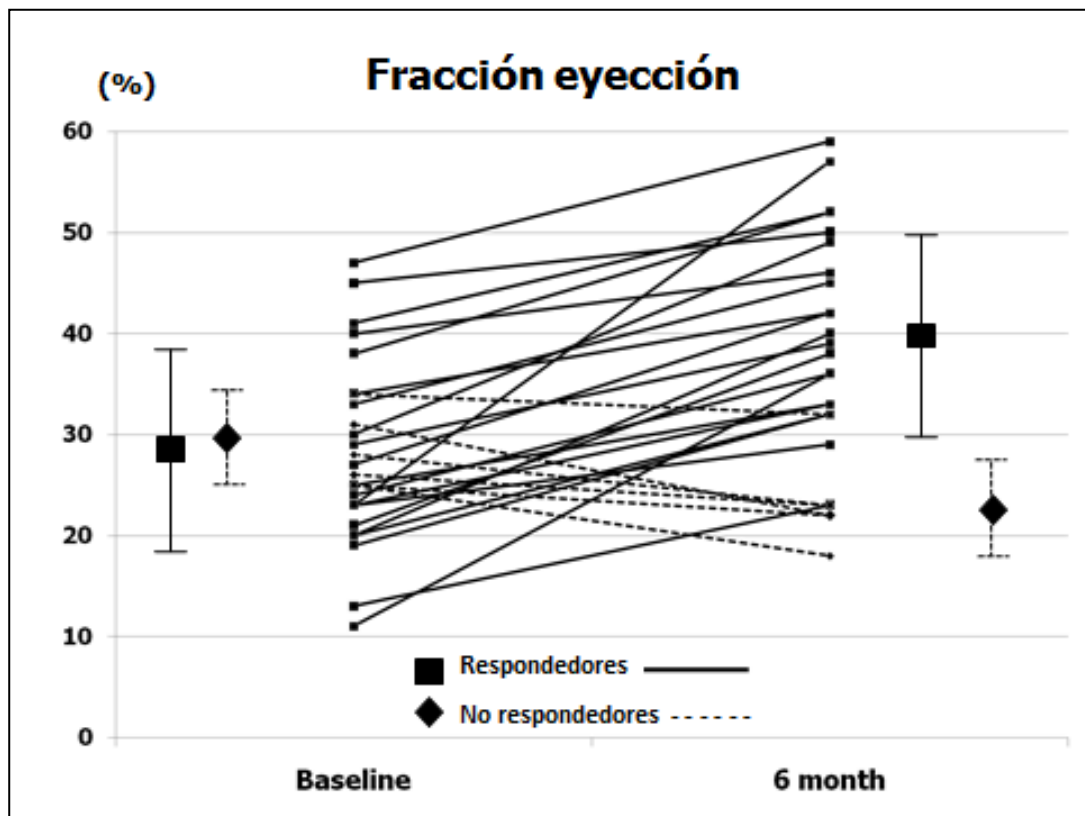


Figura 32.- Cambios individuales en la fracción de eyección

Al analizar los resultados, hubo una clara distinción entre dos grupos de pacientes: 21 de ellos (78%) tuvieron una mejoría significativa a los 6 meses tras el tratamiento, (promedio de aumento de  $14 \pm 7\%$ ), mientras que seis no tuvieron respuesta o empeoraron (ganancia media  $-5 \pm 3\%$ ).

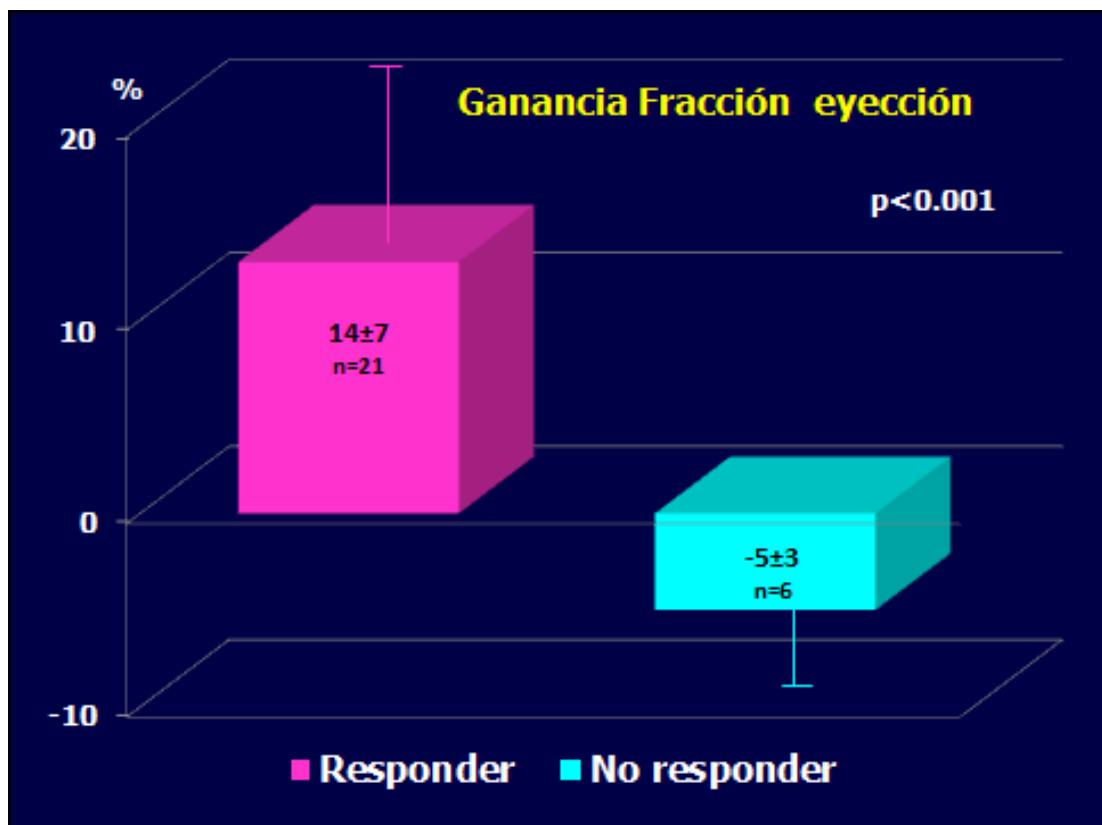


Figura 33.- Ganancia fracción de eyección en respondedores y no respondedores



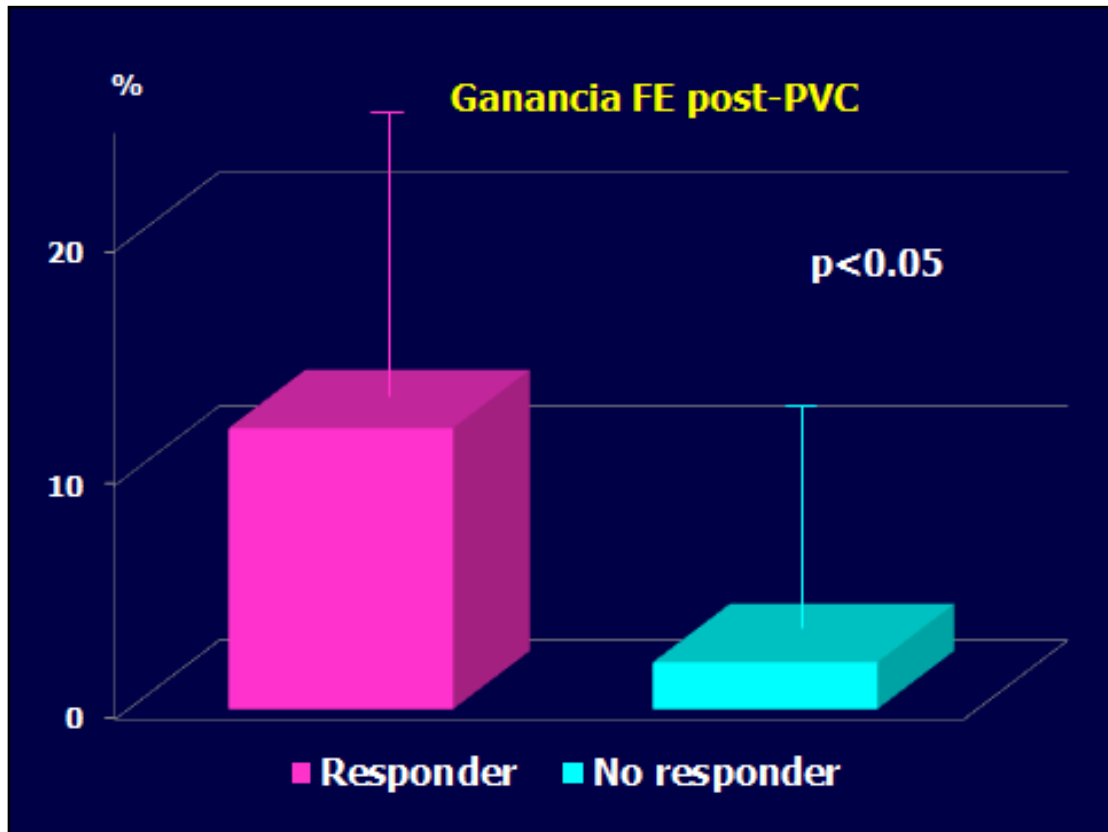


Figura 34.- Ganancia fracción de eyección en respondedores y no respondedores en latido postextrasistólico

El primer grupo podría ser considerado como **respondedores** a la terapia celular y el segundo como **no respondedores**. A pesar de que el segundo grupo de pacientes fue pequeño, se analizaron los posibles factores asociados con la respuesta. La **tabla 6** muestra el análisis univariado.

**TABLA 6. Análisis univariado**

	<b>Respondedores (n=21)</b>	<b>No respondedores (n=6)</b>	<b>p</b>
<b>Edad (años)</b>	<b>51±12</b>	<b>62±9</b>	<b>0.04</b>
<b>Colesterol total (mg/dl)</b>	<b>171±41</b>	<b>184±36</b>	<b>0.46</b>
<b>HDL colesterol (mg/dl)</b>	<b>32±9</b>	<b>42±15</b>	<b>0.06</b>
<b>Género Masculino (%)</b>	<b>15 (71%)</b>	<b>5 (83%)</b>	<b>0.50</b>
<b>Diabetes (%)</b>	<b>6 (29%)</b>	<b>1 (17%)</b>	<b>0.62</b>
<b>Hipertensión (%)</b>	<b>6 (29%)</b>	<b>4 (67%)</b>	<b>0.15</b>
<b>Fumadores (%)</b>	<b>11 (52%)</b>	<b>2 (33%)</b>	<b>0.61</b>
<b>Fracción de eyección basal (%)</b>	<b>28±10</b>	<b>29±4</b>	<b>0.47</b>
<b>Células mononucleares infundidas (x10<sup>8</sup>)</b>	<b>9.66±2.47</b>	<b>11.99±3.77</b>	<b>0.08</b>
<b>Migración celular (células x10<sup>8</sup>)</b>	<b>4.4±1.2</b>	<b>6.9±1.5</b>	<b>0.002</b>
<b>Migración a VEGT (células x10<sup>8</sup>)</b>	<b>5.38±1.66</b>	<b>8.1±2.3</b>	<b>0.009</b>
<b>Migración a SDF-1 (células x10<sup>8</sup>)</b>	<b>5.8±1.7</b>	<b>8.4±2.9</b>	<b>0.02</b>

**HDL:** Lipoproteínas de la alta densidad. **SDF-1:** factor 1 derivado de células del estroma. **VEGT:** factor de crecimiento endotelial vascular.

