



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS

TESIS DOCTORAL

**Tratamiento Regenerativo en Pacientes  
con Infarto de Miocardio Anterior Extenso**

Javier Suárez de Lezo Herreros de Tejada

**Las Palmas de Gran Canaria**

## Anexo II

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

Departamento: Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas

Programa de Doctorado: Avances en Medicina Interna

**Título de la Tesis**

# **Tratamiento Regenerativo en Pacientes con Infarto de Miocardio Anterior Extenso**

Tesis Doctoral presentada por D. Javier Suárez de Lezo Herreros de Tejada

Dirigida por el Dr. D. José Suárez de Lezo Cruz Conde  
Codirigida por el Dr. D. Alfonso Medina Fernández-Aceytuno

**El Director:**

**El Codirector:**

**El Doctorando:**

Las Palmas de Gran Canaria. Mayo 2008



## **1. INTRODUCCIÓN**

1.1 Tratamiento del IAM. Perspectiva histórica.....	2
1.1.1 Creación de las unidades coronarias.....	3
1.1.2 Unidades móviles de tratamiento coronario.....	5
1.1.3 Introducción del tratamiento fibrinolítico.....	6
1.1.4 Reperusión mecánica.....	8
1.1.5 Avances en el tratamiento antitrombótico.....	15
1.2 Bases de la medicina regenerativa.....	32
1.2.1 Características de las células madre (CM).....	32
1.2.2 Clasificación según su potencialidad.....	33
1.2.3 CM derivadas de médula ósea (MO).....	36
1.2.4 Pluripotencialidad y CM no derivadas de MO.....	42
1.2.5 Hipótesis sobre el mecanismo de acción de las CM.....	44
1.3 Experiencia con CM derivadas de MO en la cardiopatía isquémica.....	47
1.3.1 Infusión intracoronaria de CM derivadas de MO en el IAM.....	49
1.3.2 Uso del G-SFC en el IAM.....	51
1.3.3 Tratamiento regenerativo en la cardiopatía isquémica crónica.....	52

## **2.JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....54**

## **3.MATERIAL Y MÉTODOS.....61**

3.1 Pacientes.....	62
3.1.1 Estudio observacional con G-CSF en pacientes con IAM.....	62
3.1.2 Estudio comparativo entre la infusión intracoronaria de CM y la movilización masiva de CM con G-CSF en pacientes con IAM .....	64

3.1.3 Evaluación de la infusión de CM derivadas de MO en pacientes con cardiopatía isquémica crónica. Estudio observacional .....	66
3.1.4 Evaluación de los cambios electrocardiográficos en pacientes con tratamiento regenerativo.....	68
3.2 Cateterismo cardiaco diagnóstico y terapéutico.....	70
3.2.1 Estudio observacional con G-CSF en pacientes con IAM.....	70
3.2.2 Estudio comparativo entre la infusión intracoronaria de CM y la movilización masiva de CM con G-CSF en pacientes con IAM.....	71
3.2.3 Evaluación de la infusión de CM derivadas de MO en pacientes con cardiopatía isquémica crónica. Estudio observacional .....	72
3.3 Estudio de función ventricular.....	73
3.4 Estudio vascular: medición de reserva coronaria.....	75
3.5 Movilización con G-CSF y estudios de laboratorio.....	76
3.6 Obtención y preparación de células madre.....	78
3.7 Infusión intracoronaria de células madre.....	81
3.8 Estudio estadístico.....	81
<b>4.RESULTADOS.....</b>	<b>83</b>
4.1 Estudio observacional con G-CSF en pacientes con IAM.....	84
4.2 Estudio comparativo entre la infusión intracoronaria de CM y la movilización masiva de CM con G-CSF en pacientes con IAM .....	94
4.3 Evaluación de la infusión de CM derivadas de MO en pacientes con cardiopatía isquémica crónica. Estudio observacional .....	103
4.4 Evaluación de los cambios electrocardiográficos en pacientes con tratamiento regenerativo.....	107

<b>5.DISCUSIÓN.....</b>	<b>109</b>
5.1 Estudio observacional con G-CSF en pacientes con IAM.....	110
5.2 Estudio comparativo entre la infusión intracoronaria de CM y la movilización masiva de CM con G-CSF en pacientes con IAM .....	115
5.3 Evaluación de la infusión de CM derivadas de MO en pacientes con cardiopatía isquémica crónica. Estudio observacional .....	122
5.4 Evaluación de los cambios electrocardiográficos en pacientes con tratamiento regenerativo.....	126
5.5 Nuevas perspectivas.....	127
<b>6.CONCLUSIONES.....</b>	<b>132</b>
<b>7.BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>135</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Tratamiento del infarto agudo de miocardio. Perspectiva histórica.

A principios del s. XIX el infarto agudo de miocardio (IAM) era considerado una mera curiosidad médica<sup>1</sup>. Aunque el término angina fue acuñado por William Heberden<sup>2</sup> en 1768, no fue hasta el siguiente siglo cuando se empezó a conocer la fisiopatología de la enfermedad coronaria, y los factores de riesgo que influían en el desarrollo de la misma.

En 1880 Carl Weigert<sup>3</sup> encontró una fuerte asociación entre oclusión coronaria y el infarto, y posteriormente Sir William Osler demostró que la oclusión de una rama coronaria con un trombo era un hallazgo común en los cadáveres de pacientes que habían fallecido por un infarto. En 1916 James Herrick<sup>4</sup> anunciaba el beneficio que producía el reposo prolongado en pacientes que habían sufrido un IAM y en 1928, Parkinson y Bedford<sup>5</sup> recomendaban el uso de la morfina para mitigar el dolor de la angina. Estas terapias se constituyeron como el pilar fundamental del tratamiento del IAM durante décadas. Aunque el beneficio de la aspirina para prevenir el infarto había sido reportado a principio de los años 50<sup>6-8</sup>, no se había demostrado el beneficio de este medicamento en la fase aguda del infarto. Durante la década de los 50 se estandarizó el uso de oxígeno y de fluidos intravenosos, así como la administración de atropina subcutánea y papaverina seguido de nitroglicerina sublingual para prevenir el espasmo coronario. Además los anticoagulantes se añadieron al cocktail terapéutico rutinario para prevenir el reinfarto y la trombosis mural.

Por tanto, hasta la década de los 50, el arsenal terapéutico del que se disponía para el tratamiento del IAM era puramente paliativo, y las cifras de mortalidad se situaban en torno al 30 - 35 %<sup>9</sup>, y ésta se producía fundamentalmente por la frecuente aparición de arritmias

cardíacas malignas, pero estos datos de mortalidad eran referidos al ámbito hospitalario, es decir a la mortalidad del IAM una vez que el paciente llegaba a la puerta del hospital. Por tanto, son cifras que se refieren a la etapa hospitalaria. Ya entonces se estimaba que, fuera del hospital la mortalidad era mayor, llegándose a cifras entre un 50 y un 70 % del total de fallecimientos<sup>10</sup>. A partir de ahí el tratamiento del infarto evolucionó gracias a una serie de hechos trascendentes.

### **Estos hechos son los siguientes:**

- 1.- Creación de las Unidades Coronarias
- 2.- Aparición de unidades móviles de tratamiento coronario.
- 3.- Introducción del tratamiento fibrinolítico.
- 4.- Introducción de la reperfusión mecánica
- 5.- Avances en la terapia antitrombótica

#### **1.1.1 Creación de las unidades coronarias**

La puesta en marcha en los años 60 y 70 de las Unidades Coronarias, supuso una drástica reducción de la mortalidad hospitalaria hasta cifras comprendidas entre el 15 y el 20%<sup>11-12</sup>, gracias fundamentalmente al cuidado específico y monitorización estrecha de la patología crítica, al descubrimiento y aplicación de la desfibrilación en estas unidades, al desarrollo de los primeros fármacos antiarrítmicos en los años 70, y posteriormente a la

incorporación de medidas específicas contra el shock cardiogénico, la estimulación eléctrica cardíaca, etc. Con una monitorización estrecha y el diagnóstico y tratamiento precoz de las complicaciones del infarto, se consiguió reducir la mortalidad. Sin embargo, no se actuaba limitando el tamaño del infarto. Se trataba de una actitud activa dentro de la pasividad, ya que nada impedía la historia natural de cada proceso necrótico. A pesar del avance obtenido con la creación de las unidades coronarias, la mayoría de los infartos fallecían antes de llegar a los hospitales con dichas unidades. En este sentido, el BEECIM<sup>13</sup> (Balance Epidemiológico Español contra el Infarto Agudo de Miocardio), en 1991, demostró lo que diferentes autores venían avanzando desde hacía casi una década: era tal la importancia de la demora en la atención inicial a estos enfermos (más de 7 horas de media en el territorio español), que permitía que la mayor parte de los IAM fallecieran antes de su llegada a los hospitales con unidades coronarias, en el medio extra hospitalario, no beneficiándose por tanto de todas aquellas medidas que habían sido establecidas para su tratamiento dentro de éstos. La mortalidad en la fase extra hospitalaria seguía siendo del 42% en los primeros 30 minutos y llegaba a cifras cercanas al 70 % en las primeras 2 horas.

Las Unidades Coronarias también contribuyeron al estudio de la fisiopatología aguda del IAM. Con la llegada de técnicas hemodinámicas como el catéter de Swan-Ganz<sup>14</sup> fue posible analizar en cada paciente la presión de llenado del ventrículo izquierdo, la presión arterial pulmonar, de ventrículo derecho y la presión venosa central. Ello, junto a la determinación seriada del índice y gasto cardíaco y la monitorización de la presión sistémica permitía dibujar en cada paciente la fisiopatología de su proceso. El esquema de Forrester<sup>15-16</sup>

permitía individualizar las medidas terapéuticas en función del índice cardiaco y de la presión de llenado del ventrículo izquierdo. De este modo, se administraban fluidos cuando era necesario, se betabloqueaba la excesiva descarga adrenérgica de algunos o se usaban inotropos o nitroglicerina intravenosa en función de las necesidades de cada paciente. Estos avances tampoco suponían detener el proceso necrótico puesto en marcha, aunque algunas medidas eran capaces de enlentecerlo.

### 1.1.2 Unidades móviles de tratamiento coronario

El segundo hecho histórico fue la aparición de las primeras unidades de tratamiento extra hospitalario de la patología coronaria, en concreto en la URSS por Moiseev en 1962, en Irlanda por Pantridge<sup>17</sup> en 1966 o EEUU por Grace<sup>18</sup> en 1969. Con ello, se introduce un factor entonces revolucionario en el tratamiento de los síndromes coronarios agudos, al situar el nivel de tratamiento especializado fuera del ámbito hospitalario, allá donde se producen los primeros síntomas de la enfermedad. Pantridge analiza la mortalidad prehospitalaria del IAM, demostrando que la introducción de una "Unidad Móvil" para el tratamiento específico de la enfermedad triplicaba el impacto de la disminución de la mortalidad por las medidas anteriores, al acercar éstas a la comunidad hasta los periodos temporales en los que mayor mortalidad se producía.

En Virginia (EEUU), Crampton et al<sup>19</sup> sólo con el uso de unidades de soporte vital avanzado y asistencia cardiológica urgente, disminuyeron la mortalidad por IAM durante el

transporte en un 62%, el beneficio obtenido fue una disminución general de mortalidad en menores de 70 años del 26%, siendo la desfibrilación la única medida introducida por ellos.

En España, el BEECIM<sup>13</sup> demostró que al inicio de los años 90, la demora media producida en el intervalo temporal "síntoma-soporte coronario" era de 8 horas, 9 minutos, siendo de tan solo un 8'4% el porcentaje de los enfermos afectados por IAM que ingresaban en el hospital tras haber sido atendidos y/o transportados por Unidades de Soporte Vital Avanzado.

### 1.1.3 Introducción del tratamiento fibrinolítico

El inicio de la era de la estreptoquinasa data de 1933, cuando William Tiltet<sup>20</sup> descubrió de forma casual la capacidad del streptococo hemolítico de disolver un coágulo. En 1947, Sol Sherry aceptó la invitación de Tiltet de hacerse cargo de investigar el potencial terapéutico de esta nueva droga. Durante la siguiente década iniciaron una serie de ensayos clínicos con estreptoquinasa en pacientes con diversas enfermedades, siendo utilizada con éxito por su poder fibrinolítico en exudados pleurales con fibrina<sup>21</sup>, en el hemotórax<sup>22</sup> y en la meningitis tuberculosa<sup>23</sup>. En 1952 Tiltet usó con éxito estreptoquinasa para lisar un trombo inducido en las venas marginales de la oreja de un ratón<sup>24</sup>. Más tarde Fletcher et al<sup>25</sup> realizaron un estudio en pacientes a los que administraba de forma prolongada cantidades masivas de estreptoquinasa durante periodos prolongados de tiempo tras haber sufrido un infarto. Excepto por la aparición de hemorragias en unos pocos pacientes no hubo

complicaciones significativas, y la mortalidad de los pacientes que habían recibido estreptoquinasa era significativamente menor que en aquellos que habían recibido otro tratamiento. En 1959 Ruegsegger<sup>26</sup> disolvió por primera vez un trombo intracoronario en un modelo animal. A pesar de estos resultados prometedores, la droga cayó en el olvido y dejó de producirse por sus efectos pirogénicos. Posteriormente, en la década de los 60 diversos grupos europeos rescataron la estreptoquinasa y realizaron diversos ensayos en el seno del IAM<sup>27-35</sup> sin obtener claros beneficios, probablemente porque las dosis utilizadas eran ínfimas. Rentrop<sup>36</sup> en 1979, basándose en los estudios de Chazov<sup>37</sup>, utilizó por primera vez la estreptokinasa intracoronaria, iniciándose así la era del tratamiento fibrinolítico (figura 1).

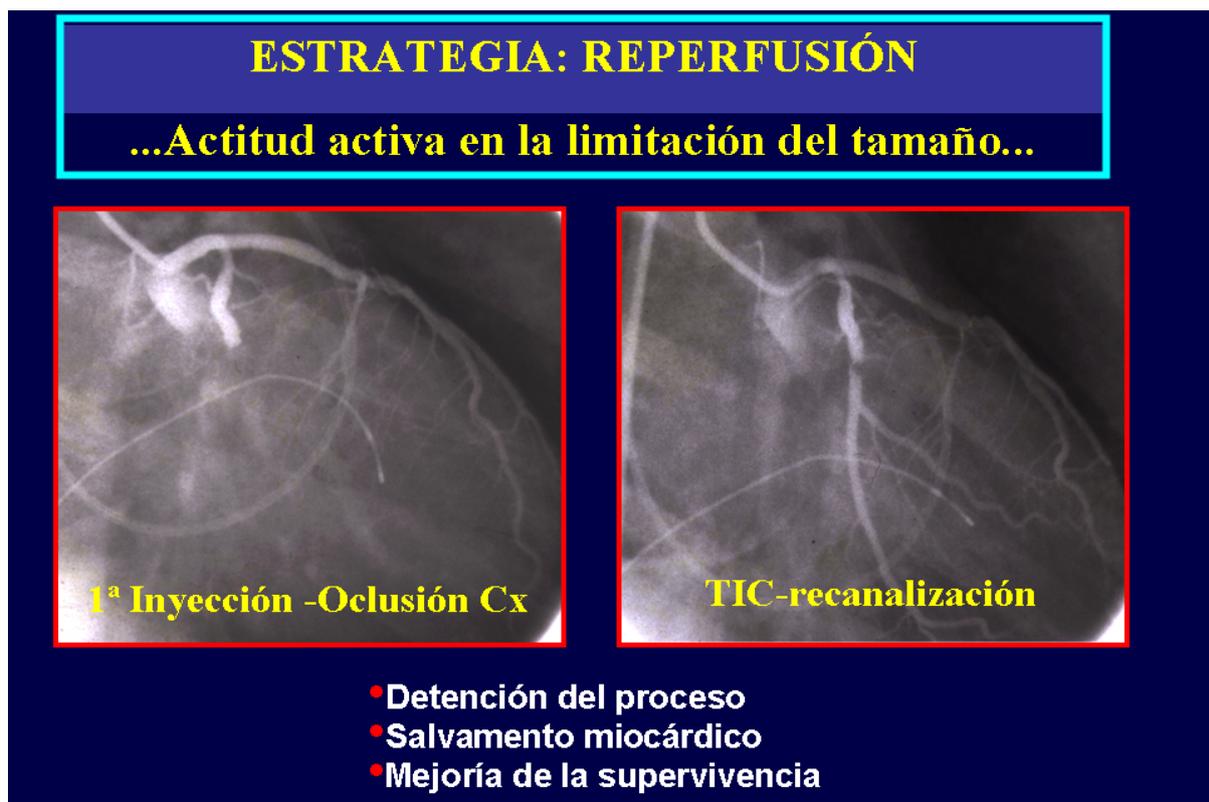


Figura 1. fibrinólisis intracoronaria . Situación basal que muestra oclusión de la circunfleja (Cx) con posterior recanalización tras la administración intracoronaria de estreptoquinasa

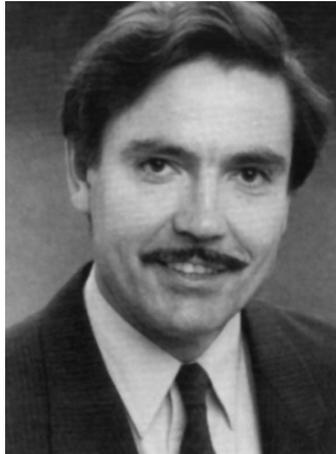
Por otro lado, De Wood<sup>38</sup> ya había demostrado angiográficamente la fisiopatología de la trombosis coronaria y Braunwald<sup>39</sup> en 1980 había establecido la relación directa entre el tamaño del IAM y la mortalidad, incorporándose rápidamente al tratamiento del IAM medidas tendentes a la apertura precoz del vaso. Con ello se perseguía la reperfusión precoz de la zona infartada y por tanto la limitación del tamaño final de la zona de necrosis. Así, se conseguía no solo la disminución de la mortalidad, sino un salvamento miocárdico y con ello una importante mejoría en la calidad de vida tras el episodio agudo y por fin tener una actitud activa en la limitación del tamaño del infarto. Con el inicio de la reperfusión se analizaron los determinantes de recuperabilidad funcional<sup>40</sup> tras la misma, objetivándose una correlación entre el tamaño del infarto y el tiempo de reperfusión, una mayor recuperabilidad de la función ventricular cuando la arteria responsable era la descendente anterior (infartos anteriores) o cuando se presentaban con una fracción de eyección deprimida, especialmente en aquellos casos con mayor potenciación postextrasistólica, es decir, con mayor reserva contráctil.

### **1.1.4 Reperfusión mecánica**

El padre de la radiología intervencionista, Charles Dotter, un radiólogo vascular de la Universidad de Oregón en Portland, introdujo la angioplastia transluminal en 1964, trabajando con Melvin Judkins. Dotter utilizó múltiples catéteres para aumentar la luz y desobstruir arterias de los miembros inferiores con enfermedad aterosclerótica. A pesar de su innovación, debido a la resistencia filosófica de la comunidad quirúrgica, a la dificultad para

reproducir sus técnicas y a la aparición de complicaciones, la angioplastia fue rechazada e ignorada en los EEUU durante los siguientes 15 años.

Tras aprender las técnicas de Dotter en Nuremberg, Andreas Grüentzig, (figura 2) un joven médico alemán que trabajaba en el Hospital Universitario de Zurich, Suiza, comenzó a soñar con la idea de añadir un balón a los catéteres de Dotter, empezando a crear prototipos en su propia cocina e investigando sobre el diseño de posibles materiales viables. En 1975 inventó un catéter de doble luz equipado con un balón de clorhidratopolivinilo que representaría el nacimiento de una revolución en medicina. Grüentzig presentó los resultados de su balón en experimentación animal durante la reunión de la American Heart Association (AHA) de 1976, donde fueron recibidos con escepticismo general, aunque algunos supieron reconocer el potencial de sus trabajos. El Dr. Richard Myler del Saint Mary's Hospital en San Francisco le propuso su colaboración para la realización de la primera angioplastia coronaria, la cual se efectuó de forma intraoperatoria durante una intervención de bypass. El 16 de Septiembre de 1977, en Zurich, Grüentzig marcó un hito en la cardiología intervencionista, al efectuar de forma programada la primera angioplastia coronaria transluminal percutánea con catéter balón en un humano despierto<sup>41</sup>. Y sería aquel mismo año, cuando presentó en la reunión de la AHA en 1977 los resultados de sus primeras cuatro angioplastias; y en esta ocasión la comunidad científica irrumpió en una ovación, como reconocimiento a su descubrimiento.



**Fig 2. Dr. Andreas Grüentzig**

La angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP) inauguró la era del “intervencionismo coronario”. En sus inicios la ACTP se reservó para pacientes con lesiones coronarias cortas, concéntricas, no calcificadas, situadas en segmentos arteriales proximales, rectos y sin que estuviesen afectos ramos marginales en bifurcación. Esta selección refleja las limitaciones que, en aquellos momentos, presentaba el material de dilatación disponible y la desconfianza acerca de la respuesta al barotrauma de las lesiones más complejas. La falta de experiencia en la evolución clínica subsiguiente aconsejaba, por otra parte, limitar el procedimiento a los pacientes que presentaran angina no controlable con el tratamiento médico máximo y a aquellos que fueran buenos candidatos para revascularización quirúrgica, en caso de que la angioplastia fallara.

Desde entonces y hasta el momento actual, la técnica de ACTP no sólo se ha convertido en un tratamiento aceptado para un reducido grupo de pacientes con enfermedad aterosclerótica coronaria, sino que ha expandido sus indicaciones en el terreno clínico (angor

inestable, infarto agudo de miocardio, disfunción ventricular<sup>42,43</sup> y anatómico (lesiones calcificadas, en segmentos distales, excéntricas, en ángulo, en bifurcación, en injertos de vena safena o de arteria mamaria<sup>44</sup> y en la enfermedad multivaso<sup>45</sup> o de tronco<sup>46</sup>). Las indicaciones de la angioplastia han ido creciendo paralelo a los avances tecnológicos, que han logrado crear sistemas con elevado empuje, alta navegabilidad, muy dirigibles y de bajo perfil con los que es posible el acceso a casi cualquier tipo de lesión situada a cualquier nivel del árbol coronario. De igual importancia ha sido el desarrollo de nuevas generaciones de angiografía digital, que mejoran espectacularmente la imagen radiológica e introducen la posibilidad de cuantificación angiográfica automática inmediata.

Con la llegada de los stents se da un paso más en el tratamiento percutáneo de las lesiones coronarias, ya que se consigue solucionar parte de las limitaciones de la angioplastia con balón. Por un lado, ante una disección obstructiva provocada por una dilatación con balón, la expansión de un stent puede eliminar el colgajo de la luz y fijar el desgarro de la íntima en la pared arterial, lo que normaliza la geometría luminal y las condiciones reológicas locales, resolviendo la eventual situación de isquemia aguda secundaria<sup>47-49</sup>. Por otra parte, la implantación de un stent proporciona una situación de rigidez capaz de neutralizar la recuperación elástica de la arteria (recoil) y de desplazar el volumen estenosante en sentido subadventicial, permitiendo obtener una luz de gran amplitud que elimina las turbulencias. Así se compensaba la reacción hiperplásica, reduciéndose la probabilidad de reestenosis<sup>50,51</sup>. Sin embargo, a pesar de estos beneficios, su uso en el síndrome coronario agudo, en una etapa inicial estaba proscrito, ya que por un lado, la acción mecánica de la dilatación y la implantación de un stent provocaba denudación endotelial y desestructuración de la pared con

rotura de placa, principales fenómenos desencadenantes de la adhesión, activación y agregación plaquetaria, y de la trombosis coronaria, y además el síndrome coronario agudo es el escenario más protrombótico de la enfermedad coronaria, por lo que se consideraba que la colocación de una endoprótesis metálica en este contexto podía derivar en una oclusión trombótica del stent.

El 4 de Noviembre de 1993, y basándose en experiencias previas con stents en lesiones trombóticas, el grupo de Las Palmas comandado por el Dr. Medina implantó por primera vez un stent primario en la fase aguda de un infarto de miocardio en un paciente con oclusión de la arteria obtusa marginal (figura 3). Con ello, se conseguía una reperfusión completa así como un atrapamiento de contenido trombótico, evitándose además reoclusiones posteriores. Lo evidente de los resultados hicieron repetirlo en otros pacientes del grupo CORPAL, obteniendo pronto una serie de pacientes para su publicación. La tabla 1 refleja la suerte que corrió el intento de su publicación. Después de varios intentos frustrados sin razones claras por “lobbies” científicos interesados, la primera serie mundial vio la luz 2 años más tarde en una de las revistas intentadas con un número de pacientes inferior, por un grupo Canadiense.

La publicación CORPAL acabó en la Revista Española de Cardiología<sup>52</sup>, con la constatación evidente de una ciencia menos ciencia, por ser injusta e interesada. Desde entonces el uso del stent en la fase aguda del infarto fue aceptado por la comunidad científica.