Los datos se expresan en forma de n(%) o media ± desviación estándar.

## Resultados

---

Como puede verse, los respondedores eran más jóvenes ( $51\pm 12$  vs  $62\pm 9$ ;  $p<0,04$ ),

(Figura 35)

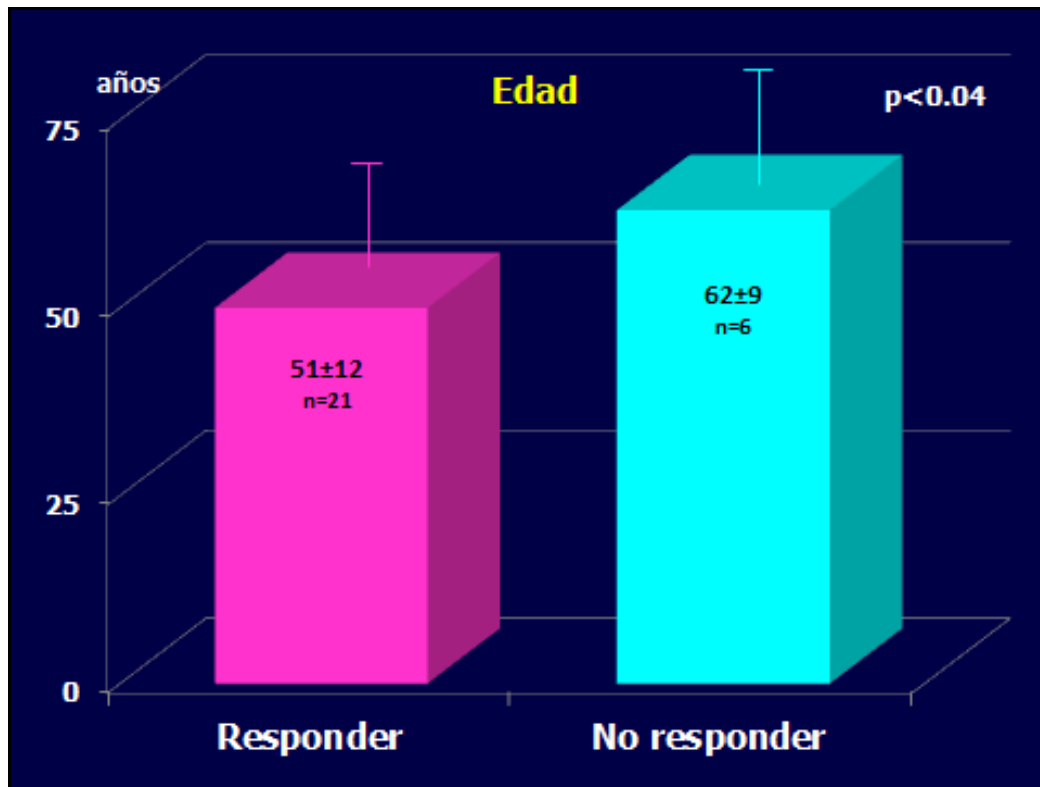


Figura 35.- Edad de los pacientes en función de su respuesta funcional

Como era de esperar, la clase funcional a los 6 meses fue mejor en los respondedores.

Adicionalmente, el aumento de la fracción de eyección se correlacionó de forma inversa con el nivel basal de colesterol HDL ( $r = -0.41$ ,  $p < 0.03$ ) lo que sugiere una mayor ganancia funcional con niveles bajos de c-HDL. De hecho, el c-HDL fue significativamente menor en aquellos pacientes con un mayor aumento en la fracción de eyección ( $> 10\%$ ), ( $30 \pm 8$  vs  $40 \pm 10$  mg/dl:  $p < 0.01$ ). **Figura 36**

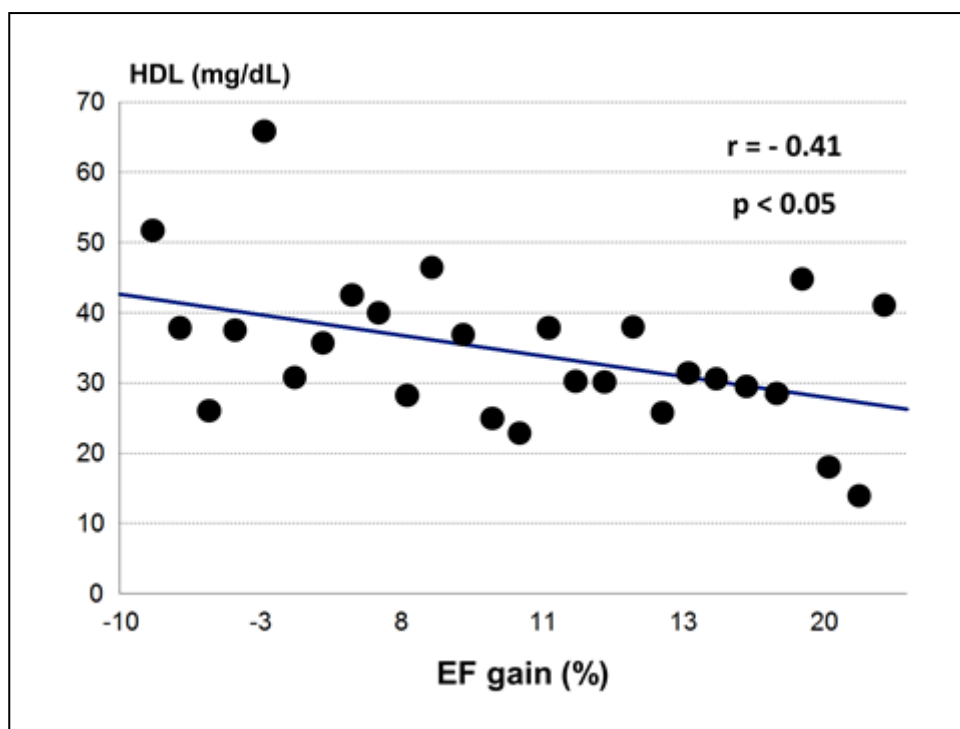
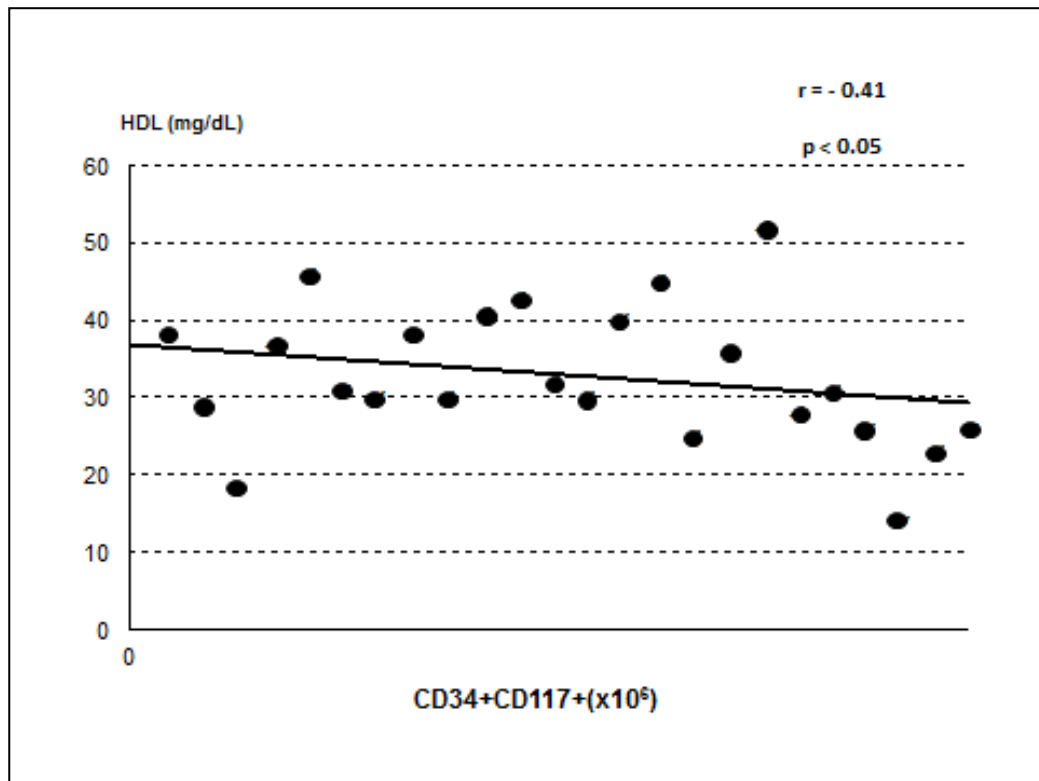


Figura 36.- Relación entre los niveles de HDL colesterol y fracción de eyección

## Resultados

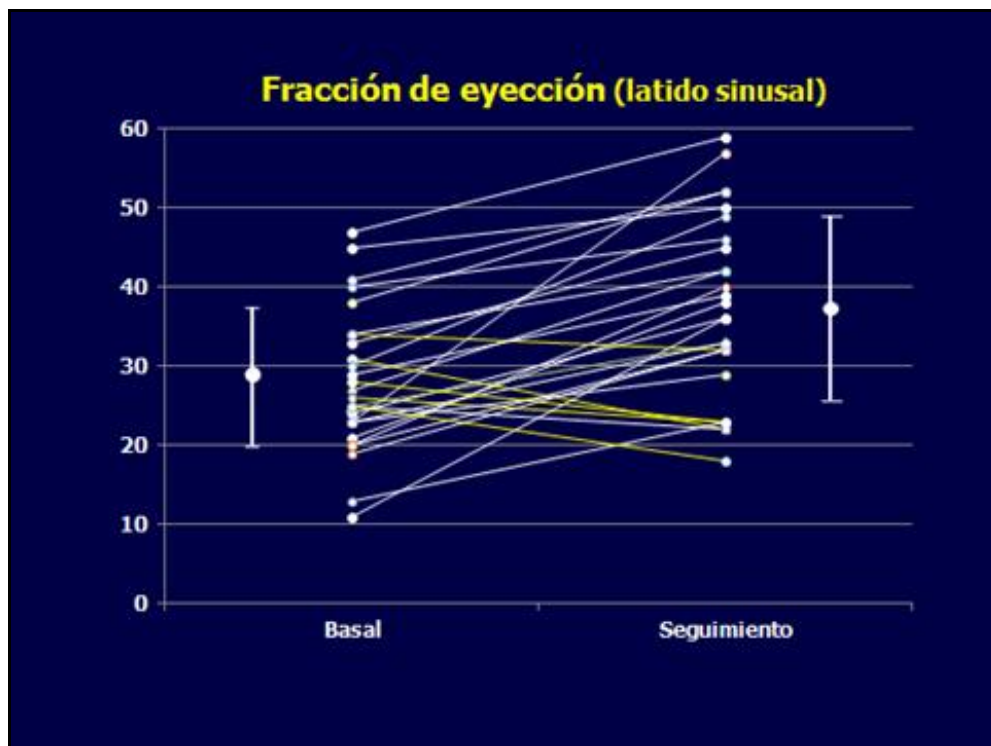
Por otro lado, el c-HDL basal también se correlaciona inversamente con la proporción de CD34+ /CD117+ del total de células infundidas ( $r = -0.41$ ,  $p < 0,05$ ). **Figura 37**



**Figura 37.-** Relación entre colesterol HDL y número de células CD34+/CD117+

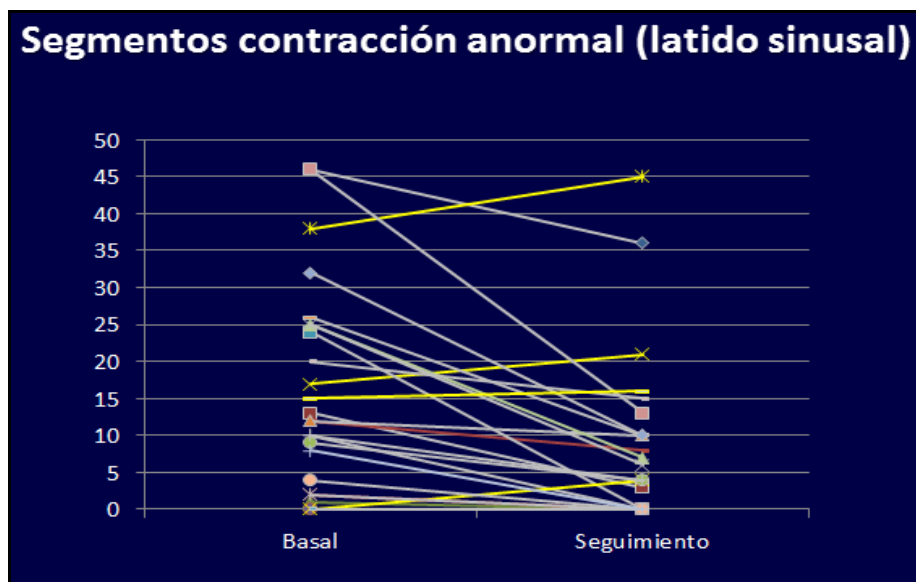
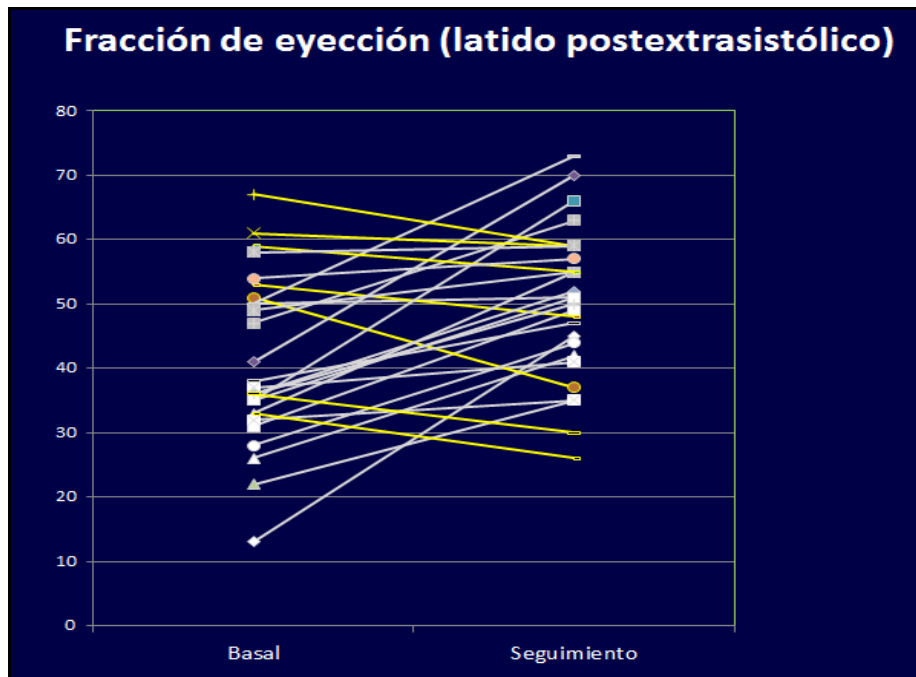
La capacidad migratoria de las células infundidas fue significativamente inferior en el grupo de respondedores en comparación con los no respondedores ( $5.4 \pm 1.7 \times 10^8$  vs  $8.1 \pm 2.3 \times 10^8$ ,  $p < 0.009$  para VEGF y  $5.8 \pm 1.7 \times 10^8$  vs  $8.4 \pm 2.9 \times 10^8$ ;  $p < 0.002$  para SDF-1).

Por último, la ganancia en el número de cuerdas hipocinéticas se correlacionó de forma significativa con el porcentaje de CD34+/HLA-DR- presente en la infusión celular ( $r = 0,52$ ;  $p < 0,02$ ), lo que sugiere que la mayor cantidad de células inmaduras infundidas influye de forma favorable en la ganancia funcional. Estos hallazgos inesperados pueden ser el resultado de una posible relación entre la funcionalidad de la médula ósea y los niveles circulantes de c-HDL. Ambos podrían tener una influencia en el grado de recuperación de la función ventricular izquierda después de la terapia celular.



**Figura 38.- Cambios en la fracción de eyección al seguimiento.**

En amarillo se representa el empeoramiento en los pacientes no respondedores.



Figuras 39 y 40.- Cambios en la fracción de eyección y segmentos de contracción anormal al seguimiento. En amarillo se representa el empeoramiento en los pacientes

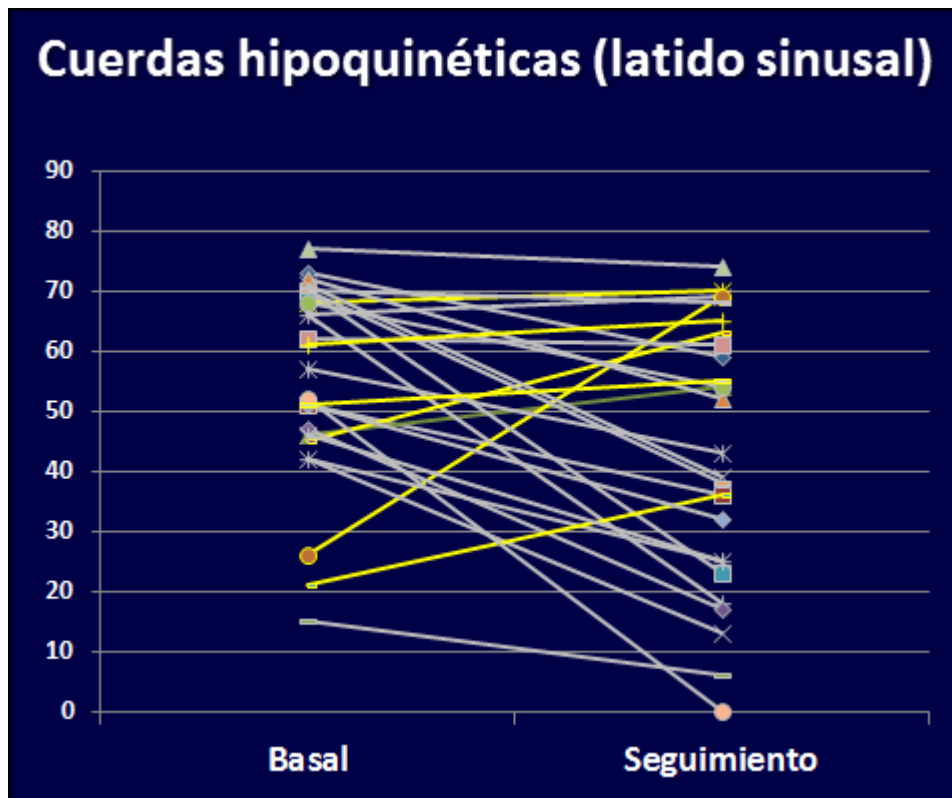


Figura 41.- Cambios en las cuerdas hipoquinéticas al seguimiento.

En amarillo se representa el empeoramiento en los pacientes no respondedores.





## **5. DISCUSIÓN**



## 5.- DISCUSIÓN

La terapia celular continúa siendo un área muy activa en el campo de la investigación, con resultados iniciales prometedores en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, aún existen muchos factores desconocidos en la terapia celular, entre los que se incluyen el mecanismo de acción, los tipos de células que resultan más eficaces, así como su seguridad.

Diferentes estudios experimentales en modelos de conejo y rata con miocardiopatía dilatada han demostrado un beneficio funcional después de la terapia celular<sup>117-121</sup>. En ellos, aspirados de médula ósea de ratas isogénicas<sup>117</sup>, mioblastos esqueléticos autólogos cultivados<sup>118</sup> o cultivos de células mesenquimales<sup>119-121</sup> se inyectaron directamente en el miocardio. Basándose en estos resultados experimentales, los diferentes estudios clínicos<sup>94,98,122-126</sup> han analizado la seguridad y la eficacia de los diferentes tipos de células en la terapia de pacientes con miocardiopatía dilatada no isquémica. En 2006, Seth et al<sup>122</sup> fueron los primeros que reportaron una mejoría en la clase funcional de la NYHA, una disminución del volumen sistólico ventricular izquierdo y un aumento del 5,4% en la fracción de eyección en 24 pacientes con miocardiopatía dilatada tratados mediante infusión intracoronaria de células mononucleares de médula ósea autóloga. Durante el seguimiento<sup>94</sup> los beneficios funcionales se mantuvieron sin efectos secundarios a largo plazo. También usando infusión intracoronaria de células mononucleares de médula ósea autóloga, Fisher-

## Discusión

---

Rasokat et al<sup>98</sup> observaron en 33 pacientes, una mejora a los tres meses en la función ventricular global y regional, sin cambios en la reserva de flujo coronario, y una disminución significativa en los niveles séricos de BNP un año después del tratamiento.