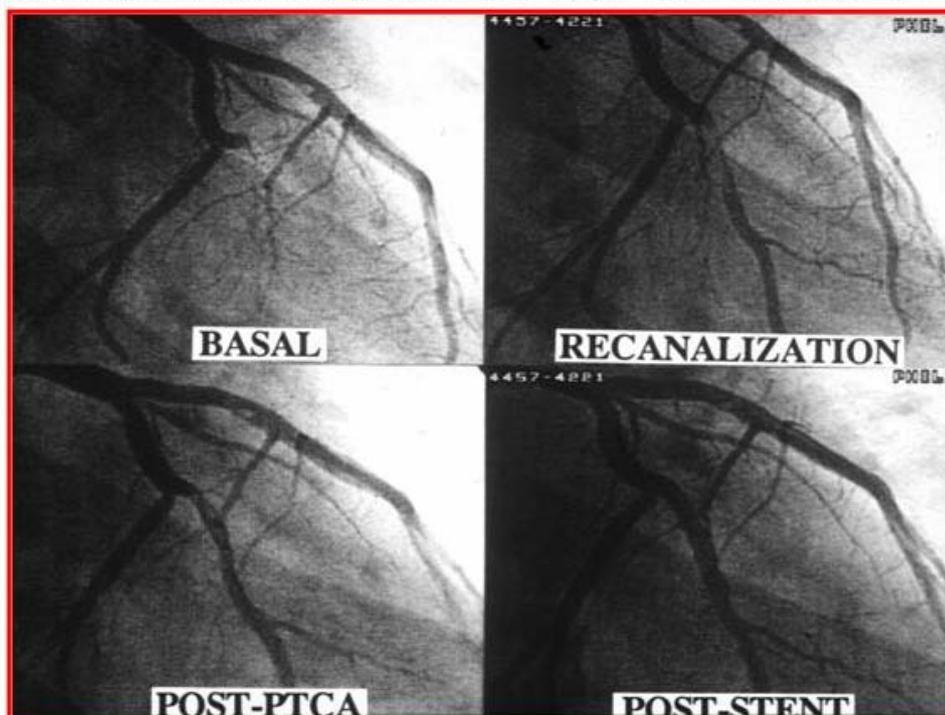
**PRIMER STENT EN IAM, LAS PALMAS, 4 NOVIEMBRE 1993**

Figura 3 Primer stent en el IAM por el equipo del Dr. Medina

La introducción de nuevos dispositivos que permiten el tratamiento de lesiones desfavorables y de las complicaciones que pueden ocurrir con la angioplastia convencional (aterectomía direccional, el rotablator, el láser y los stents) y el uso de mecanismos de apoyo hemodinámico (perfusión coronaria, soporte cardiopulmonar femoro-femoral, balón de contrapulsación...), han permitido que la angioplastia se realice ahora con mayor confianza y seguridad, incluso en pacientes anteriormente considerados de riesgo inaceptablemente alto.

**TABLA 1. Distintos intentos de publicación del uso del stent en el IAM**

Título	Journal	Fecha envío	Fecha rechazo	Sórdidos comentarios
“Palmaz-Shatz stent for acute myocardial infarction: a preliminary report” (n=10)	Cath Cardiovasc Intervent	18-VII-94	3-IX-94	...”informed consent probably mentioned to pleased the editorial board...” ...”Since reasoning is missing nothing remains but the heroism of the interventionalist who’ve done it...”
“Palmaz-Shatz stent for acute myocardial infarction” (n=16)	<u>AM J Cardiol</u>	12-XII-94	22-III-95	...”The authors do not include issues in vascular biology and how it relates to the clinical course of patients in the time period after stent deployment for acute myocardial infarction...”
“Primary stent treatment for acute evolving myocardial infarction” (n=31)	Eur Heart J	12-V-95	2-IX-95	Ni siquiera
<b>Primer estudio observacional publicado:</b>				
<u>Am J Cardiol</u> 1996;77:451-454; (n=9)				

De forma paralela se han desarrollado regimenes antitrombóticos que han reducido dramáticamente la incidencia de trombosis agudas o subagudas.

La ACTP primaria consiste en realizar esta técnica como primera elección de tratamiento inmediatamente después de las medidas estándar de tratamiento inicial sin que el enfermo haya recibido ningún otro tratamiento trombolítico. Ventajas claras de la ACTP primaria son la alta tasa del reperfusión precoz (de hasta el 90-95%)<sup>53</sup> y de Flujo TIMI 3, que debe sumarse a una drástica reducción de hemorragias, sobre todo intracraneal, además de a otras ventajas evidentes como es el conocimiento de la anatomía coronaria del paciente, el acortamiento de las estancias y la posibilidad de implantar un stent en el mismo acto que

impide una reoclusión de la arteria. Diferentes estudios epidemiológicos han enfrentado los resultados de mortalidad, revascularización, pronóstico, etc, a corto y medio plazo, entre la ACTP primaria y la Fibrinólisis en pacientes afectos de IAM. Uno de los subestudios realizados sobre el Gusto II (Gusto IIb)<sup>54</sup>, enfrentó los resultados de los pacientes que fueron tratados con ACTP primaria sobre los tratados con fibrinolítico (t-PA). Los datos obtenidos demostraron que aunque el beneficio de mortalidad resultante en el grupo de la ACTP no era estadísticamente significativo, si lo era cuando se asociaban finalmente los resultados de muerte, reinfarto no letal e ictus incapacitante.

### **1.1.5 Avances en el tratamiento antitrombótico**

Hace aproximadamente 150 años Virchow propuso una triada de factores para explicar la patogenia de la trombosis: cambios en la pared vascular, anomalías del flujo sanguíneo y alteración de los componentes de la coagulación que favorecen una situación de hipercoagulabilidad, la cual sigue vigente en la actualidad. La activación de las plaquetas y de los mecanismos de coagulación promueve la aparición de trombosis, un proceso que se ve modulado por proteínas anticoagulantes circulantes y por el sistema fibrinolítico; la pared vascular emerge como una compleja estructura de naturaleza antitrombótica en su forma natural, pero que se transforma a un fenotipo protrombótico cuando es activada o lesionada; por último, el flujo sanguíneo también es importante, no sólo porque facilita el aclaramiento de factores de coagulación activados, sino por favorecer el contacto de las plaquetas y otras células de la sangre con la pared vascular.

En 1950 se establecieron dos vías distintas de activación de la coagulación: la vía extrínseca, que se monitoriza con el tiempo de protrombina, y la vía intrínseca que se mide con el tiempo de coagulación o el tiempo de tromboplastina parcial. En la actualidad se asume que la activación de la coagulación in vivo se inicia tras exposición del factor tisular (FT) localizado en el núcleo necrótico de las placas ateroscleróticas o expuesto tras lesión vascular. El FT se une al factor VII y el complejo resultante activaría los factores IX y X de la coagulación. En presencia de calcio, el factor X se une al factor V sobre superficies fosfolipídicas, presentes en la membrana de las plaquetas, para formar el complejo protrombinasa, el cual a su vez activa la protrombina para generar la trombina, que constituye un enzima central en el mecanismo hemostático, ya que activa las plaquetas y los factores V, VIII y X, y convierte el fibrinógeno en fibrina. La coagulación sanguínea es modulada por tres sistemas: la antitrombina, que en presencia de su cofactor heparina inhibe la trombina y otros factores de la coagulación, la proteína C que es activada por el complejo trombina-trombomodulina y actúa como anticoagulante degradando los factores Va y VIIIa, y el sistema inhibitor de la vía extrínseca que, formando un complejo con el factor Xa, inactiva el factor VIIa<sup>55</sup>.

Las plaquetas van a jugar un papel esencial en la trombogénesis, contribuyendo decisivamente a los procesos de vasoespasmo, aterosclerosis y trombosis característicos de numerosas enfermedades vasculares localizadas en el territorio arterial.

En la formación de un trombo arterial intervienen los procesos de adhesión, activación y agregación plaquetar. Cuando se produce una lesión vascular, la matriz subendotelial queda

expuesta al torrente circulatorio. Esta matriz contiene sustancias que inducen la adhesión de plaquetas al endotelio a través del receptor GpIb/IX. La activación plaquetaria se consigue a través de un sistema de señales de transducción que implica a diversas sustancias que inducen un aumento de la concentración intracelular de calcio y la liberación de componentes intraplaquetarios como el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), que es un potente agonista de la activación plaquetaria, con actividad vasoconstrictora. La activación plaquetaria conlleva en último término la activación de otra integrina, el receptor Gp IIb/IIIa. Una vez activado, este receptor es capaz de unirse al fibrinógeno soluble y a otros ligandos haciendo que las plaquetas se agreguen y formen un verdadero trombo. Así pues, la unión del fibrinógeno al receptor Gp IIb/IIIa plaquetario representa la vía final común de la formación del trombo arterial<sup>56</sup>.

Los avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares que intervienen en la trombogénesis han dado lugar al desarrollo de nuevos fármacos antitrombóticos<sup>57</sup>.

### 1.1.5.1 Antiagregantes

#### Aspirina

El ácido acetyl salicílico (aspirina) fue introducido en la práctica médica al inicio del siglo XX. A finales de 1970, Vane demostró que la aspirina inhibe la síntesis de prostaglandinas y en 1975 Roth y Majerus establecieron su exacto mecanismo de acción, que consiste en la acetilación irreversible del enzima ciclo-oxigenasa plaquetaria e inhibición de la formación de TXA<sub>2</sub><sup>58</sup>.

En la cardiopatía isquémica se ha demostrado la eficacia de dosis bajas de aspirina (80-350 mg/24 h). La administración de la menor dosis eficaz (75-100 mg/24 h) es la mejor estrategia para reducir los efectos secundarios. Es mejor administrar el fármaco diariamente, ya que en días alternos puede ser menos eficaz debido a una gran variabilidad individual en la producción de nuevas plaquetas.

Las dosis bajas de aspirina están indicadas en el tratamiento de la angina estable, los síndromes coronarios agudos, en el intervencionismo coronario percutáneo asociado con otros fármacos antiplaquetarios, la cirugía de revascularización coronaria y la prevención primaria (grupos de alto riesgo) y secundaria<sup>59,60</sup>. La aspirina está contraindicada en pacientes con hemorragia gastrointestinal, ya que la inhibición de la COX-1 reduce la prostaciclina y su protección sobre la mucosa gástrica.

### **Inhibidores del ADP: tienopiridinas**

La ticlopidina y su análogo clopidogrel son antagonistas no competitivos, pero selectivos de la agregación plaquetar inducida por ADP. La eficacia de la ticlopidina ha sido demostrada de forma convincente en pacientes con alto riesgo de procesos tromboembólicos arteriales, incluyendo accidentes cerebrovasculares isquémicos, cardiopatía isquémica y arteriopatía periférica, pero tiene el inconveniente potencial de producir depresión de la médula ósea con pancitopenia periférica, lo que obliga a una monitorización rigurosa<sup>61</sup>. Más recientemente se ha empleado clopidogrel que, si bien no está exento de efectos secundarios, habiéndose descrito casos de microangiopatía trombótica<sup>62</sup>, parece ser menos tóxico que la ticlopidina y posee un claro efecto beneficioso en la prevención de trombosis arteriales tras

intervenciones coronarias<sup>63-64</sup> y en síndromes cardiovasculares de naturaleza aterosclerótica, como ha podido demostrarse en el ensayo multicéntrico CAPRIE<sup>65</sup>.

### **Antagonistas de los receptores Gp IIb/IIIa**

Por su mecanismo de acción se pueden considerar dos tipos de familias de fármacos antagonistas de la GpIIb/IIIa plaquetaria: los que bloquean de forma permanente los receptores plaquetarios, como el abciximab, y los que inhiben de forma competitiva y reversible, siendo su efecto dependiente de la concentración plasmática, como es el caso de las moléculas sintéticas<sup>66-67</sup>.

Abciximab: se trata de un anticuerpo monoclonal de origen murino (7E3), que posteriormente ha sido modificado para reducir su inmunogenicidad originando el abciximab (Reopro), sustancia que se une al receptor GpIIb/IIIa e inhibe la unión de ligandos de adhesión como el fibrinógeno y el factor Willebrand, bloqueando así la formación del trombo.

El abciximab produce una inhibición plaquetaria dosis-dependiente, observándose una reducción de la función plaquetaria prácticamente completa cuando el 80% de los receptores están ocupados. La máxima inhibición plaquetaria se alcanza a las 2 h de la administración del bolo y se recupera a las 12-24 h después de finalizar la infusión del fármaco. No obstante, el anticuerpo circula y se une a nuevas plaquetas hasta 14 días después de su administración. Para revertir su efecto es necesaria la transfusión de plaquetas.

La administración intravenosa en forma de bolo de una dosis de 0,25 mg/kg produce este nivel de ocupación de receptores, pero para asegurar una inhibición completa y sostenida se requiere una infusión posterior ajustada al peso del paciente (0,125  $\mu$ g/kg/min durante 12 h). Siempre debe asociarse con aspirina y heparina. La dosis de heparina recomendada es de 70 U/kg, con un máximo de 7.000 U. Entre los efectos secundarios de este fármaco, además del riesgo hemorrágico, destaca su capacidad inmunogénica, aunque ésta es significativamente inferior con los anticuerpos quiméricos que con los murinos. La trombocitopenia grave ha sido también descrita en los ensayos clínicos, con una frecuencia de 1,6-5%<sup>68</sup>.

Moléculas sintéticas: se han diseñado otro tipo de antagonistas de la GpIIb/IIIa de tipo competitivo, basados en la secuencia de reconocimiento arginina-glicina-aspartato (RGD) que existe en el fibrinógeno. El prototipo de estos péptidos sintéticos es el heptapéptido cíclico eptifibatide (integrelin). Otro enfoque, también de tipo competitivo, ha sido el mimetizar la secuencia RGD mediante la síntesis de pequeñas moléculas de derivados peptídicos y no peptídicos con el fin de superar los problemas de inestabilidad y tiempo de vida corto de los péptidos sintéticos. Constituyen ejemplos el lamifiban que es un peptidomimético y el tirofiban (Agrastat), derivado no péptido. Alguno de estos preparados como el xemilofiban ha sido diseñado para su administración por vía oral, si bien su utilización conlleva un aumento de complicaciones hemorrágicas<sup>69</sup>.