Vrtovec et al, en su estudio randomizado de un año de seguimiento, aleatorizaron a 55 pacientes con MCD idiopática, FE < 30% en grado funcional  $\geq$  III y con tratamiento médico al menos los seis meses previos a recibir intracoronariamente, sin oclusión previa del vaso, células CD34+ de sangre periférica ( $123 \pm 23 \cdot 10^6$ ) movilizadas mediante factores estimuladores de colonias granulocíticas o grupo control, observando a los tres meses en el grupo tratado tras revisión clínica, ecocardiográfica y test de los 6 minutos, un aumento del 4,6 % en la fracción de eyección, aumento de la capacidad funcional y disminución de los niveles de BNP<sup>126</sup>.

En otros estudios<sup>124,125</sup> tanto las células de sangre periférica como las células madre mononucleares de médula ósea obtenidas por aféresis, cultivadas o no, se inyectaron quirúrgicamente en la pared libre del ventrículo izquierdo, mostrando mejoras en la clase funcional y en el test de los seis minutos, así como una leve mejoría en la fracción de eyección. A pesar de haber realizado inyecciones localizadas, la función ventricular izquierda parece mejorar globalmente<sup>125</sup>. Arom et al, realizaron un estudio con grupo control, en el que se inyectaron en la pared libre ventricular izquierda, precursores de sangre periférica cultivada, sin complicaciones, valorando los resultados mediante ecocardiograma, resonancia magnética cardíaca y test de los 6 minutos, reportando una ganancia en la FE de  $4,4 \pm 10,6\%$ , mejoría en la clase funcional, y disminución de los niveles séricos de BNP, observándose

correlación entre el número de células inyectadas y la mejoría funcional, si bien no saben predecir qué tipo de pacientes se beneficiarán en mayor grado de la terapia<sup>124</sup>.

Sant'Anna et al, reclutaron a quince pacientes con MCD idiopática y disfunción ventricular sistólica severa, FE  $\leq$  35%, en grado funcional III/IV de la NYHA, a los que inyectaron en diez puntos distintos de la pared libre ventricular izquierda  $9,6 \pm 2,6 \cdot 10^7$  células mononucleares de médula ósea, observando una mejoría relativa de la FEVI de más del 15%. Con el objetivo de indagar un poco más en el mecanismo de acción celular, se estudió mediante RMN cardíaca previo al tratamiento y a los 3 meses, el engrosamiento sistólico septal (no tratado) y de la pared libre (tratada), sin encontrar diferencias en la tasa de engrosamiento sistólico absoluta o relativa entre las dos paredes ( $p = 0,866$  y  $1,0$ , respectivamente), cuando las células se inyectaron sólo en la pared libre del ventrículo izquierdo. Por tanto, el trasplante de células mononucleares de médula ósea en la miocardiopatía dilatada idiopática puede mejorar la función ventricular por un efecto global, incluso en áreas en las que no se inyectaron directamente. Este hallazgo apoya la existencia de un mecanismo de acción difusa, en lugar de un efecto local<sup>125</sup>.

Los pacientes seleccionados para nuestro ensayo clínico tenían en común el hecho de padecer miocardiopatía dilatada idiopática con disfunción ventricular severa en tratamiento médico óptimo, a pesar de lo cual presentaban síntomas de insuficiencia cardíaca. Se trata pues, de una serie homogénea de pacientes con alto riesgo y difícil tratamiento. En cualquier caso, el riesgo de mortalidad en estos pacientes es alto, bien por arritmias o bien por el curso natural de su enfermedad.

## Discusión

---

En nuestro estudio de 27 pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática tratados con infusión intracoronaria de células mononucleares de médula ósea autóloga, se demuestra la factibilidad y la seguridad, ya que no se observaron efectos adversos ni durante el procedimiento ni al seguimiento y sugiere que dicha terapia podría llegar a producir una mejora clínica reflejada en su clase funcional y capacidad de ejercicio, así como la reducción significativa en los niveles circulantes de BNP al seguimiento. Además, a los seis meses se observó una disminución significativa en los volúmenes angiográficos telesistólico y telediastólico del ventrículo izquierdo y una ganancia neta media del 9% en la fracción de eyección, que se correlacionaron con los cambios ecocardiográficos observados. La evaluación angiográfica seriada de la función ventricular izquierda demuestra mejoras significativas de los parámetros de la función ventricular global, observados no sólo en los latidos sinusales, sino también en los latidos postextrasistólicos.

En cuanto a la capacidad de reserva coronaria, a diferencia de lo que ocurre en los infartos agudos de miocardio, no existe compromiso de la microcirculación, y por tanto los valores basales son normales, y no se modifican al seguimiento.

La ganancia neta media del 9% en la fracción de eyección observada en nuestros pacientes contrasta con los valores menores observados en otros estudios<sup>94,98</sup>, en los que se efectuó de forma similar infusión intracoronaria de células en pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática (**Tabla 7**). En ellos se describe una reducción significativa del volumen telesistólico del ventrículo izquierdo y de los niveles del BNP al seguimiento, sin cambios sobre el volumen telediastólico ni sobre la capacidad de reserva coronaria.

**TABLA 7.- DIFERENTES ESTUDIOS DE TERAPIA CELULAR EN MIOCARDIOPATIA DILATADA IDIOPÁTICA**

Referencia	Grupo control	Tipo célula	Células infundidas (x10 <sup>9</sup> )	Células CD34+ infundidas (x10 <sup>6</sup> )	Vía administración	FE basal (%)	FE final (%)	Ganancia FE (%)
ABCD <sup>ABCD</sup>	Sí	BMC	1.68±0.96	2.7±1.5	Intracoronaria	22.5±8.3	28.4±11.8	5.9
TOPCARE-DCM	No	BMC	2.59±1.35	--	Intracoronaria	30.2±10.9	33.4±11.5	3.2
Arom et al.	Sí	PSP	0.33±0.36	--	Intramiocárdica	23.9±6.5	28.3±10.7	4.4
Sant'Anna et al.	No	BMC	0.96±0.26	--	Intramiocárdica	19.5±12.3	28.4±15.2	8.9
Vrtovec et al.	Sí	SPe	1.23±0.23	1.23±0.23	Intracoronaria	25.6±5.1	30.1±6.7	4.5
<b>Nuestra Serie</b>	No	BMC	<b>10.2±2.9</b>	40.4±23.6	Intracoronaria	28±9	37±11	<b>9</b>

BMC: Células mononucleares de médula ósea; PSP: Precursores endoteliales de sangre periférica cultivados; SPe: Células CD 34+ de sangre periférica movilizados por G-CSF. FE: fracción de eyección ventrículo izquierdo.



## Discusión

---

Varias razones podrían explicar estas diferencias. Por un lado, en el estudio TOPCARE-DCM<sup>98</sup> tras la infusión intracoronaria de las células mononucleares, repitieron de forma sistemática la angiografía coronaria para comprobar la permeabilidad del vaso, lo que pudo influir negativamente en la capacidad de diferenciación y/o anidamiento de los progenitores hematopoyéticos. Por otro lado, el número total de células CD34+ infundidas directamente en nuestro estudio es casi 20 veces mayor que el publicado previamente.

Apoyando estos datos, se ha observado que los factores de riesgo cardiovascular, se correlacionan inversamente con el número de células CD34/KDR+ circulantes y la respuesta migratoria celular. En un estudio observacional en el que incluyeron a más de 500 pacientes con un seguimiento de doce meses, el número de células progenitoras CD34+/KDR+, se correlacionaba inversamente con la muerte por causas cardiovasculares, eventos cardiovasculares mayores, revascularización y hospitalizaciones<sup>127</sup>.

Además, los sujetos con mayor riesgo de eventos cardiovasculares tenían mayores tasas de senescencia en estudios in-vitro de células progenitoras que los que tienen menor riesgo cardiovascular<sup>128</sup>.

Una mayor concentración de progenitores infundidos localmente en el miocardio podría jugar un papel primordial en proporcionar mejores respuestas funcionales al seguimiento. En estudios experimentales con ratas, Schuster et al<sup>129</sup> observaron que un aumento del número de angioblastos circulando en la zona resultó en una neovascularización dosis-dependiente, con desarrollo de capilares de un tamaño progresivamente mayor. Hoffmann et al<sup>130</sup> monitorizaron el anidamiento miocárdico y la biodistribución de células

madre tras la inyección terapéutica en pacientes con IAM, demostrando que una pequeña fracción de células trasplantadas con infusión intracoronaria anidaron en el miocardio, mientras que no se detectaron células anidadas tras la infusión intravenosa de células marcadas. Por tanto, el número y tipo de células infundidas y la vía de administración pudieran jugar un papel importante. Además del número de células infundidas, parece adquirir una importancia capital el método de adquisición y preparación de las células, ya que pueden influir en la capacidad regenerativa de las mismas.

Sin embargo, en nuestra serie, la ganancia en la fracción de eyección tras la terapia de células varió entre los pacientes. En algunos de ellos, la mejora funcional resulta clara (**Figura 33-34**), mientras que otros no muestran cambios funcionales o incluso empeoran su fracción de eyección, siendo los respondedores significativamente más jóvenes. Sabemos que la edad puede influir en la funcionalidad de la médula ósea. Con la edad, el contenido de grasa de la médula ósea es mayor y el envejecimiento también disminuye la población de células madres y las unidades formadores de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CFU) en la médula ósea, así como las células CD34 +, KDR +, CD133 y los niveles sanguíneos de SDF-1 y IGF-1<sup>131</sup>.

Curiosamente, a las 24 horas, la capacidad migratoria de la suspensión celular a VEGF y SDF-1, fue significativamente inferior en los respondedores. Las células de médula ósea que pueden migrar a lo largo de un gradiente de VEGF en 24 horas son casi todos los progenitores maduros, mientras que las células madres inmaduras realmente necesitan varios días para migrar. Por lo tanto, la ganancia en la fracción de eyección también parece estar

## Discusión

---

relacionado con una menor capacidad de migración de la suspensión de células, con un mayor porcentaje de células inmaduras infundidas. Fisher-Rasokat et al <sup>98</sup> también observaron una correlación inversa significativa, entre el grado de recuperación de la hipocinesia ventricular izquierda y la funcionalidad de las células infundidas, medida por su capacidad de formación de colonias. Estos hallazgos podrían implicar un mayor efecto de la suspensión celular cuando hay una mayor proporción de células no diferenciadas sin capacidad migratoria o de formación de colonias hematopoyéticas. Observaciones similares se observaron en pacientes con infarto de miocardio crónico tratados con infusión intracoronaria de células mononucleares de médula ósea<sup>93</sup>.

Además, se observó una correlación inversa entre la ganancia en la fracción de eyección y los niveles de HDL séricos basales, lo que sugiere una mayor ganancia con los niveles de HDL bajos. En nuestro estudio, los niveles basales de HDL también se correlacionan inversamente con el número de progenitores inmaduros CD 34 +, CD 117 + de las células infundidas. El papel de los niveles de HDL circulantes parece estar siempre en crecimiento. In vitro, el crecimiento celular y la formación de colonias se inhiben en HDL suplementado con suero <sup>132</sup>. In vivo, HDL es bien conocido por promover el eflujo de colesterol desde las células espumosas, y por sus propiedades anti-inflamatorias y anti-aterogénicas<sup>133,134</sup>. HDL contribuye a las características antioxidantes, vasodilatadoras y antitrombóticas y modula la activación de las plaquetas<sup>135</sup> e incluso juega un papel en el sistema inmune<sup>136</sup>. Además, los niveles de HDL en plasma están relacionados con el número de células progenitoras endoteliales circulantes<sup>137</sup>. Tso et al <sup>138</sup> sugieren un papel de HDL en la promoción de la reparación mediada por células progenitoras endoteliales. De hecho,

niveles bajos de HDL son un predictor independiente de la disfunción endotelial<sup>139</sup>. A nivel de la médula ósea, HDL es conocido por suprimir la proliferación de células madre hematopoyéticas<sup>140</sup>. A la inversa, la disminución de los niveles de HDL pueden jugar un papel en la promoción de la proliferación en pacientes con procesos neoplásicos<sup>132,141</sup>. La relación inesperada entre la ganancia en la fracción de eyección y los niveles basales de HDL podría sugerir que los bajos niveles de HDL en plasma podría representar un entorno favorable para la proliferación celular en el miocardio después de la infusión intracoronaria de células mononucleares de médula ósea. Nuestros resultados también sugieren una relación entre la funcionalidad de la médula ósea y los niveles circulantes de HDL colesterol.

Hay un gran interés en la definición del papel de las diferentes enfermedades, medicamentos y otros factores biológicos o fisiológicos en el número de células, así como su función y capacidad angiogénica. La enfermedad coronaria se asocia con una disminución del número de células CD34+ y CD34/KDR+, unidades formadoras de colonias, así como la migración y adhesión celular. La diabetes mellitus también parece poner en peligro el número de células circulantes CD34+, las células progenitoras endoteliales, así como su capacidad angiogénica in-vitro. La hipertensión se asocia con menos células CD34/KDR+, CD34+, así como una disminución de su capacidad de migración y mayor senescencia celular. Además, el anormal metabolismo lipídico puede resultar en menos CD34/KDR+, CD34+, células progenitoras endoteliales, unidades formadoras de colonias, menos migración, proliferación y adhesión, así como menos capacidad angiogénica<sup>128</sup>. Estas observaciones se resumen en la Tabla 8<sup>128</sup>

**TABLA 8.- EFECTO DE LAS DISTINTAS ENFERMEDADES Y FÁRMACOS SOBRE LA FUNCIÓN CELULAR**

	Effect	Diseases	Medications	Other factors
Number	↑	Mi, <sup>10-12</sup> NYHA I HF, <sup>13</sup> NYHA I-II, <sup>14</sup> cardiac syndrome X <sup>15</sup>	Atorvastatin, <sup>16,17</sup> simvastatin, <sup>17</sup> erythropoietin, <sup>18</sup> estrogen, <sup>19</sup> pioglitazone, <sup>20</sup> insulin, <sup>21</sup> IGF-1, <sup>22,23</sup> NTG <sup>24</sup>	Smoking, <sup>25</sup> exercise, <sup>26-29</sup> exercise-induced myocardial ischemia <sup>30</sup>
Number in culture	↓	NYHA III-IV HF, <sup>13,14</sup> HF, <sup>31</sup> HTN, <sup>32,33</sup> CAD, <sup>33-36</sup> DM, <sup>33,36,37</sup> atherosclerosis, <sup>38</sup> hyperlipidemia, <sup>33</sup> diabetic PAD <sup>39,40</sup>	Atorvastatin, <sup>45</sup> ezetimibe, <sup>45</sup> olmesartan, <sup>46</sup> irbesartan, <sup>46</sup> ramipril, <sup>47</sup> erythropoietin, <sup>18</sup> rosiglitazone <sup>48</sup>	LDL, <sup>41</sup> smoking, <sup>41,42</sup> age, <sup>22,33,34,41,43,44</sup> obesity, <sup>50</sup> glucose intolerance <sup>37</sup>
CFU	↑	DM1, <sup>50</sup> DM2 <sup>51</sup>	Pliglitazone, <sup>20</sup> insulin, <sup>59</sup> IGF-1 <sup>22,23,59</sup>	Exercise, <sup>26</sup> exercise-induced myocardial ischemia, <sup>30</sup> hypoxia <sup>49</sup>
Migration	↑	Unstable angina, <sup>54</sup> MI, <sup>11</sup> NYHA I HF, <sup>13</sup> HF <sup>55</sup>	Simvastatin, <sup>61</sup> atorvastatin, <sup>45,62</sup> ramipril, <sup>47</sup> rosiglitazone, <sup>48</sup> pioglitazone, <sup>20</sup> IGF-1 <sup>22</sup> NTG <sup>24</sup>	Smoking, <sup>41</sup> total cholesterol, <sup>52</sup> homocysteine <sup>53</sup>
Proliferation	↓	Chronic ischemic CMP, <sup>56</sup> CAD, <sup>22,35,57</sup> NYHA III-IV HF, <sup>13</sup> transplant arteriopathy, <sup>58</sup> ischemic HF, <sup>31</sup> diabetic PAD, <sup>39</sup> cardiac syndrome X <sup>15,28</sup>	Simvastatin, <sup>16,61</sup> atorvastatin, <sup>16,66</sup> ramipril, <sup>48</sup> pioglitazone <sup>20</sup>	Exercise <sup>29</sup> Total cholesterol/LDL, <sup>60</sup> age <sup>22</sup>
Survival	↑	HTN, <sup>41,63</sup> Stable CAD, <sup>54</sup> ischemic HF <sup>31</sup>	Atorvastatin, <sup>66</sup> valsartan, <sup>68</sup> estrogen, <sup>19</sup> pioglitazone, <sup>20,69</sup> IGF-1, <sup>22</sup> NTG <sup>24</sup>	Exercise, <sup>29</sup> shear stress <sup>67</sup> LDL, <sup>41</sup> total cholesterol, <sup>52</sup> homocysteine, <sup>53</sup> age, <sup>64</sup> smoking <sup>65</sup> Shear stress <sup>67</sup>
Adhesion	↓	HTN <sup>63</sup>	Simvastatin, <sup>70</sup> ramipril, <sup>47</sup> pioglitazone <sup>20</sup>	Total cholesterol, <sup>52</sup> homocysteine, <sup>53</sup> age, <sup>64</sup> smoking <sup>65</sup> Exercise <sup>27</sup> Age <sup>22,64</sup>
<i>In vitro</i> vasculogenic capacity	↑	Diabetic PAD, <sup>39</sup> cardiac syndrome X, <sup>15,28</sup> CAD <sup>28</sup>	Ramipril, <sup>47</sup> erythropoietin <sup>18</sup>	Total cholesterol, <sup>52</sup> homocysteine <sup>53</sup> Shear stress <sup>67</sup>
Tube formation	↓	DM1, <sup>50</sup> DM2, <sup>51</sup> chronic ischemic CMP <sup>56</sup>	IGF-1 <sup>22</sup>	Total cholesterol, <sup>52</sup> smoking <sup>65</sup>
CD34+ <sup>11,12,14,18,24,33,35,36,37,40,44</sup>	↑	DM2, <sup>51</sup> cardiac syndrome X <sup>15</sup>		
CD34/KDR+ <sup>10,15,16,17,19,20,25,27,30,32,34,37-41</sup>	↓			
CD 34/133+ <sup>15,21,31,43</sup>	↑			
CD34/CD133/KDR+ <sup>13,42</sup>	↓			
CD133/VEGf/cadherin + <sup>26</sup>	↑			
CD133/KDR+ <sup>22,23</sup>	↓			

Abbreviations: CMP, cardiomyopathy; HF, heart failure; HTN, hypertension; IGF-1, insulin like growth factor 1; LDL, low-density lipoprotein; NTG, nitroglycerin; NYHA, New York Heart Association; PAD, peripheral artery disease.

Es crucial tener en cuenta estos hallazgos a la hora de diseñar una terapia efectiva basada en células autólogas. Se ha convertido en un hecho más que evidente que el número y las propiedades funcionales de las células madre derivadas de pacientes con enfermedad cardiovascular, pueden mejorar al menos parcialmente por el tratamiento farmacológico. Curiosamente, las estatinas parecen aumentar el número de células progenitoras CD34/KDR+, el número de células CD34+ en sangre periférica y la diferenciación de células mononucleares en progenitores endoteliales, después de cuatro semanas de terapia en pacientes con enfermedad coronaria estable. Por lo tanto, las estatinas podrían acelerar el proceso de reendotelización. Además, se ha encontrado que las estatinas pueden disminuir la senescencia celular y modular la expresión de genes del ciclo celular de las células progenitoras endoteliales<sup>128</sup>.

La evaluación general del impacto del tratamiento con células mononucleares de médula ósea es muy difícil. En primer lugar por la enorme heterogeneidad de los ensayos clínicos realizados hasta la fecha, unos basados en pacientes con infarto de miocardio reciente, otros con isquemia crónica u otro tipo de miocardiopatías como la miocardiopatía dilatada idiopática. En segundo lugar, en ellos se han utilizado distintos tipos celulares, por lo que los resultados, no pueden ser comparados directamente. Por otra parte, incluso comparar los ensayos que utilizaron el mismo tipo de células es difícil, ya que han utilizado diferentes procedimientos de aislamiento y almacenamiento celular, así como la vía de administración.

## Discusión

---

Los estudios futuros deberían tender a definir la técnica óptima de preparación celular, estandarizar los procedimientos de separación celular y evaluación de la calidad del producto final, descubrir el mejor tipo de célula, cantidad necesaria a infundir, la técnica ideal de administración, así como tratar de establecer las indicaciones de la terapia celular en las diversas enfermedades cardiacas. Para ello, así como para conocer los mecanismos relacionados con la reparación cardiaca, es esencial la cooperación entre la investigación pre-clínica y clínica.

Aunque el número de pacientes de este ensayo es pequeño y no se trata de un estudio aleatorizado, presenta un poder estadístico suficiente para detectar cambios significativos en la fracción de eyección en pacientes que durante doce meses o más no habían experimentado ninguna mejoría de la misma con el tratamiento convencional. El objetivo principal fue determinar la seguridad y eficacia, ambos de los cuales tuvieron resultados favorables. El número de pacientes considerados como no respondedores es pequeño, pero se observan dos grupos cuyas respuestas a la terapia de células fueron claramente diferentes y puede ser un punto de interés para estudios posteriores.

## **6. CONCLUSIONES**





**1.-** La inyección intracoronaria de células mononucleares de médula ósea en nuestro estudio produjo una ganancia funcional media del 9%, así como una reducción significativa de los volúmenes ventriculares.