Desde el punto de vista clínico, el abciximab se ha mostrado eficaz en pacientes con síndromes coronarios agudos de alto riesgo, fundamentalmente aquellos que requieren

procedimientos de intervencionismo coronario, como angioplastia o stent. También ha sido evaluado en pacientes con infarto agudo de miocardio. De los antagonistas sintéticos el eptifibatide y el tirofiban han mostrado asimismo un efecto beneficioso en pacientes con angina inestable de alto riesgo y los sometidos a angioplastia<sup>70-73</sup>.

### **1.1.5.2 Anticoagulantes**

#### **Heparinas no fraccionadas**

La heparina es un mucopolisacárido sulfatado descubierto por McLean en 1916 e identificado como antitrombina por Abilgaard en 1968<sup>74</sup>. El efecto anticoagulante de la heparina se ejerce a través de la activación de la antitrombina, que luego inhibe a la trombina y al factor Xa, entre otros factores de la coagulación. Esta inactivación se realiza tras la formación de un complejo ternario en que la heparina, a través de un pentasacárido, se une a la antitrombina, y este complejo heparina-antitrombina se une finalmente a la trombina.

La heparina no fraccionada es un mucopolisacárido heterogéneo, lo que le confiere un efecto anticoagulante y unas propiedades farmacocinéticas muy complejas. Se une de forma no específica a proteínas plasmáticas, macrófagos y células endoteliales, por lo que el efecto anticoagulante varía ampliamente entre pacientes y es difícil de predecir, ya que parte de la heparina queda inactivada. También puede unirse a osteoblastos y osteoclastos y producir osteoporosis, así como al factor 4 plaquetario e inducir trombocitopenia inducida por heparina (HIT). Además, en pacientes con procesos tromboembólicos, la cantidad de heparina que se une a las proteínas aumenta, por lo que se requieren a menudo dosis muy elevadas de heparina para obtener un efecto anticoagulante óptimo<sup>75</sup>.

La dosis habitual en el tratamiento de los síndromes coronarios agudos es un bolo de 5.000 U seguido de una infusión de 1.000 U/h en pacientes que pesan > 80 kg y 800 U/h en pacientes con peso < 80 kg, durante al menos 48 h. La dosis de mantenimiento se ajusta según el aPTT, que debe estar entre 50 y 70 segundos (s). Se debe realizar controles de aPTT a las 4-6, 12 y 24 h<sup>76</sup>.

En pacientes en los que se realiza un intervencionismo coronario, el régimen habitual es 100 U/kg, con bolos adicionales ajustados al peso para mantener un tiempo de coagulación activado (ACT) de 300 s. Si se utiliza concomitantemente un antagonista del receptor de la GP IIb/IIIa se debe reducir la dosis a 70 U/kg y mantener el ACT en 200 s. La heparina se suspende inmediatamente después del procedimiento. El principal efecto secundario es la hemorragia, cuyo riesgo aumenta con diferentes enfermedades, como la endocarditis bacteriana, la hemofilia y las enfermedades hepáticas, gastrointestinales y del tracto urinario. Se debe tener especial cuidado en el control de la heparina asociada con el tratamiento fibrinolítico por el riesgo aumentado de hemorragia cerebral. La heparina puede producir una trombocitopenia inducida por heparina (HIT); este diagnóstico se establece después de unos días de tratamiento con heparina y la reducción de más del 50% del recuento de plaquetas. Habitualmente, el cuadro cede al suspender la heparina y es un problema transitorio. En ocasiones excepcionales se trata de un problema inmunitario en el que las inmunoglobulinas se unen a las plaquetas formando trombo (HIT) tipo 2. Si se sospecha este problema, se debe retirar inmediatamente la heparina y se puede utilizar lepirudina como tratamiento de éste o un heparinoide<sup>77</sup>.

En la figura 4 se muestran los principales agentes anticoagulantes y su mecanismo de acción.

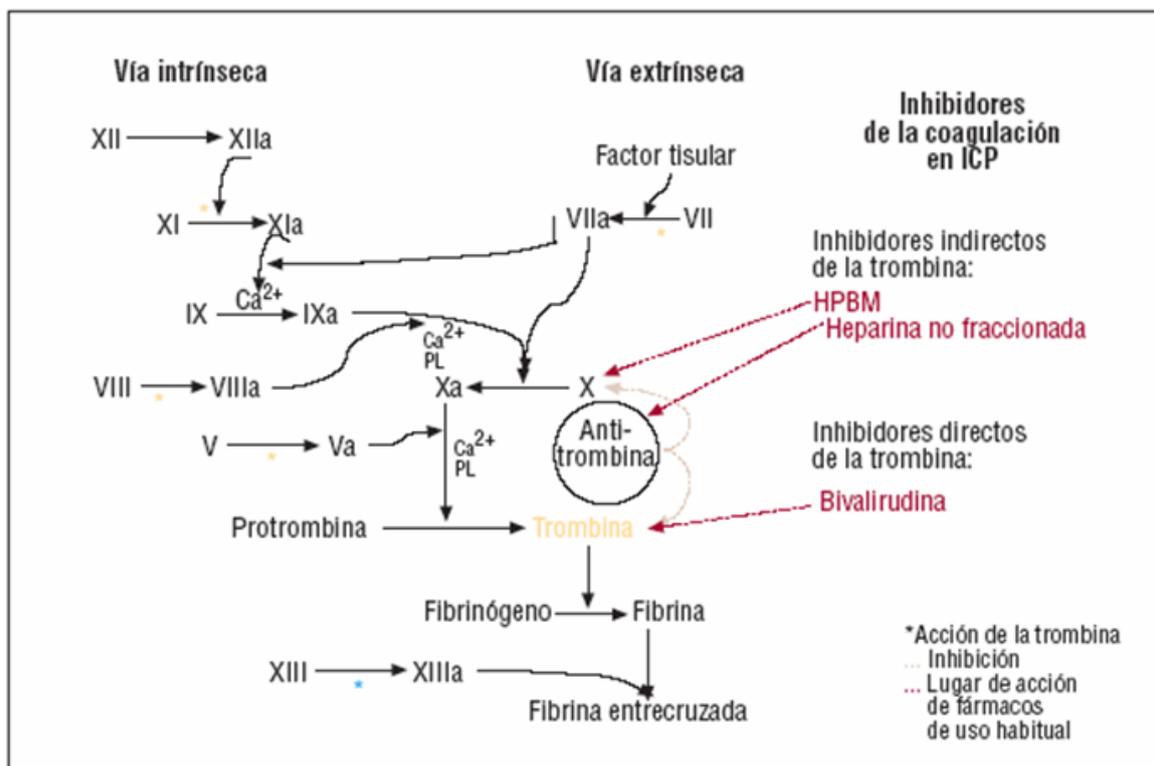


Figura 4: mecanismos de acción de los fármacos anticoagulantes

### Heparinas de bajo peso molecular

Son preparados obtenidos por depolimerización de la heparina no fraccionada, con peso molecular entre 4.000 y 6.500 Da, cuyo efecto anticoagulante se basa en actuar como cofactores de la antitrombina para inhibir preferentemente el factor Xa y, en menor proporción, a la trombina. Las mayores ventajas de estos preparados sobre la heparina no fraccionada radican en su vida media más prolongada y respuesta más predecible gracias a un

menor grado de unión a las proteínas plasmáticas. Además, el riesgo de trombocitopenia y osteoporosis es menor con los preparados de heparinas de bajo peso molecular (HBPM).

Los 2 productos más utilizados en cardiopatía isquémica son la dalteparina y la enoxaparina. La dosis de dalteparina es 120 U/12 h por vía subcutánea y la de enoxaparina es 1 mg/kg/12 h también por vía subcutánea. Debido a su efecto anticoagulante más estable, el tratamiento no se controla. Ambas deben ajustarse (reducir a mitad de dosis) en pacientes con insuficiencia renal, edad avanzada y coadministración con fármacos antiinflamatorios no esteroideos. Siempre se deben administrar asociadas con aspirina.

Las HBPM han sido evaluadas con buenos resultados en la prevención y tratamiento del tromboembolismo venoso y el tratamiento de la angina inestable<sup>78-79</sup>. También son prometedores los resultados obtenidos en la prevención de la restenosis postangioplastia y del ictus isquémico. Un avance importante con estos fármacos es la posibilidad de su administración en régimen ambulatorio<sup>80</sup>.

### **Inhibidores directos de la trombina**

Por su capacidad para inactivar tanto la trombina libre como la fijada a la superficie de la fibrina estas sustancias poseerían ventajas adicionales sobre las heparinas no fraccionadas y de bajo peso molecular. Los inhibidores directos de la trombina que han sido más evaluados desde el punto de vista clínico incluyen la hirudina, análogos semisintéticos y pequeñas moléculas sintéticas.

La hirudina, polipéptido de 65 aminoácidos, obtenido inicialmente a partir de saliva de sanguijuela *Hirudo medicinalis* y en la actualidad mediante ingeniería genética, es un potente inhibidor de la trombina que se ha utilizado en la prevención y tratamiento de la trombosis venosa, como coadyuvante de la trombolisis, en pacientes sometidos a angioplastia coronaria y en aquellos con síndromes coronarios agudos, fundamentalmente angina inestable e infarto agudo de miocardio sin onda Q<sup>81-82</sup>. Algunos estudios han demostrado que la hirudina es más eficaz que la heparina no fraccionada y las HBPM en la prevención de trombosis en cirugía ortopédica de alto riesgo<sup>83</sup>. Sin embargo, su eficacia no ha sido demostrada de forma tan convincente en la prevención y tratamiento de la trombosis arterial y además existe un riesgo elevado de complicaciones hemorrágicas.

La bivalirudina es un análogo sintético de la hirudina que se une a la trombina en 2 puntos de su molécula (sitio activo y exocito 1) formando un complejo hirudina-trombina. En este complejo, la trombina rompe el enlace Arg-Pr de la porción aminoterminal de la bivalirudina, liberando la porción de bivalirudina dirigida contra el sitio activo de la trombina. Este mecanismo no se produce con la administración de hirudina que forma un complejo hirudina-trombina irreversible. Esta reversibilidad de la bivalirudina permite a la trombina participar en la hemostasia, y probablemente le confiere mayor seguridad, ya que se reducen los problemas hemorrágicos<sup>84</sup>. La vida media plasmática es de 25 min; se aclara en gran parte por vía extrarrenal, aunque la dosis se debe ajustar en pacientes con insuficiencia renal.

La dosis recomendada es un bolo de 0,75 mg/kg seguido de una infusión de 1,75 mg/kg/h hasta la finalización del procedimiento intracoronario; la infusión puede prolongarse hasta 4 h después de su finalización, si es clínicamente necesario.

En pacientes con insuficiencia renal leve-moderada (filtrado glomerular > 30 ml/h) se mantiene la misma dosis de bolo y se reduce la infusión a 1,4 mg/kg/h. Está contraindicado su uso en pacientes con filtrado glomerular < 30 ml/h. El efecto anticoagulante sólo se debe controlar en pacientes ancianos y en los que tienen una insuficiencia renal leve-moderada.

No hay interacciones con fármacos antiplaquetarios (aspirina, clopidogrel, antagonistas de los receptores de la GP IIb/IIIa). En pacientes previamente tratados con heparina se puede administrar a los 30 min de la suspensión de la heparina intravenosa o a las 8 h de la administración de heparina de bajo peso molecular por vía subcutánea.

### 1.1.5.3 Fibrinolíticos

Como se comentó previamente los beneficios de la trombolisis han sido claramente establecidos en el IAM, con una marcada reducción de la mortalidad y mejora de la función ventricular.

Desde el punto de vista histórico los mayores hitos en el tratamiento trombolítico han sido la demostración por autopsia de un trombo coronario en un paciente con IAM por Herrick en 1912 y la confirmación angiográfica del papel etiológico del trombo en el 90% de los pacientes por De Wood en 1980<sup>38</sup>. La primera utilización de trombolíticos en IAM se realiza por Fletcher<sup>25</sup> y col en 1958 y, en 1969, Chazov<sup>37</sup> administró estreptoquinasa por vía coronaria, esquema que fue posteriormente reintroducido con éxito por Rentrop en 1979<sup>36</sup>. En

estudios posteriores se demuestra que la administración de un agente fibrinolítico por vía intravenosa en dosis elevadas consigue importantes tasas de recanalización coronaria, siendo éste el esquema más difundido en la actualidad.

Los trombolíticos más utilizados en el IAM son estreptoquinasa, t-PA, APSAC y uroquinasa. Todos ellos se comportan como activadores del plasminógeno, convirtiendo este proenzima en el enzima activo plasmina, que degrada fibrina originando productos de degradación de la fibrina. Algunos autores los han clasificado en agentes de primera generación, que incluirían estreptoquinasa y uroquinasa, de segunda generación como el activador tisular del plasminógeno, prouroquinasa y complejos acilados de estreptoquinasa-plasminógeno y de tercera generación como estafiloquinasa.