**2.-** El tratamiento regenerativo con células madre derivadas de la médula ósea en pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática y disfunción ventricular severa es factible y seguro. No se produjeron complicaciones relacionadas con la infusión celular ni en cualquier otro procedimiento del protocolo de estudio

**3.-** Esta recuperación funcional también parece proporcionar una mayor reserva contráctil, como se deduce de la potenciación postextrasistólica obtenida en el seguimiento.

**4.-** Los pacientes que tuvieron una respuesta positiva en la función ventricular mejoraron su grado funcional

**5.-** La mejoría en la función ventricular se mantuvo al año de seguimiento

**6.-** La ganancia funcional obtenida es mayor de lo que se ha publicado en la literatura, y lo atribuimos a que el número de células inyectadas en nuestro estudio es considerablemente mayor

7.- Los pacientes más jóvenes con miocardiopatía dilatada idiopática y niveles plasmáticos más bajos de HDL parecen tener mayor beneficio funcional tras terapia celular. La mejoría funcional también parece aumentada en aquellos pacientes con capacidad migratoria más baja de las células infundidas.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



- <sup>1</sup> Elliott, P. Cardiomyopathy. Diagnosis and management of dilated cardiomyopathy. *Heart* 2000;84(1):106-112
- <sup>2</sup> Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2008;29(2):270-276
- <sup>3</sup> Taylor MR, Carniel E, Mestroni L. Cardiomyopathy, familial dilated. *Orphan J Rare Dis* 2006;1:27.:27
- <sup>4</sup> Jefferies JL, Towbin JA. Dilated cardiomyopathy. *Lancet* 2010;375(9716):752-762
- <sup>5</sup> Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, et al: ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 112e154, 2005.
- <sup>6</sup> Flather MD, Yusuf S, Kober L, et al: Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: A systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. *Lancet* 355:1575,2000.
- <sup>7</sup> Dickstein, K, Cohen-Solal, A, Filippatos, G, et al. Guía de la práctica clínica de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) para el diagnóstico y tratamiento de la insuficiencia cardiaca aguda y crónica (2008). *Rev. Esp. Cardiol.* 2008;61(12):1329.e1-1329.e70

## Bibliografia

---

- <sup>8</sup> McMurray J, Aedtamopoulos S, Anker S, et al: ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *European Heart Journal* (2012) 33, 1787-1847
- <sup>9</sup> The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet*. 1999; 353:9-13
- <sup>10</sup> Packer M, Coats AJ, Fowler MB, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, et al. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J. Med.* 2001; 344:1651-8.
- <sup>11</sup> Packer M, Fowler MB, Roecker EB, Coast AJ, Katus HA, Krum H, et al. Effects of carvedilol on the morbidity of patients with severe chronic heart failure: results of the carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) study. *Circulation*. 2002;106:2194-9
- <sup>12</sup> Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet*. 1999; 353:2001-7.
- <sup>13</sup> Hjalmarson A, Goldstein S, Fagerberg B, Wedel H, Waagstein F, Kjeksus J, et al. Effects of controlled-release metoprolol on total mortality, hospitalizations, and well-being in patients with heart failure: the Metoprolol CR/XL, Randomized Intervention Trial in congestive heart failure (MERIT-HF). MERIT-HF Study group. *JAMA*. 2000; 283:1295-302
- <sup>14</sup> Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart

- failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N. Engl J. Med.* 1999;341:709-17.
- <sup>15</sup> Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 2003;348:1309-21.
- <sup>16</sup> Granger CB, McMurray JJ, Yusuf S, Held P, Michelson EL, Olofsson B, et al. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-alternative trial. *Lancet* 2003;362:772-6.
- <sup>17</sup> Cohn JN, Tognomi G. A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med.* 2001;345:1667-75.
- <sup>18</sup> McMurray JJ, Ostergren J, Swedberg K, Granger CB, Held P, Michelson EL, et al. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function taking angiotensin-converting-enzyme inhibitors:the CHARM-Added trial. *Lancet.* 2003;362:767-71
- <sup>19</sup> Maggioni AP, Anand I, Gottlieb SO, Latini R, Tognoni G, Cohn JN. Effects of valsartan on morbidity and mortality in patients with heart failure not receiving angiotensin converting enzyme inhibitors. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1414-1421
- <sup>20</sup> Zannad F, McMurray JJ, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, Vincent J, Pocock SJ, Pitt B. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* 2011; 364:11-21



## Bibliografia

---

- <sup>21</sup> Swedberg K, Komajda M, Bohm M, Borer JS, Ford I, Dubost-Brama A, Lerebours G, Tavazzi L. Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 2010;376:525-533.
- <sup>22</sup> Cohn JN, Johnson G, Ziesche S, Cobb F, Francis G, Tristani F, et al. A comparison of enalapril with hydralazine-isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure. *N Engl J Med*. 1991;325:303-10.
- <sup>23</sup> Taylor AL, Ziesche S, Yancy C, Carson P, D'Agostino R Jr, Ferdinand K, et al. Combination of isosorbide dinitrate and hydralazine in blacks with heart failure. *N Engl J Med*. 2004;351:2049-57.
- <sup>24</sup> Loeb HS, Johnson G, Henrick A, Smith R, Wilson J, Cremo R, et al. Effect of enalapril, hydralazine plus isosorbide dinitrate, and prazosin on hospitalization in patients with chronic congestive heart failure. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group *Circulation*. 1993;87 Suppl:V178-87.
- <sup>25</sup> Moss AJ, Hall WJ, Canom DS, Klein H, Brown MW, Daubert JP, et al. Cardiac-resynchronization therapy for the prevention of heart-failure events. *N Engl J Med*. 2009;361:1329-38.
- <sup>26</sup> Linde C, Gold M, Abraham WT, Daubert JC. Rationale and design of a randomized controlled trial to assess the safety and efficacy of cardiac resynchronization therapy in patients with asymptomatic left ventricular dysfunction with previous symptoms or mild heart failure- The Resynchronization reVERrses Remodeling in Systolic left vEntricular dysfunction (REVERSE) Study. *Am Heart J*. 2006;151:288-94.

- <sup>27</sup> Dickstein K, Vardas PE, Auricchio A, Daubert JC, Linde C, McMurray J, et al. Actualización detallada 2010 de la guía de práctica clínica de la ESC sobre la terapia con dispositivos para la insuficiencia cardiaca. *Rev Esp Cardiol*.2010;63(12):e1-e13.
- <sup>28</sup> Anderson L, Miyazaki C, Sutherland G, Oh J. Patient selection and echocardiographic assessment of dyssynchrony in cardiac resynchronization therapy. *Circulation*. 2008;117:2009-23.
- <sup>29</sup> Chung ES, Leon AR, Tavazzi L, Sun JP, Nihoyannopoulos P, Merlino J, et al. Results of the Predictors of response to CRT (PROSPECT) trial. *Circulation*. 2008;117:2608-16.
- <sup>30</sup> Abraham WT, Fisher WG, Smith AL, Delugio DB, Leon AR, Loh E, et al. Cardiac resynchronization in chronic heart failure. *N Engl J Med*. 2002;346:1845-53.
- <sup>31</sup> Bristow MR, Saxon LA, Boehmer J, Krueger S, Kass DA, De Marco T, et al. Cardiac-resynchronization therapy with or without an implantable defibrillator in advanced chronic heart failure. *N Engl J Med*. 2004;350:2140-50.
- <sup>32</sup> Cleland JG, Daubert JC, Erdmann E, Freemantle N, Gras D, Kappelerberger L, et al. The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure. *N Engl J Med*. 2005;352:1539-49.
- <sup>33</sup> Rivero-Ayerza M, Theuns DA, Garcia-Garcia HM, Boersma E, Simoons M, Jordaens LJ. Effects of cardiac resynchronization therapy on overall mortality and mode of death: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur Heart J*. 2006;27:2682-8.

## Bibliografia

---

- <sup>34</sup> Cleland JG, Daubert JC, Erdmann E, Freemantle N, Gras D, Kappenberger L, et al. Longer-term effects of cardiac resynchronization therapy on mortality in heart failure (the CArdiac Resynchronization-Heart Failure (CARE-HF) trial extension phase). *Eur Heart J*. 2006;27:1928-32.
- <sup>35</sup> Bardy GH, Lee KL, Mark DB, Poole JE, Packer DL, Boineau R, et al. Amiodarone or an implantable cardioverter-desfibrillator for congestive heart failure. *N Engl J Med*. 2005;352:225-37.
- <sup>36</sup> Desai AS, Fang JC, Maisel WH, Baughman KL. Implantable desfibrillators for the prevention of mortality in patients with nonischemic cardiomyopathy: a meta-analysis of randomized controlled trial. *JAMA*. 2004;292:2874-9.
- <sup>37</sup> Miller LW, Pagani FD, Russell SD, John R, Boyle AJ, Aaronson KD, et al. Use of a continuous-flow device in patients awaiting heart transplantation. *N Engl J Med*. 2007;357:885-96.
- <sup>38</sup> Stevenson LW, Shekar P. Ventricular assist devices for durable support. *Circulation*. 2005;112e111-5.
- <sup>39</sup> Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 387-403.
- <sup>40</sup> Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002; 30: 896-904.

- <sup>41</sup> Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002; 8: 607-612.
- <sup>42</sup> Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234.
- <sup>43</sup> Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705.
- <sup>44</sup> Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; 105: 369-377.
- <sup>45</sup> Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416: 542-545.
- <sup>46</sup> Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; 422: 897-901.
- <sup>47</sup> Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; 416: 545-548.
- <sup>48</sup> Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; 297: 2256-2259.

## Bibliografia

---

- <sup>49</sup> Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
- <sup>50</sup> Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 2002; 159: 123-134.
- <sup>51</sup> Armitage JO. Medical progress: bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1994; 330: 827-838.
- <sup>52</sup> Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002; 346: 5-15.
- <sup>53</sup> Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32:11-16.
- <sup>54</sup> Korbiling M, Katz RL, Khanna A, Ruifrok AC, Rondon G, Albitar M et al. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002; 346: 738-746.
- <sup>55</sup> Martin-Rendon E, Watt SM. Stem cell plasticity. *Br J Haematol* 2003; 122: 877-891.
- <sup>56</sup> LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 2002; 111: 589-601.

- <sup>57</sup> Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000; 164: 247-256.
- <sup>58</sup> Koc ON, Lazarus HM. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 235-239.
- <sup>59</sup> Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; 107: 1395-1402.
- <sup>60</sup> Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller RF, Verfaillie CM. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100 Suppl 1: 11854-11860.
- <sup>61</sup> Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H et al. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 2000; 288: 1660-1663.
- <sup>62</sup> Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R et al. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 2002; 157: 851-864.
- <sup>63</sup> Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 778-784.
- <sup>64</sup> Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49.