La estreptoquinasa es una proteína bacteriana producida por el estreptococo  $\beta$ -hemolítico que se caracteriza por activar indirectamente el sistema fibrinolítico, formando un complejo previo con el plasminógeno que induce un cambio conformacional que permitirá su conversión en plasmina. Al no ser una proteína presente de forma natural, su administración puede provocar reacciones anafilácticas, así como la generación de anticuerpos.

La uroquinasa es una serin proteasa aislada de orina humana, medio de cultivo de células embrionarias de riñón humano y mediante ingeniería genética, que activa directamente el sistema fibrinolítico y no es inmunógena. A dosis terapéutica, tanto la estreptoquinasa como la uroquinasa inducen fibrinólisis sistémica, lo que ocasiona una tendencia hemorrágica importante.

El activador tisular del plasminógeno (t-PA) es una glicoproteína monocatenaria purificada inicialmente a partir de células de melanoma y que se obtiene en la actualidad mediante ingeniería genética (rt-PA). La principal característica del t-PA es su alta afinidad por la fibrina, la cual favorece la activación del plasminógeno a través de la formación de un complejo ternario que permite la generación local de plasmina y la degradación de la fibrina "in situ", fuera del alcance de los inhibidores.

La prouroquinasa es un precursor de la uroquinasa aislado a partir de orina humana y en la actualidad obtenido con técnicas de ingeniería genética. La prouroquinasa puede convertirse en uroquinasa por acción de la plasmina, pero también posee actividad intrínseca, ya que es capaz de activar el plasminógeno unido a fibrina parcialmente degradada por plasmina.

Los complejos acilados de estreptoquinasa y plasminógeno se obtienen químicamente mediante la introducción de un grupo acilo en la molécula del proenzima y acoplamiento con estreptoquinasa. Estas sustancias poseen elevado poder trombolítico pues, al menos teóricamente, son activas únicamente a nivel de la superficie de la fibrina, donde tiene lugar un proceso de desacilación espontánea y liberación local del enzima activo, mientras que la acilación impide su neutralización por los inhibidores circulantes. Poseen una vida media larga, aproximadamente 90 minutos, por lo que pueden ser administrados en forma de bolo intravenoso.

Diversos estudios multicéntricos realizados en la última década (GISSI-ISIS-GUSTO, etc.) han demostrado que estos agentes reducen de forma significativa la mortalidad en

pacientes con IAM<sup>85-88</sup> y que la precocidad en la administración del fármaco (primeras 6 horas desde el inicio de los síntomas) es más importante que el tipo de tratamiento administrado<sup>89</sup>.

### Nuevos fibrinolíticos

**Retepase.** Se trata de una variante del t-PA que posee una vida media más larga (13-16 minutos comparado con 3-6 minutos del rt-PA). Se ha demostrado en varios estudios (GUSTO-III, RAPID, INJECT, COBALT) que esta molécula, administrada en forma de bolo i.v. (en dos dosis), consigue recanalización completa en un porcentaje similar o superior a la que se consigue con otros trombolíticos de segunda generación, por lo que teniendo en cuenta la facilidad de administración podría constituir una alternativa válida al régimen de dosis acelerada de t-PA<sup>90</sup>.

**TNK-t-PA.** Se diferencia de la molécula nativa en que tiene sustituciones de aminoácidos en tres lugares: (T: treonina por asparagina; N: asparagina por glutamina; K: lisina, histidina y 2 argininas por 4 alaninas). Ello le confiere vida media más prolongada, mayor especificidad por la fibrina y menor efecto sobre la coagulación a nivel sistémico, mayor resistencia a la inhibición por el PAI-1 (principal inhibidor plasmático del t-PA) y mayor actividad sobre coágulos ricos en plaquetas. Además, la mayor vida media del TNK-tPA permite su administración en dosis única por vía intravenosa en forma de bolo. Estudios preliminares en pacientes con IAM han demostrado que es posible recanalización completa en 57-64%, cifras comparables a las obtenidas con otros agentes.

**Estafiloquinasa.** Se trata de una proteína de origen bacteriano similar a la estreptoquinasa que se obtiene en la actualidad mediante ingeniería genética. Actúa a través de la formación de un complejo plasmina-estafiloquinasa que posee mayor especificidad por la fibrina que el complejo estreptoquinasa-plasminógeno e induce menor fibrinólisis sistémica y, por tanto, un menor riesgo de complicaciones hemorrágicas. Estudios recientes como el STAR han demostrado que puede constituir una alternativa válida al tratamiento fibrinolítico estándar con escasos efectos adversos<sup>91</sup>.

### 1.1.5.4 Régimen antitrombótico en pacientes tratados con stent

Con la llegada de los stent y su uso en el síndrome coronario agudo se precisaron regímenes antitrombóticos y anticoagulantes para evitar su complicación más temida: la trombosis aguda/subaguda del stent. Estos regímenes han ido variando en su contenido y en su duración a lo largo de los años. Inicialmente se estandarizó una pauta agresiva consistente en la toma de aspirina, dipyridamol, heparina sódica (hasta obtener un INR en rango anticoagulante) y warfarina durante tres meses. A pesar de dicha pauta, la tasa de trombosis aguda/subaguda persistía siendo elevada (5- 16%)<sup>92</sup>, y lo agresivo del régimen daba lugar a un número considerable de complicaciones hemorrágicas. Pan et al demostraron que con una pauta consistente en la administración de 10000 unidades de dalteparina sódica subcutánea al día durante 1 mes y la administración oral de aspirina 150 mg/día y ticlopidina 500 mg/día se reducían drásticamente la tasa de trombosis aguda/subaguda del stent y disminuían las complicaciones hemorrágicas en relación con los regímenes previos<sup>93</sup>. Esta pauta es la que se ha impuesto hasta la actualidad por sus buenos resultados en la mayoría de los laboratorios

con la única variación del cambio de clopidogrel 75 mg/día por ticlopidina a partir del primer mes o desde el inicio si se administra una carga de clopidogrel de 300 mg.

## 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 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 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 precursoras inmaduras 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.

Aun 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 5).

1.2.2.2 Células madre multipotenciales: son capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria<sup>94</sup>.

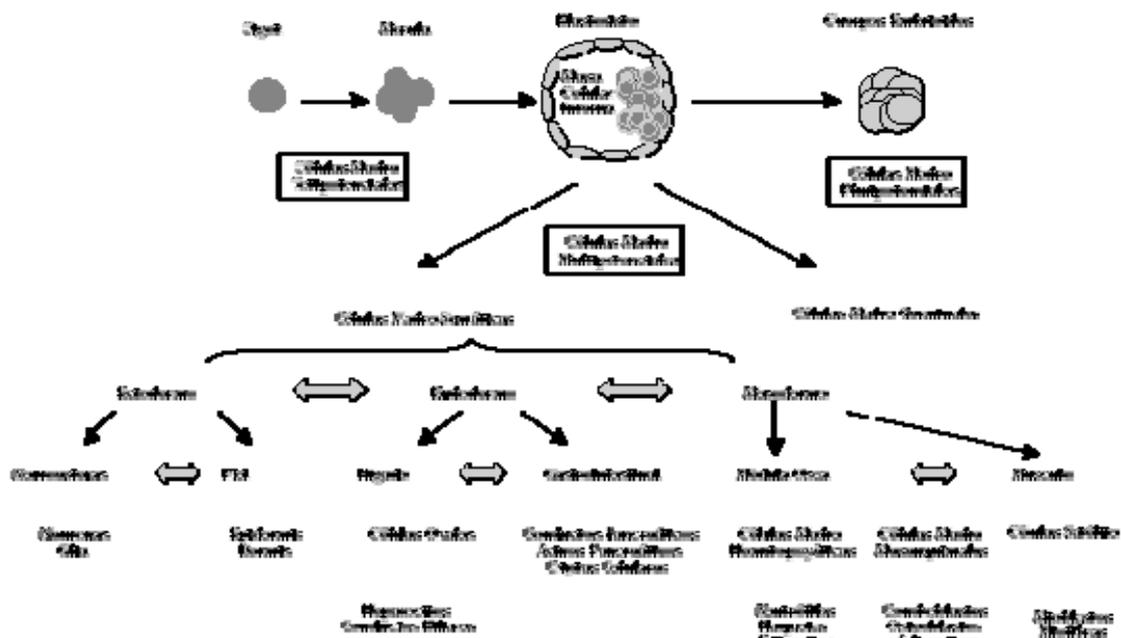


Figura 5. Modelo jerárquico de las células madre en función de su potencialidad

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 recientemente 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>95-96</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>95-96</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>97</sup>, músculo cardíaco<sup>98</sup>, endotelio<sup>96</sup> o a tejidos derivados de las tres capas embrionarias<sup>99</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 recientes 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>100-102</sup> o incluso cuestionando abiertamente los resultados experimentales<sup>103</sup>. En las siguientes líneas revisaremos los distintos tipos de células madre 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>94</sup>, mesenquimales (MSC)<sup>104</sup>, las llamadas Side Population Cells (SP)<sup>105</sup> y recientemente las células progenitoras adultas multipotenciales o MAPCs<sup>100</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>107</sup>.

Además del potencial hematopoyético, diversos trabajos recientes 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 la potencialidad endotelial de las células troncales hematopoyéticas de la médula ósea<sup>96</sup>. También se han publicado recientemente 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 Lin<sup>-</sup> y c-kit<sup>+</sup> (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 y supervivencia de los animales<sup>98</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>108</sup>. Aunque el origen de dichas células no se pudo determinar, claramente estos hallazgos sugieren la capacidad de células adultas de diferenciarse a tejido cardíaco. Basándose en que las células ovals (células madre hepáticas) expresan marcadores de superficie tradicionalmente asociados a HSC (c-kit, flt-3, Thy-1 y CD34), se ha sugerido que éstas podrían diferenciarse a células ovals y hepatocitos. El grupo de Lagasse y col han demostrado que células madre hematopoyéticas de médula ósea con el fenotipo Lin<sup>-</sup>, c-kit<sup>+</sup>, Thy-1, Sca-1 son capaces de regenerar un hígado murino en un modelo de daño hepático

fulminante<sup>97</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 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>109-110</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 recientemente principalmente *in vivo*<sup>111</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 pueden ser criticados 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>96-99,112</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. Las MSC no expresan antígenos de superficie típicos de las HSC, como CD34, CD45 o CD14. Experimentos recientes han demostrado *in vitro* que las MSC son capaces de diferenciarse a tejidos mesodérmicos funcionales, como

osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos esqueléticos<sup>104</sup>. En nuestro grupo se han aislado células mesenquimales y diferenciado bajo ciertos estímulos a osteoblastos, adipocitos y vasos sanguíneos (figura 6).

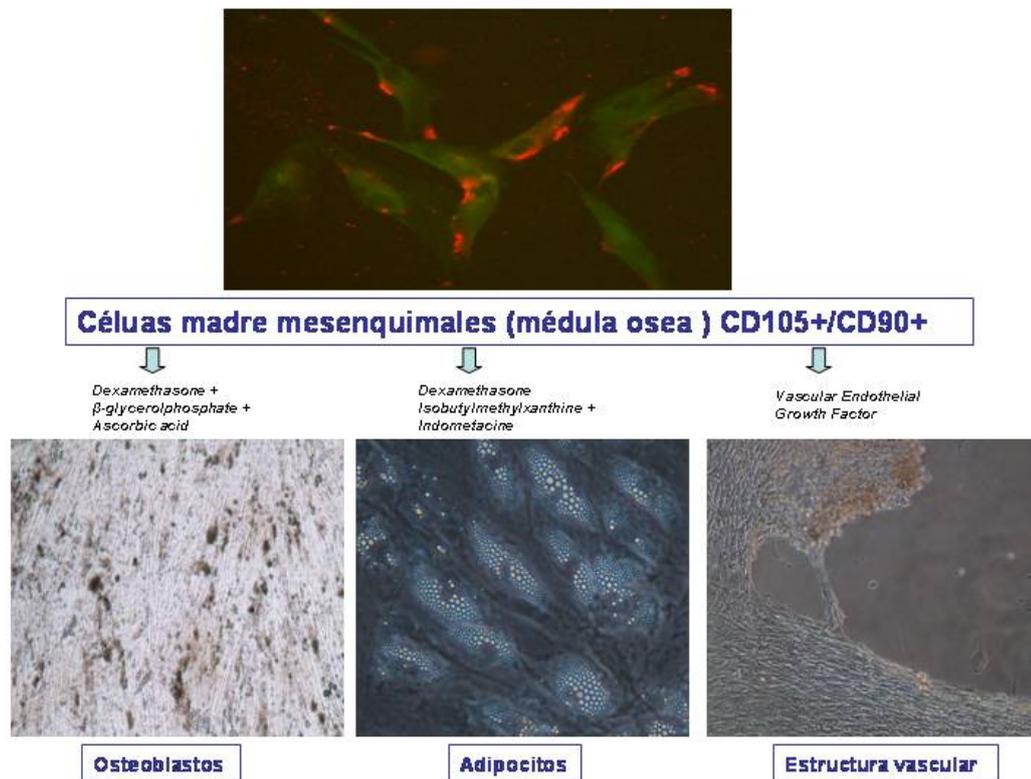


Figura 6. Diferenciación de células madre mesenquimales a adipocitos y vasos sanguíneos

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>113</sup>. A pesar de su probada multipotencialidad

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>114</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 diferenciar a HSC en humanos, roedores y otras especies<sup>105,115</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>115</sup>.