## Bibliografia

---

- <sup>65</sup> Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422: 901-604.
- <sup>66</sup> Rideout WM, 3RD, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 2001; 293: 1093-1098.
- <sup>67</sup> Odelberg SJ, Kollhoff A, Keating MT. Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by *msx1*. *Cell* 2000; 103: 1099-1109.
- <sup>68</sup> Beltrami AP, Urbanek k, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R et al. Evidence that human myocytes divide alter myocardial infarction. *N Eng J Med* 2001; 344:1750-1757.
- <sup>69</sup> Quaini F, Urbanek K. Beltrami AP, Finato, N. Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J. Leri A, Anversa P. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*. 2002;346:5–15.
- <sup>70</sup> Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, Beltrami CA, Bussani R, Beltrami AP, Quaini F, Bolli R, Leri A, Kajstura J, Anversa P. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:8692– 8697.
- <sup>71</sup> Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114:763–766.

- <sup>72</sup> Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman NL, Schneider MD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100: 12313–12318.
- <sup>73</sup> Linke A, Muller P, Nurzynska D, Casarsa C, Torella D, Nascimbene A, Castaldo C, Cascapera S, Bohm M, Quaini F, Urbanek K, Leri A, Hintze TH, Kajstura J, Anversa P. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:8966–8971.
- <sup>74</sup> Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, Kim YJ, Soo Lee D, Sohn DW, Han KS, Oh BH, Lee MM, Park YB. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet*. 2004 Mar 6;363(9411):751-6.
- <sup>75</sup> Valgimigli M, Rigolin GM, Cittanti C, Malagutti P, Curello S, Percoco G, Bugli AM, Della Porta M, Bragotti LZ, Ansani L, Mauro E, Lanfranchi A, Giganti M, Feggi L, Castoldi G, Ferrari R. Use of granulocyte-colony stimulating factor during acute myocardial infarction to enhance bone marrow stem cell mobilization in humans: clinical and angiographic safety profile. *Eur Heart J*. 2005 Sep;26(18):1838-45.
- <sup>76</sup> Zohlnhöfer D, Ott I, Mehilli J, Schömig K, Michalk F, Ibrahim T, Meisetschläger G, von Wedel J, Bollwein H, Seyfarth M, Dirschinger J, Schmitt C, Schwaiger M, Kastrati A, Schömig A; REVIVAL-2 Investigators. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute



## Bibliografía

---

- myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2006 Mar 1;295(9):1003-10.
- <sup>77</sup> Ripa RS, Jørgensen E, Wang Y, Thune JJ, Nilsson JC, Søndergaard L, Johnsen HE, Køber L, Grande P, Kastrup J. Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial. *Circulation*. 2006 Apr 25;113(16):1983-92. Epub 2006 Mar 12.
- <sup>78</sup> Suárez de Lezo J, Torres A, Herrera I, Pan M, Romero M, Pavlovic DJ, et al. Effects of stem-cell mobilization with recombinant human granulocyte colony stimulating factor in patients with percutaneously revascularized acute anterior myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol* 2005;58:238-40.
- <sup>79</sup> Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002 Oct 8;106(15):1913-8.
- <sup>80</sup> Schächinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Oct 19;44(8):1690-9.
- <sup>81</sup> Fernández-Avilés F, San Román JA, García-Frade J, Fernández ME, Peñarrubia MJ, de la Fuente L, Gómez-Bueno M, Cantalapiedra A, Fernández J, Gutierrez

- O, Sánchez PL, Hernández C, Sanz R, García-Sancho J, Sánchez A. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res.* 2004 Oct 1;95(7):742-8. Epub 2004 Sep 9.
- 82 Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet.* 2004 Jul 10-16;364(9429):141-8.
- 83 Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation.* 2006 Mar 14;113(10):1287-94.
- 84 Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006 Sep 21;355(12):1210-21.
- 85 Assmus B, Honold J, Schächinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006 Sep 21;355(12):1222-32.

## Bibliografia

---

- <sup>86</sup> Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2006 Jan 14;367(9505):113-21.
- <sup>87</sup> Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Grøgaard HK, Bjørnerheim R, Brekke M, Müller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006 Sep 21;355(12):1199-209.
- <sup>88</sup> Suarez de Lezo J, Herrera C, Pan M, Romero M, Pavlovic D, Segura J, et al. Tratamiento regenerativo en pacientes con infarto agudo anterior revascularizado y función ventricular deprimida. *Rev. Esp Cardiol*. 2007;60(4):357-65.
- <sup>89</sup> Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Bartsch T, Schannwell C, Antke C, Sorg RV, Kögler G, Wernet P, Müller HW, Köstering M. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Nov 1;46(9):1651-8.
- <sup>90</sup> Silva GV, Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Assad JA, Vaughn WK, Mesquita CT, Belém L, Carvalho AC, Dohmann HJ, Barroso do Amaral E, Coutinho J, Branco R, Oliveira E, Willerson JT. Catheter-based transendocardial delivery of autologous bone-marrow-derived mononuclear

- cells in patients listed for heart transplantation. *Tex Heart Inst J.* 2004;31(3):214-9.
- <sup>91</sup> Hüttmann A, Dührsen U, Stypmann J, Noppeney R, Nüchel H, Neumann T, Gutersohn A, Nikol S, Erbel R. Granulocyte colony-stimulating factor-induced blood stem cell mobilisation in patients with chronic heart failure--Feasibility, safety and effects on exercise tolerance and cardiac function. *Basic Res Cardiol.* 2006 Jan;101(1):78-86. pub 2005 Oct 21.
- <sup>92</sup> Archundia A, Aceves JL, López-Hernández M, Alvarado M, Rodriguez E, Díaz Quiroz G, Páez A, Rojas FM, Montaña LF. Direct cardiac injection of G-CSF mobilized bone-marrow stem-cells improves ventricular function in old myocardial infarction. *Life Sci.* 2005 Dec 5;78(3):279-83.
- <sup>93</sup> Suárez de Lezo J, Herrera C, Romero MA, Pan M, Jiménez R, Carmona D et al. Recuperación funcional tras infusión intracoronaria de células mononucleadas de médula ósea autóloga en pacientes con infarto crónico anterior y depresión severa de la función ventricular. *Rev Esp Cardiol.* 2010;63(10):1127-35
- <sup>94</sup> Seth S, Bhargava B, Narang R, Ray R, Mohanty S, Gulati G, et al. AIIMS Stem Cell Study Group. The ABCD (Autologous Bone Marrow Cells in Dilated Cardiomyopathy) trial a long-term follow-up study. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1643-1644.
- <sup>95</sup> Kalil RAK, Ott D, Sant'Anna R, et al. Autologous transplantation of bone marrow mononuclear stem cells by mini-thoracotomy in dilated cardiomyopathy: technique and early results. *Sao Paulo Med J* 2008; 126:75–81.

## Bibliografía

---

- <sup>96</sup> Wang JA, Xie XJ, He H, et al. A prospective, randomized, controlled trial of autologous mesenchymal stem cells transplantation for dilated cardiomyopathy. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2006;34:107–10.
- <sup>97</sup> Kaparathi PLN, Gupta N, Lakshmi K, et al. Autologous bone marrow mononuclear cell delivery to dilated cardiomyopathy patients: a clinical trial. *Afr J Biotechnol* 2008; 7:207–10
- <sup>98</sup> Fischer-Rasokat U, Assmus B, Seeger FH, Honold J, Leistner D, Fichtlscherer S, et al. A Pilot Trial to Assess Potential Effects of Selective Intracoronary Bone Marrow-Derived Progenitor Cell Infusion in Patients With Nonischemic Dilated Cardiomyopathy: Final 1-Year Results of the Transplantation of Progenitor Cells and Functional Regeneration Enhancement Pilot Trial in Patient With Dilated Cardiomyopathy. *Circ Heart Fail* 2009;2:417-423
- <sup>99</sup> Gálvez-Montón C, Prat-Vidal C, Roura S et al. Ingeniería tisular cardiaca y corazón bioartificial. *Rev. Esp. Cardiol.* 2013;66(5):391-399
- <sup>100</sup> Chachques JC, Trainini JC, Lago N, Cortes-Morichetti M, Schussler O, Carpentier A. Myocardial Assistance by Grafting a New Bioartificial Upgraded Myocardium (MAGNUM trial): clinical feasibility study. *Ann Thorac Surg.* 2008;85:901–8.
- <sup>101</sup> REgeneration of CARDiac Tissue Assisted by Bioactive Implants. Disponible en: [www.recatibi.com](http://www.recatibi.com)
- <sup>102</sup> Ott H, Matthiesen T, Goh S, Black L et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine.* 2008;14,2,213-221

- <sup>103</sup> Lacis A, Erglis A. Intramyocardial administration of autologous bone marrow mononuclear cells in a critically ill child with dilated cardiomyopathy. *Cardiol Young*. 2011 Feb;21(1):110-2.
- <sup>104</sup> Rupp S, Jux C, Bönig H; Bauer J, Tonn T, Seifried E et al. Intracoronary bone marrow cell application for terminal heart failure in children. *Cardiol Young*. 2012 Feb 13:1-6
- <sup>105</sup> Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282: 1145-7.
- <sup>106</sup> Solter D, Gearhart J. Putting stem cells to work. *Science* 1999;283: 1468-70.
- <sup>107</sup> Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002.
- <sup>108</sup> Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 10344-9.
- <sup>109</sup> Suárez de Lezo J, Pan M, Romero M, Segura J, Sancho M: "Determinantes de recuperabilidad funcional tras tratamiento trombolítico". *Rev Esp Cardiol* 1988; 41: 426-436.
- <sup>110</sup> Suárez de Lezo J, Concha M, Velasco F, et al. Recanalización coronaria precoz seguida de cirugía revascularizadora en la fase aguda del infarto de miocardio. *Rev Esp Cardiol* 1983; 36: 99-111.

## Bibliografía

---

- <sup>111</sup> Suárez de Lezo J, Arizón JM, Franco M, et al. Efectos de la recanalización coronaria precoz sobre el infarto agudo de miocardio. *Rev Lat Cardiol* 1984; 5: 463-474.
- <sup>112</sup> Gibbons RJ, Balady GJ, Beasley JW, Bricker JT, Duvernoy WF, Froelicher VF, et al. ACC/AHA Guidelines for Exercise Testing. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Exercise Testing). *J Am Coll Cardiol* 1997;30:260-311.
- <sup>113</sup> Zoghbi WA, Enriquez-Sarano M, Foster E, Grayburn PA, Kraft CD, Levine RA, et al. American Society of Echocardiography. Recommendations for evaluation of the severity of native valvular regurgitation with two-dimensional and Doppler echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2003;16:777-802
- <sup>114</sup> Dyke SH, Cohn B, Gorlin R, Sonnemblick EH. Detection of residual myocardial function in coronary artery disease using post-extrasystolic potentiation. *Circulation* 1974; 50: 694-9.
- <sup>115</sup> Sheehan FH, Mathey DG, Schofer J, Krebber HJ, Dodge HT. Effect of interventions in salvaging left ventricular function in acute myocardial infarction: a study of intracoronary streptokinase. *Am J Cardiol* 1983;52:431-8.
- <sup>116</sup> Doucette JW, Corl PD, Payne HM, Flynn AE, Goto M, Nassi M, Segal J. Validation of a Doppler guide wire for intravascular measurement of coronary artery flow velocity. *Circulation* 1992; 85: 1899-1911.