### 1.2.3.4 Células progenitoras multipotenciales adultas (MAPC)

Esta población celular de la médula ósea ha sido descrita recientemente por el grupo de Catherine Verfaillie<sup>95</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 MAPCs son capaces de proliferar in vitro más de 120 divisiones celulares 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 diferenciar a tejidos derivados del mesodermo como hueso, cartílago, adipocitos, músculo esquelético, estroma hematopoyético o endotelio. Pero de momento no han sido capaces de diferenciar a tejido hematopoyético maduro o cardiomiocitos. Estas células también han sido capaces de diferenciar 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>116</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 la diferenciarse.

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

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 obsoletos. 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>17</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>118</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>119</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>114</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>96,106</sup>.

**1.2.5.2 Fusión celular:** varios trabajos recientes 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>100,102</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>101,121</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, puede desdiferenciarse para posteriormente diferenciarse hacia células de distinta estirpe<sup>122,123</sup>.

**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

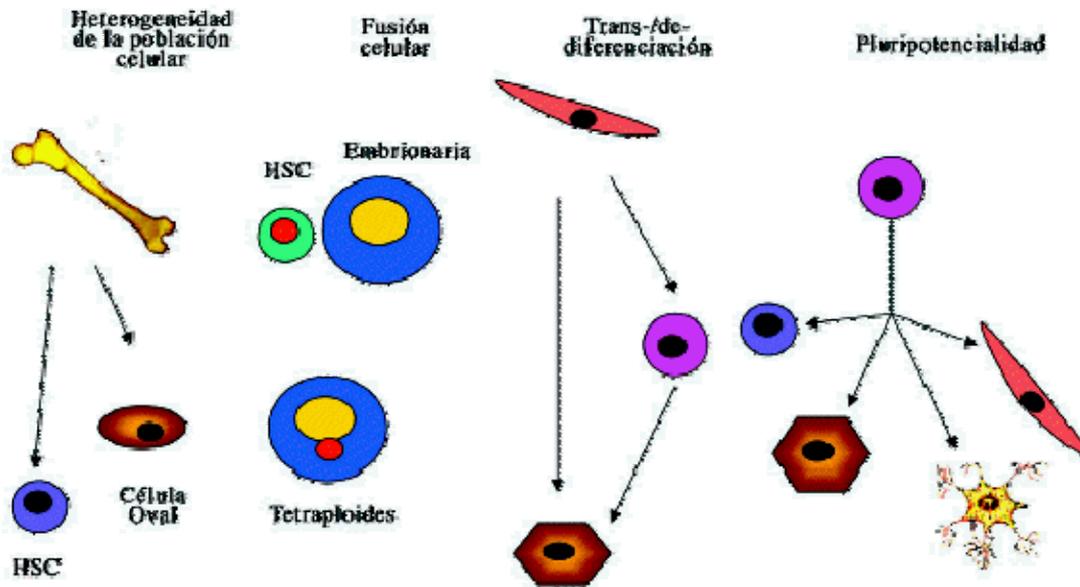


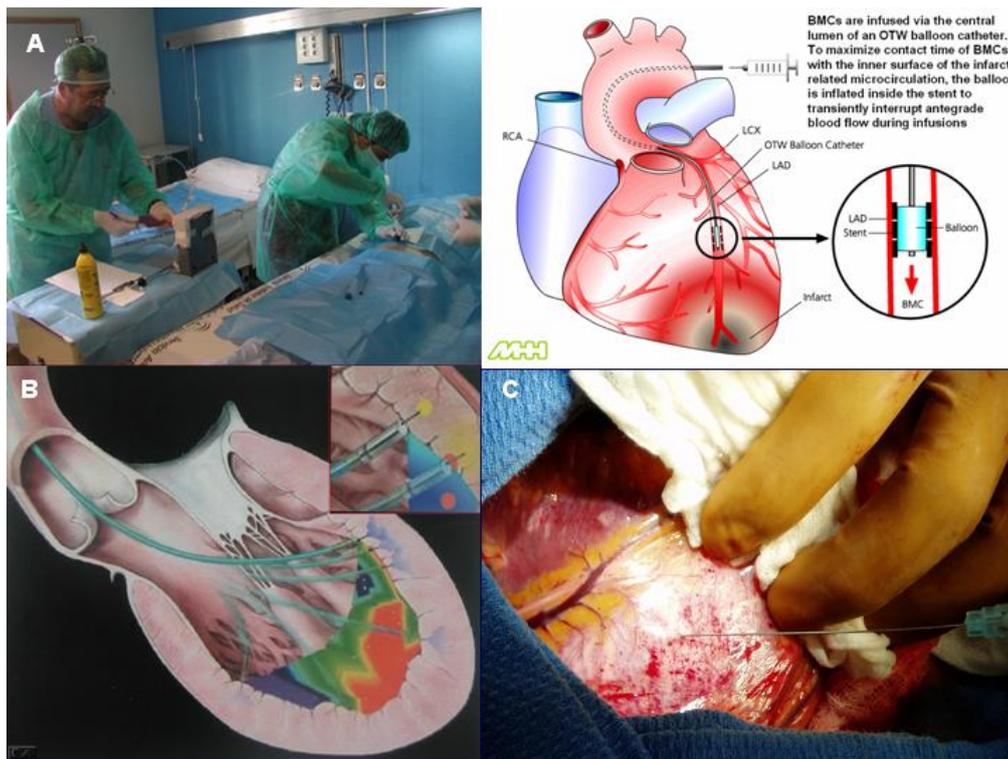
Figura 7. Posibles mecanismos de potencialidad de las células madre adulto

Cualquiera que sea la hipótesis cierta, todas pueden combinarse como mecanismos. Aun 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 pues 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 sugiere 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>124</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>98</sup> inyectaron en la zona infartada células madre de la médula ósea de la propia rata o bien se administraban factores estimulantes que movilizaba 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>125</sup> que estudiaron 8 corazones de mujeres que habían sido trasplantados a varones y demostrándose 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>126-129</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 en la terapia celular ha 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 osea 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 8).



**Figura 8. Obtención de células madre de la médula osea y administración intracoronaria a través de un cateter balón coaxial (A). Administración endocavitaria a través de un catéter de mapeo electromecánico (B). Inyección intramiocárdica (C).**

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

En la mayoría de estos estudios se obtienen las células madre del aspirado de la 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 cateter balón coaxial.

El primer estudio fue realizado por Strauer et al<sup>130</sup>. A 10 pacientes con IAM reperfundido se le administró 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. Aunque no se objetivaron cambios en la FE si se evidenció una reducción significativa del área infartada en los pacientes tratados con células. El estudio TOPCARE AMI<sup>131</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 FE 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>132</sup> realizaron un estudio no aleatorizado en 20 pacientes con IAM reperfundido a los que se le administró una infusión intracoronaria de células madre derivadas de la 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 un ratón, y tras una semana adquirieron fenotipo de cardiomiocito.

En el BOOST trial<sup>133</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 FE en el brazo de las células madre (incremento del 7% vs 1% del grupo control). Sin embargo, la RMN a los 18 meses no mostró diferencias significativas entre la ganancia de FE de ambos grupos (5% vs 3%) con RMN<sup>134</sup>.

Recientemente se han publicado los resultados del REPAIR AMI<sup>135</sup>, 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 de la FE en el grupo de las células (5.5 % vs 3%). Dicha ganancia llegó a ser del 8% en los pacientes con infartos más extensos.

Assmus et al<sup>136</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. No se encontraron diferencias 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>137</sup> realizaron un estudio randomizado en 67 pacientes con IAM (33 pacientes recibieron células madre de la médula ósea tras el infarto, y 34 placebo). La RMN a

los 4 meses no mostró diferencias significativas en la FE, aunque en el brazo que recibió células madre se objetivó una disminución de la zona infartada.

Lunde et al<sup>138</sup> estudiaron a 100 pacientes con IAM anterior y 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.

### **1.3.2 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>139</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 micárdica y de la función ventricular, pero hubo que suspender el estudio por documentarse una tasa de restenosis inesperadamente alta en el grupo del G-CSF.

Valgimigli et al<sup>140</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.

Zohnhofer et al<sup>141</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 tenían influencia alguna en la función ventricular, en el tamaño del infarto o en la tasa de restenosis. Conclusiones similares se obtuvieron en el STEMI trial<sup>142</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.

### **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>143</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 FE 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>144</sup> realizaron un estudio en 5 pacientes con insuficiencia cardiaca severa de origen isquémico que estaban en lista de trasplante. Se les 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>145</sup> administraron G-CSF a 16 pacientes con insuficiencia cardiaca crónica, y 9 de ellos eran de origen isquémico, de los cuales 5 mejoraron su grado funcional 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>146</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 FE y una reducción de los volúmenes ventriculares.

## **2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

## JUSTIFICACIÓN

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>147-148</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 la del órgano en que residen. Las células madre hematopoyéticas muestran capacidad para regenerar tanto miocitos como vasos coronarios (angiogénesis). La inyección de estas células en los bordes de un infarto de un ratón adulto mejora su función ventricular<sup>150-151</sup>. Por otro lado, dos determinantes parecen esenciales para conseguir la transdiferenciación de células madre primitivas obtenidas de la médula ósea: la existencia de un tejido dañado junto a un alto nivel de células progenitoras en el medio dañado. En base a ello, Orlic et al<sup>151</sup> demostraron en ratones que la movilización masiva de células madre de la médula ósea mediante factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF), permitía una translocación de células madre mediada por citoquinas de una zona infartada, lo que originó una regeneración significativa del tejido dañado en 27 días, como consecuencia de la formación de 15 millones de nuevos miocitos con sus arteriolas y capilares unidos a la circulación coronaria. Como se ha expuesto en la introducción, determinados estudios en humanos han mostrado que el miocardio humano dañado por un infarto puede también regenerarse mediante la inyección quirúrgica,

la inyección intracoronaria o la inyección transendocárdica de células madre previamente obtenidas de la propia médula ósea.

Sin embargo, en el momento actual existen múltiples incógnitas a dilucidar sobre cómo, cuando, en qué momento o situación, de qué forma, con qué grado de seguridad se obtiene el mejor grado de regeneración miocárdica tras un infarto agudo de miocardio. 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 una amplia tradición en el estudio de la recuperabilidad funcional tras reperfusión precoz en el infarto agudo de miocardio. Los tratamientos trombolíticos desarrollados pioneramente en nuestro grupo al comienzo de los años 80 han permitido 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>40,152-153</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, conforme las primeras cuestiones comiencen a resolverse. No estimamos en menos de una década nuestro recorrido investigador de múltiples aspectos de la terapia regenerativa.

Modelo escogido: el tipo de infarto seleccionado para el estudio regenerativo ha sido el infarto anterior extenso, analizable por angiografía digital. Ello obedece a 2 razones:

1.- el carácter dinámico del proceso agudo, junto a los efectos de la reperfusión, hacen difícil la interpretación de los cambios funcionales tras la terapia regenerativa. Por tanto el sinergismo de la pared anterior del ventrículo izquierdo ha de ser nítidamente observable en una filmación en proyección oblicua anterior derecha a 30°. El territorio a estudio es amplio, nítido y común en todos los pacientes, siendo siempre la misma arteria descendente anterior la responsable del mismo tipo de infarto. Si estudiáramos todo tipo de infarto, entraría en el análisis otras variables adicionales, como los infartos pequeños, en los que ya se parte de un funcionalismo casi normal y los posibles efectos regenerativos quedan oscurecidos al ser pequeña la ganancia hasta la normalidad. Por tanto, el infarto anterior extenso nos proporciona una amplia ventana de observación para el análisis de los efectos regenerativos sobre la función.

2.- La segunda razón es la metodología angiográfica y hemodinámica para el análisis de los cambios funcionales. Ello nos permite desde los tiempos de la fibrinólisis en el infarto 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. Hemos escogido pues, un modelo claro de infarto y el método más íntimo para el estudio de los efectos regenerativos sobre la función ventricular.

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>94</sup>, las células mesenquimales<sup>104</sup>, las side population<sup>105</sup>, las células progenitoras adultas multipotentes<sup>105</sup> y los progenitores endoteliales. Nosotros nos decantamos por esta fuente porque creemos que esta diversidad de población, puede determinar una regeneración más potente.