- <sup>117</sup> Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2005;112:1128-1135.
- <sup>118</sup> Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Woitowicz V, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, et al. Simultaneous autologous transplantation of cocultured mesenchymal stem cells and skeletal myoblasts improves ventricular function in a murine model of Chagas disease. *Circulation* 2006;114:120-124.
- <sup>119</sup> Chen Y, Liu W, Li W, Gao C. Autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation improves left ventricular function in a rabbit model of dilated cardiomyopathy. *Exp Mol Pathol* 2010;88:311-315.
- <sup>120</sup> Lin YC, Leu S, Sun CK, Yen CH, Kao YH, Chang LT, et al. Early combined treatment with sildenafil and adipose-derived mesenchymal stem cells preserves heart function in rat dilated cardiomyopathy. *J Transl Med* 2010;8:88.
- <sup>121</sup> Mu Y, Cao G, Zeng Q, Li Y. Transplantation of induced bone marrow mesenchymal stem cells improves the cardiac function of rabbits with dilated cardiomyopathy via upregulation of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Exp Biol Med* 2011;236:1100-1107.
- <sup>122</sup> Seth S, Narang R, Bhargava B, Ray R, Mohanty S, Gulati G, et al. AIIMS Cardiovascular Stem Cell Study Group. Percutaneous intracoronary cellular cardiomyoplasty for nonischemic cardiomyopathy: clinical and histopathological results: the first-in-man ABCD (Autologous Bone Marrow Cells in Dilated Cardiomyopathy) trial. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:2350-2351.



## Bibliografia

---

- <sup>123</sup> Theiss HD, David R, Engelmann MG, Barth A, Schotten K, Naebauer M, et al. Circulation of CD34+ progenitor cell populations in patients with idiopathic dilated and ischaemic cardiomyopathy (DCM and ICM). *Eur Heart J* 2007;28:1258-1264.
- <sup>124</sup> Arom KV, Ruengsakulrach P, Belkin M, Tiensuwan M. Intramyocardial angiogenic cell precursors in nonischemic dilated cardiomyopathy. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2009;17: 382-388.
- <sup>125</sup> Santanna RT, Kalil RA, Pretto Neto AS, Pivatto Júnior F, Fracasso J, Sant'anna JR, et al. Global contractility increment in nonischemic dilated cardiomyopathy after free wall-only intramyocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells: an insight over stem cells clinical mechanism of action. *Cell Transplant* 2010;19:959-964.
- <sup>126</sup> Vrtovec B, Poglajen G, Sever M, Lezaic L, Domanovic D, Cernele P, et al. Effects of intracoronary stem cell transplantation in patients with dilated cardiomyopathy. *J Card Fail* 2011;17:272-281.
- <sup>127</sup> Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005;353:999-1007.
- <sup>128</sup> Alaiti M, Ishikawa M and Costa, M. Bone marrow and circulating stem/progenitor cells for regenerative cardiovascular therapy. *Translational Research*. 2010 Sep;156(3):112-29
- <sup>129</sup> Schuster MD, Kocher A, Seki T, Martens TP, Xiang G, Homma S, et al. Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:525-32.

- <sup>130</sup> Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B et al. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation* 2005;111:2198-202.
- <sup>131</sup> Tuljapurkar SR, McGuire TR, Brusnahan SK, Jackson JD, Garvin KL, Kessinger MA, et al. Changes in human bone marrow fat content associated with changes in hematopoietic stem cell numbers and cytokine levels with aging. *J Anat* 2011;219:574-581.
- <sup>132</sup> Yung BY, Bor AM. Identification of high-density lipoprotein in serum to determine anti-cancer efficacy of doxorubicin in HeLa cells. *Int J Cancer* 1992;50:951-957.
- <sup>133</sup> Tall AR. Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *J Intern Med* 2008;263:256-273.
- <sup>134</sup> Murphy AJ, Akhtari M, Tolani S, Pagler T, Bijl N, Kuo CL, et al. ApoE regulates hemotopoietic stem cell proliferation, monocytois, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. *J Clin Invest* 2011;121:4138-49.
- <sup>135</sup> Barlage S, Boettcher D, Boettcher A, Dada A, Schmitz G. High density lipoprotein modulates platelet function. *Cytometry A* 2006;69:196-199.
- <sup>136</sup> Norata GD, Pirillo A, Ammirati E, Catapano AL. Emerging role of high density lipoproteins as a player in the immune system. *Atherosclerosis* 2012;220:11-21.

## Bibliografia

---

- <sup>137</sup> Pellegatta F, Bragheri M, Grigore L, Raselli S, Maggi FM, Brambilla C, et al. In vitro isolation of circulating endothelial progenitor cells is related to the high density lipoprotein plasma levels. *Int J Mol Med* 2006;17:203-208.
- <sup>138</sup> Tso C, Martinic G, Fan WH, Rogers C, Rye KA, Barter PJ. High-density lipoproteins enhance progenitor-mediated endothelium repair in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1144-1149.
- <sup>139</sup> Higashi Y, Matsuoka H, Umei H, Sugano R, Fujii Y, Soga J, et al. Endothelial function in subjects with isolated low HDL cholesterol: role of nitric oxide and circulating progenitor cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298:E202-E209.
- <sup>141</sup> Yvan-Charvet L, Pagler T, Gautier EL, Avagyan S, Siry RL, Han S, et al. ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science* 2010;328:1689-1693.
- <sup>142</sup> Chawda JG, Jain SS, Patel HR, Chaduvula N, Patel K. The relationship between serum lipid levels and the risk of oral cancer. *Indian J Med Paediatr Oncol* 2011;32:34-37.

## **8. ANEXOS**



## 8.1.- Anexo 1. Índice de Tablas

---

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.-</b> Tratamiento farmacológico en la insuficiencia cardiaca con disfunción sistólica	26
<b>Tabla 2.-</b> Datos basales de los pacientes incluidos en el estudio	115-116
<b>Tabla 3.-</b> Características de las células infundidas	118
<b>Tabla 4.-</b> Hallazgos ecocardiográficos y ergoespirometria	122
<b>Tabla 5.-</b> Hallazgos angiográficos y hemodinámicos	126-127
<b>Tabla 6.-</b> Análisis univariado en pacientes respondedores y no respondedores	137
<b>Tabla 7.-</b> Diferentes estudios de terapia celular en miocardiopatía dilatada idiopática	151
<b>Tabla 8.-</b> Efecto de las distintas enfermedades y fármacos sobre la función celular	156

---

## 8.2.-Anexo 2. Índice de Figuras

---

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.-</b> Estrategia de tratamiento en pacientes con insuficiencia cardiaca sintomática y disfunción sistólica	19
<b>Figura 2.-</b> Modelo jerárquico de las células madre en función de su potencialidad	36
<b>Figura 3.-</b> Diferenciación de células madre mesenquimales a adipocitos y vasos sanguíneos	41
<b>Figura 4.-</b> Posibles mecanismos de potencialidad de las células madre adultas	48
<b>Figura 5.-</b> Obtención de células madre de médula ósea y vías de administración	51
<b>Figura 6.-</b> Protocolo de estudio TECAM-Pacing	63
<b>Figura 7.-</b> Ingeniería tisular cardiaca. Dibujos de los diferentes abordajes	70
<b>Figura 8.-</b> Imágenes de los diferentes pasos de decelularización en un corazón de rata, donde se objetiva que conserva su geometría característica. Inmunofluorescencia en tejido cardiaco de corazones de cadáver y decelulados, sin observarse en estos últimos núcleos celulares.	71

---

---

	<b>Página</b>
<b>Figura 9.-</b> Neorganogénesis: corazón bioartificial. Esquema gráfico de los diferentes pasos de la descelularización y recelularización de un corazón	72
<b>Figura 10.-</b> Imágenes de corazón humano previo a la decelularización y tras ella	74
<b>Figura 11.-</b> Coronariografía basal y postratamiento en paciente pediátrico con coronaria anómala intervenida	78
<b>Figura 12.-</b> Cambios producidos en el electrocardiograma tras recuperar la coronaria izquierda	79
<b>Figura 13.-</b> Obtención de células madre en paciente lactante.	80
<b>Figura 14.-</b> Estudio ecocardiográfico en las proyecciones apical de cuatro y dos cámaras. Cálculo de los volúmenes y de la FEVI sin contraste (A) y con contraste intravenoso (B)	98
<b>Figuras 15.-</b> Ejemplo análisis angiográfico de una ventriculografía	103
<b>Figura 16.-</b> Reserva coronaria basal y tras adenosina	104
<b>Figura 17.-</b> Procesamiento de médula ósea	106
<b>Figura 18.-</b> Evolución grado funcional	120

---



---

	<b>Página</b>
<b>Figura 19.-</b> Evolución del BNP al seguimiento	121
<b>Figura 20 .-</b> Evolución ecocardiográfica de la fracción de eyección	123
<b>Figura 21 y 22.-</b> Evolución ecocardiográfica de los volúmenes ventriculares	123-124
<b>Figura 23.-</b> Reducción del grado de insuficiencia mitral por ecocardiografía a los 3 meses y al año	125
<b>Figura 24.-</b> Evolución angiográfica de la fracción de eyección	128
<b>Figura 25 y 26.-</b> Evolución angiográfica de los volúmenes ventriculares	128-129
<b>Figura 27.-</b> Evolución angiográfica del número de cuerdas hipoquinéticas	129
<b>Figuras 28.-</b> Evolución angiográfica de los segmentos de contracción anormal	130
<b>Figura 29.-</b> Ventriculografía basal y al seguimiento	131

---

---

	<b>Página</b>
<b>Figura 30.-</b> Evolución angiográfica de la fracción eyección postextrasistólica	132
<b>Figura 31.-</b> Reducción de la insuficiencia mitral angiográfica en el seguimiento	133
<b>Figura 32.-</b> Cambios individuales en la fracción de eyección	134
<b>Figura 33.-</b> Ganancia fracción de eyección en pacientes respondedores y no respondedores	135
<b>Figura 34.-</b> Ganancia fracción de eyección en pacientes respondedores y no respondedores en latido postextrasistólico	136
<b>Figura 35.-</b> Edad de los pacientes en función de su respuesta funcional	138
<b>Figura 36.-</b> Relación entre los niveles de HDL colesterol y fracción de eyección	139
<b>Figura 37.-</b> Relación entre colesterol HDL y número de células CD34+/CD117+.	140
<b>Figura 38.-</b> Cambios en la fracción de eyección en latido sinusal al seguimiento	141

---

---

	<b>Página</b>
<b>Figura 39 .-</b> Cambios en la fracción de eyección en latido postextrasistólico al seguimiento	142
<b>Figura 40.-</b> Cambios en el número de cuerdas hipoquinéticas al seguimiento	142
<b>Figura 41.-</b> Cambios en los segmentos de contracción anormal al seguimiento	143

---