### **OBJETIVOS**

El propósito y el motivo principal de esta tesis doctoral es el de recopilar y exponer los trabajos sobre terapia regenerativa en pacientes isquémicos que desde el año 2002 se vienen desarrollando por nuestro grupo. Después de 5 años de experiencia, es momento de reflexión y de síntesis. Tras la elaboración de un protocolo conjunto tanto clínico como biológico, se paso a testar la factibilidad, seguridad y eficacia de distintos tratamientos regenerativos y de su vía de administración. Tanto la movilización masiva de células madre con factor (G-CSF) como la inyección intracoronaria de células mononucleares de la médula ósea fueron testados. Una vez comprobados estos aspectos, y aun siendo los primeros hallazgos muy prometedores, quedaba por efectuar un estudio comparativo para evaluar los cambios en función ventricular tras tratamiento regenerativo. Teniendo en cuenta que la reperfusión precoz produce un grado de salvamento miocardico en el infarto, dicho grupo control podía representar el beneficio alcanzado por la propia reperfusión y revascularización, situaciones ambas que también conllevan los dos grupos de terapia regenerativa. Por otro

lado, al comprobarse la eficacia de la transferencia de células en la fase aguda del infarto, se quiso testar su eficacia en pacientes con cardiopatía isquémica crónica y disfunción ventricular severa. Finalmente, se estudiaron los cambios electrocardiográficos seriados a lo largo de un año en pacientes con IAM anterior revascularizado tratado con células madre intracoronarias. Con ello tratamos de relacionar los cambios en la función ventricular con aquellos otros observables en el ECG de superficie y que pudieran representar parámetros indicativos de electrogénesis. Por tanto los objetivos principales de este proyecto podrían resumirse en:

1.- Demostrar la factibilidad, seguridad y eficacia de regenerar miocardio infartado a partir de la movilización de células madre de la médula ósea mediante la administración subcutánea de G-CSF recombinante humano.

2.- Demostrar la factibilidad y eficacia de la inyección intracoronaria de progenitores para regenerar miocardio infartado con aplicación in situ de células madre extraídas de la médula ósea.

3.- Comparar la eficacia de ambos métodos regenerativos.

4.- Comparar los grupos de terapia regenerativa con un grupo control de pacientes con infarto de miocardio reperfundidos precozmente.

5.- Analizar los factores clínicos, hemodinámicos y hematológicos capaces de influir favorablemente en un mayor grado de recuperación funcional tras tratamiento regenerativo.

6.- Analizar los cambios seriados en el electrocardiograma de pacientes con IAM anterior sometidos a tratamiento revascularizador y a transferencia intracoronaria de células madre de la médula ósea

7.- Analizar la eficacia de la terapia regenerativa en la mejora del grado funcional y de la función ventricular en pacientes con cardiopatía isquémica crónica y disfunción ventricular severa.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3.1 Pacientes

#### 3.1.1. Estudio observacional con G-CSF en pacientes con IAM.

En este estudio se muestran los hallazgos observados en un grupo de 13 pacientes con infarto agudo de miocardio anterior que fueron revascularizados con stent intracoronario y posteriormente tratados con factor estimulante de colonias granulocíticas recombinado.

Se estudió prospectivamente a 13 pacientes con IAM anterior revascularizado que aceptaron participar en un estudio de factibilidad y seguridad sobre los efectos de la movilización masiva de células madre en el curso de un infarto con los siguientes criterios de inclusión: Pacientes mayores de 18 años y menor de 80 años, con IAM anterior extenso, y disfunción ventricular revascularizado que aceptaron el protocolo y seguimiento establecido. En cuanto a los criterios de exclusión se desestimaron aquellos pacientes con enfermedades neoplásicas o hematológicas concomitantes. El estudio fue aprobado por el comité ético institucional y todos los pacientes dieron el consentimiento informado. Los datos basales quedan resumidos en la tabla 2. Todos ellos fueron tratados con fibrinólisis a su llegada con el objetivo de lograr una reperfusión precoz. No obstante, en dos pacientes se precisó realizar un cateterismo de rescate con implantación de stent para conseguir la reperfusión de la arteria descendente anterior. Los 11 restantes mostraron signos clínicos, electrocardiográficos y enzimáticos de reperfusión y estabilización, programándose un cateterismo entre los días 2 y 5 postinfarto. De este modo se realizó cateterismo cardiaco a todos los pacientes entre los días 0 y 5 de la fase aguda del infarto, y este estudio se consideró como basal para la valoración ventricular izquierda.

**TABLA 2. Datos basales (n=13)**

<b>Edad (años)</b>	<b>54±8</b>
<b>Varones</b>	<b>12 (92%)</b>
<b>Factores de riesgo</b>	
- <b>Diabetes</b>	<b>2 (15%)</b>
- <b>Hiperlipemia</b>	<b>4 (31%)</b>
- <b>Hipertension</b>	<b>3 (23%)</b>
- <b>Fumadores</b>	<b>8 (62%)</b>
<b>Pico de CK</b>	<b>3950±3110</b>
<b>Pico de CK-mb</b>	<b>486±470</b>
<b>Tiempo de recanalización (horas)</b>	<b>5.2±3.4</b>
<b>Tiempo dolor-pico de CK (horas)</b>	<b>20±24</b>
<b>Número de radios afectados (%)</b>	<b>46±14</b>

CK:creatin-quinasa

La revascularización miocárdica obtenida en este punto aseguraría la viabilidad de la pared anterior, así como la llegada y el posible anidamiento de células madre a la zona infartada. Se realizó un registro de los tiempos desde el inicio del dolor hasta la recanalización, la revascularización con stent, y el pico de creatinquinasa (CK) (tabla 2). Tras el cateterismo inicial, los pacientes fueron incluidos en el estudio tras aceptar su participación. Todos fueron tratados con G-CSF y se realizó un seguimiento estrecho tras el alta hospitalaria. El segundo cateterismo cardiaco fue programado a los tres meses de seguimiento; el sumatorio de ondas Q ( $\Sigma Q$ ), que refleja el grado de necrosis de la pared anterior fue medido y comparado en milímetros.

### **3.1.2. Estudio comparativo entre la infusión intracoronaria de células madre y la movilización masiva de células madre con G-CSF en pacientes con IAM**

Se estudiaron a 30 pacientes con IAM anterior revascularizados que aceptaron participar en un estudio comparativo para evaluar la eficacia del tratamiento regenerativo con células madre vs G-CSF.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- 1) Pacientes con IAM anterior que llegaran al hospital en las primeras 12 horas desde el comienzo de los síntomas
- 2) Función ventricular deprimida (FE angiográfica <45%)
- 3) Reperusión precoz de la arteria descendente anterior (DA)
- 4) Revascularización percutánea de la arteria DA responsable del infarto anterior, lo cual era mandatorio para entrar en el estudio

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- 1) Edad >80 años
- 2) Aparición de complicaciones mecánicas del IAM o shock cardiogénico
- 3) Enfermedad hematológica concomitante; y
- 4) Enfermedad sistémica maligna o pre-maligna.

Una vez superados estos criterios después del primer cateterismo, los pacientes que aceptaron entrar en el estudio fueron aleatoriamente asignados a cada grupo. Tras la revascularización percutánea fueron aleatorizados a grupo control (10 pacientes), infusión de células madre (10 pacientes) o tratamiento con G-CSF (10 pacientes). Todos los pacientes

firmaron el consentimiento para participar en el estudio. En la tabla 3 quedan resumidos los datos basales de los tres grupos, que fueron similares.

**TABLA 3. Datos basales clínicos y angiográficos**

	<b>Grupo I (Infusión células)</b>	<b>Grupo II (G-CSF)</b>	<b>Grupo III (Control)</b>	<b>p&lt;</b>
<b>Edad (años)</b>	<b>52±12</b>	<b>54±9</b>	<b>55±11</b>	<b>NS</b>
<b>Sexo (masculino)</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>NS</b>
<b>Tiempo de recanalización (h)</b>	<b>4±2</b>	<b>5±3</b>	<b>4±3</b>	<b>NS</b>
<b>CK† pico (IU/dl)</b>	<b>4455±1573</b>	<b>4936±3091</b>	<b>3063±1672</b>	<b>NS</b>
<b>CK†mb pico (IU/dl)</b>	<b>464±264</b>	<b>579±472</b>	<b>248±197</b>	<b>NS</b>

CK: creatin quinasa

A su llegada al hospital todos los pacientes recibieron fibrinólisis intravenosa con el fin de lograr una reperfusión precoz. Cinco de ellos fueron revascularizados en la fase aguda del infarto, inmediatamente después de la fibrinólisis, y 3 pacientes precisaron angioplastia de rescate por fibrinólisis ineficaz. Los 22 restantes tuvieron criterios clínicos, enzimáticos y electrocardiográficos de reperfusión, y fueron programados para la realización de un cateterismo cardiaco entre los días 2 y 5 post -IAM.

De este modo se realizó un cateterismo cardiaco a todos los pacientes entre los días 0 y 5 de la fase aguda del infarto, y este estudio se consideró como basal para la valoración de la función ventricular izquierda. Al grupo de pacientes que recibieron células madre se les programó un segundo cateterismo entre los días 5-10 del infarto para la infusión de células

madre desde la arteria descendente anterior. Los pacientes randomizados a tratamiento regenerativo con factor (G-CSF) iniciaron su tratamiento al quinto día del infarto a una dosis de 10 µg/kg/min durante 10 días. Tras el alta hospitalaria se realizó un seguimiento estrecho en todos los pacientes. A los 3 meses de seguimiento se programó un nuevo cateterismo para evaluar los cambios en la función ventricular izquierda. Se compararon los electrocardiogramas obtenidos antes del alta hospitalaria y a los 3 meses de seguimiento; el sumatorio de ondas Q, que representa el grado de necrosis de la pared anterior fue medido y comparado en mm.

### **3.1.3. Evaluación de la infusión de células madre derivadas de médula ósea en pacientes con cardiopatía isquémica crónica. Estudio oservacional.**

En este estudio se muestran los hallazgos observados en un grupo de 13 pacientes con infarto anterior de más de 1 mes de evolución y función ventricular deprimida, a los que se les administró una infusión intracoronaria de células madre tras revascularizar percutáneamente el árbol coronario.

Se estudiaron prospectivamente a 13 pacientes con los siguientes criterios de inclusión:

- 1) Pacientes mayores de 18 años y menor de 80 años
- 2) Infarto anterior extenso de más de un mes de evolución
- 3) Disfunción ventricular: FE < 45% revascularizado que aceptaron el protocolo y seguimiento establecido

En cuanto a los criterios de exclusión se desestimaron aquellos pacientes con enfermedades neoplásicas o hematológicas concomitantes. El estudio fue aprobado por el comité ético y todos los pacientes firmaron el consentimiento informado. Los datos basales quedan resumidos en la tabla 4.

<b>TABLA 4. Datos basales (n=13)</b>	
<b>Edad (años)</b>	<b>54±8</b>
<b>Varones</b>	<b>11 (85%)</b>
<b>Factores de riesgo</b>	
- <b>Diabetes</b>	<b>2 (15%)</b>
- <b>Hiperlipemia</b>	<b>5 (38%)</b>
- <b>Hipertension</b>	<b>6 (46%)</b>
- <b>Fumadores</b>	<b>5 (38%)</b>
<b>Tiempo de recanalización (horas)</b>	<b>168±289</b>
<b>Tiempo dolor –células (meses)</b>	<b>29±50</b>
<b>Tiempo stent-células (meses)</b>	<b>17±22</b>
<b>CK pico</b>	<b>6134±4080</b>
<b>CK-mb</b>	<b>827±630</b>

CK: creatin quinasa

El tratamiento del infarto en la fase aguda fue con fibrinólisis y revascularización electiva en 6 pacientes, fibrinólisis aislada en 3, tratamiento convencional y revascularización electiva en 2 y tratamiento convencional en otros 2. En todos los pacientes se consiguió una revascularización completa previa a la inyección de células. Cuatro pacientes precisaron tratamiento percutáneo de lesiones en territorio distinto al de la DA. De esta forma aseguraríamos la llegada y posible anidamiento de las células a la zona infartada, y se

eliminan factores de confusión que pudieran influir negativamente en la mejora funcional como podría ser una revascularización incompleta.

Una vez revascularizado se programó un cateterismo 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. El tiempo medio transcurrido desde la fase aguda del infarto hasta la infusión de células fue de  $28\pm 45$  meses. 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 les hizo un test de consumo de oxígeno y se analizó el umbral de anaerobiosis en cada uno de ellos, y se repitió el estudio a los 6 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.

### **3.1.4. Evaluación de los cambios electrocardiográficos en pacientes con tratamiento regenerativo**

Se analizaron los hallazgos electrocardiogramas (ECG) de 21 pacientes con infarto agudo de miocardio anterior tratados con revascularización percutánea e inyección intracoronaria de células madre (10 del estudio randomizado y 11 de un estudio previo observacional en el que se quiso valorar la seguridad y eficacia de este tratamiento regenerativo).

Se obtuvieron ECG al alta, a los 6 meses y al año y se analizaron los siguientes parámetros: frecuencia cardiaca, eje eléctrico, duración del QRS,  $\square$ Q, intervalo QT

corregido y amplitud de la onda R en V6. Los resultados obtenidos fueron correlacionados con la ganancia funcional.

## 3.2 Cateterismo cardiaco diagnóstico y terapéutico

### 3.2.1. Estudio observacional con G-CSF en el IAM.

Se realizaron dos cateterismos cardiacos durante el estudio. El primero fue llevado a cabo entre los días 0 y 5 tras el IAM; el segundo a los tres meses de seguimiento. En el primer estudio se realizó un cateterismo cardiaco izquierdo diagnóstico, incluidas una ventriculografía izquierda y una angiografía coronaria. El tratamiento mecánico de la arteria descendente anterior causante del infarto se realizó siempre con un stent liberador de rapamicina. Una vez obtenida la revascularización de la arteria epicárdica, se efectuaron estudios de reserva coronaria para evaluar la situación del lecho vascular. En 3 pacientes se implantaron otros stents en lesiones coronarias remotas no relacionadas con el infarto. Como resultado, en todos los pacientes se obtuvo una revascularización completa. Todos los procedimientos terapéuticos se llevaron a cabo con catéteres 8 F y recibieron heparina no fraccionada a razón de 2mg/kg; el tratamiento se continuó con heparina de bajo peso molecular 10000 U/día, ticlopidina 500 mg/día y aspirina 150 mg/día durante 4 semanas y se siguió con clopidogrel y aspirina durante un año. Cinco pacientes recibieron dosis convencionales de abcisimax (0,25 mg/kg en bolo y perfusión intravenosa de 0,125 µg/kg/min durante 12 horas) que se iniciaron durante la revascularización. La heparina circulante fue neutralizada con protamina tras el procedimiento. Después se retiró el introductor femoral y se efectuó el cierre de la punción arterial con un dispositivo Angioseal de 8 F. A los 3 meses de seguimiento se realizó un nuevo estudio hemodinámico. En este

estudio la ventriculografía izquierda, la coronariografía y la determinación de la reserva coronaria se realizaron en condiciones idénticas a las del estudio anterior.

### **3.2.2. Estudio comparativo entre la infusión intracoronaria de células madre y la movilización masiva de células madre con G-CSF en pacientes con IAM**

A todos los pacientes se les realizaron 2 cateterismos durante el estudio. El primero se llevó a cabo entre los días 0 y 5 tras el infarto y el segundo a los tres meses de seguimiento. A los pacientes aleatorizados al brazo de células madre se les realizó un cateterismo adicional entre los días 5 y 10 del infarto para la infusión intracoronaria de células. El tratamiento mecánico de la arteria descendente anterior se realizó con un stent liberador de rapamicina (Cypher®), y tras la revascularización se realizó un estudio de reserva coronaria para evaluar la situación del lecho vascular. En 9 pacientes se precisó el uso de un cateter de aspiración para la extracción del trombo. Todos los procedimientos terapéuticos se llevaron a cabo con catéteres 8 F y recibieron heparina no fraccionada a razón de 2mg/kg; el tratamiento se continuó con heparina de bajo peso molecular 10000 U/día, ticlopidina 500 mg/día y aspirina 150 mg/día durante 4 semanas y se siguió con clopidogrel y aspirina durante un año. Catorce pacientes recibieron dosis convencionales de abcisimax (0,25 mg/kg en bolo y perfusión intravenosa de 0,125 µg/kg/min durante 12 horas) que se iniciaron durante la revascularización. La heparina circulante fue neutralizada con protamina tras el procedimiento. Después se retiró el introductor femoral y se efectuó el cierre de la punción arterial con un dispositivo Angioseal de 8 F. A los 3 meses de seguimiento se realizó un nuevo estudio hemodinámica en condiciones idénticas al estudio basal.

### **3.2.3 Evaluación de la infusión de células madre derivadas de médula ósea en pacientes con cardiopatía isquémica crónica. Estudio observacional**

En este estudio se realizaron 2 cateterismos, en el primero de ellos se revascularizó la arteria descendente anterior con stent liberador de rapamicina. En 4 pacientes hubo que tratar territorios distintos al de la DA para conseguir una revascularización completa.

Todos los procedimientos terapéuticos se llevaron a cabo con catéteres 8 F y recibieron heparina no fraccionada a razón de 2mg/kg; el tratamiento se continuó con heparina de bajo peso molecular 10000 U/día, ticlopidina 500 mg/día y aspirina 150 mg/día durante 4 semanas y se siguió con clopidogrel y aspirina durante un año.

La heparina circulante fue neutralizada con protamina tras el procedimiento. Después se retiró el introductor femoral y se efectuó el cierre de la punción arterial con un dispositivo Angioseal de 8 F. A los 6 meses de seguimiento se realizó un nuevo estudio hemodinámica en condiciones idénticas al estudio basal.

### 3.3 Estudios de función ventricular izquierda

El modelo escogido para el estudio, el infarto anterior extenso, permite un análisis minucioso del sinergismo de la pared anterior del ventrículo izquierdo, que es nítidamente observable en una proyección oblicua anterior derecha.

El estudio de función ventricular se realizó en la condición basal y al seguimiento (a los 3 meses en el estudio observacional con factor y en el comparativo células-factor y a los 6 meses en es estudio de crónicos).

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 cateter pigtail de 7 F. Se inyectaron 40 ml de contraste no ionico a una velocidad de 15 ml/seg. Durante la realización de la ventriculografía se consiguieron latidos sinusales y latidos postextrasistólicos<sup>154</sup> para determinar la reserva contráctil de dos áreas ventriculares: el area afectada por el infarto (pared anterior) y las zonas hipercinéticas compensadoras (pared inferior). Los latidos postextrasistólicos fueron inducidos mediante el propio cateter, una vez filmado un latido sinusal bien opacificado. En todas las ocasiones, el intervalo R-R' del latido prematuro inducido y de la pausa post extrasistólica fueron registradas y medidas.

Las mediciones y cálculos se realizaron off line. Se calculó la fracción de eyección y los volúmenes ventriculares, y se efectuó un análisis de la motilidad regional de la pared. Se utilizó el método de Sheehan et al<sup>155</sup> para estudiar la extensión del daño parietal. El segmento de contracción anormal fue definido como el porcentaje de radios con aquinesia o

disquinesia. El número de radios afectados se definió como el número de radios aquinéticos, disquinéticos e hipoquinéticos. Así, se observó de forma seriada el comportamiento del miocardio infartado tras el tratamiento, lo que permitió evaluar la posible respuesta. La recuperación funcional se definió como la ganancia en la FE, la reducción del area infartada y del número de radios afectados entre la situación basal y la del seguimiento. Adicionalmente también se evaluó el comportamiento de las zonas hiperquinéticas compensadoras.

### 3.4 Estudio vascular: medición de reserva coronaria

Se utilizó el sistema Flow-map® para medir las velocidades intracoronarias y de la reserva coronaria (CFR)<sup>156</sup> Tras la revascularización de la descendente anterior, se posicionó una guía doppler intracoronaria de 0,014 pulgadas distal al stent. La velocidad de flujo se registró 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 (figura 9). La CFR fue calculada como la relación entre la la velocidad de flujo máxima tras la inyección de adenosina y la velocidad de flujo basal. A los tres meses de seguimiento se efectuó un nuevo estudio doppler en la descendente anterior. La recuperación funcional de la microcirculación infartada fue definida como la ganancia en CFR entre la fase aguda y el seguimiento.

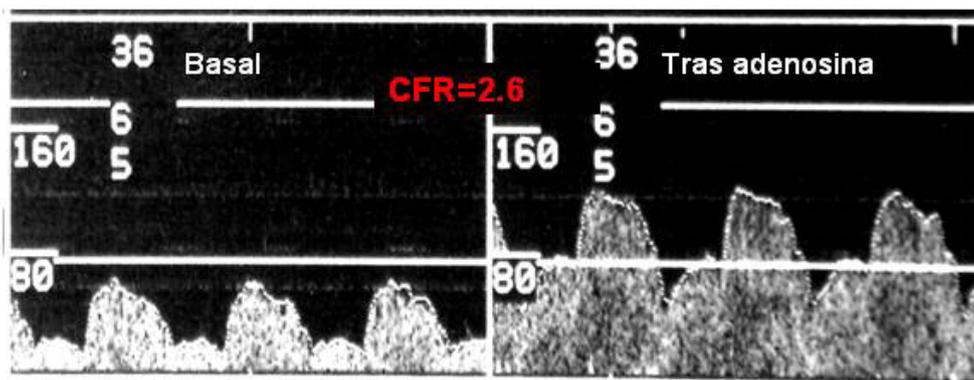


Figura 9. Reserva coronaria de flujo obtenido de la razón de la velocidad pico en condiciones basales y tras adenosina

### 3.5 Movilización con G-CSF y estudios de laboratorio

Los pacientes que recibieron G-CSF de forma subcutánea (13 pacientes del estudio observacional y 10 pacientes del estudio aleatorizado) lo hicieron durante 10 días a razón de 5 µg/Kg cada 12 h. Se obtuvo una muestra de sangre periférica los días 0, 3, 5 y 10. Se realizó un recuento total de serie blanca, del porcentaje de células CD 34 + circulantes y de su inmunofenotipo. Asimismo se determinaron las enzimas cardíacas durante la fase aguda y el tratamiento con G-CSF.

<b>Marcadores de membrana de células mononucleares</b> <i>(Infundidas/Circulantes en pacientes tratados con G-CSF)</i>	
<b>cd34+</b>	<b>Marcador de pluripotencialidad</b>
<b>Subpoblaciones de células mononucleares cd34+</b>	
<b>cd117+</b>	Células con expresión mieloide. Diferenciación en células endoteliales. Capacidad de angiogénesis
<b>cd33+</b>	Células con expresión mieloide.
<b>cd41+</b>	Células con expresión megacariocítica
<b>cd71+</b>	Células con expresión eritroide
<b>cxcr4+</b>	Marcador de pluripotencialidad. Diferenciación en células estromales y endoteliales
<b>HLAdr-</b>	Marcador de pluripotencialidad
<b>cd38-</b>	Marcador de pluripotencialidad
<b>cd90+</b>	Marcador de pluripotencialidad

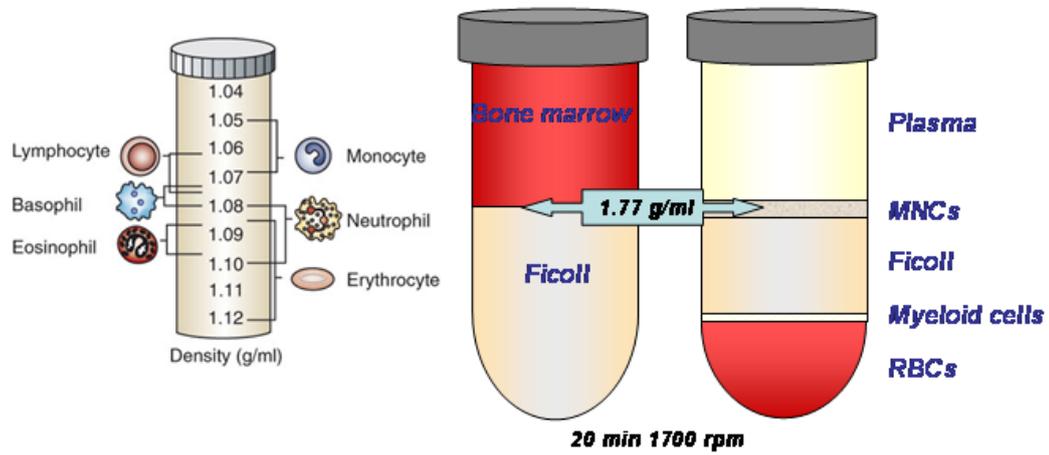
Figura 10. Características de las subpoblaciones CD34

La cuantificación en la sangre periférica de CD34+ movilizados con G-CSF fue realizada en concordancia con las guías ISHAGE<sup>157</sup>. Se utilizó la citometría de inmunofluorescencia de 3 colores para determinar la expresión de diferentes moléculas de CD 34+ movilizadas en la sangre periférica (figura 10). Las células se tiñeron con anticuerpos monoclonales de CD 34 humano marcados con la proteína peridín-clorofila (PerCP) y con los siguientes AC monoclonales antihumanos: anti-CD33, anti-CD 117, anti CD 41, anti CD 71, anti-fusin, anti CD-90, anti-HLA-DR y el anti-CD38 marcados con fluoresceína isotiocianato o ficoeritrina. Las características de los distintos marcadores de membrana de las subpoblaciones CD 34 quedan resumidas en la figura 10. Las células fueron cosechadas y analizadas en el citómetro de flujo FACS calibur utilizando el programa cell-quest. Para distinguir las poblaciones de células hemopoyéticas de los eritrocitos y de los residuos se utilizaron las señales esparcidas delanteras y laterales.

### 3.6 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 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 mediante aspiraciones repetidas sobre la cresta ilíaca posterior bajo anestesia local, hasta alcanzar un volumen aproximado de 100-150 ml de médula. La médula obtenida 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 en la eliminación de plasma, hematíes y granulocitos, obteniéndose exclusivamente Células Mononucleadas (CMN) (Figura 11).

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 se introducen en una jeringa a través de la cual se inyectarán en el catéter. Se obtienen muestras para recuento celular, viabilidad y control microbiológico de cada uno de los injertos, así como las muestras necesarias para investigación.



**Médula ósea autóloga para infusión intracoronaria**

**Procedimiento**



Extracción de 100-150 ml de médula ósea



Centrifugación en gradiente de densidad sobre Ficoll



Reducción de volumen final a 10 ml

**Figura 11. Preparación de células madre.**

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.

Se tomaron muestras de las células madre infundidas a los pacientes con infartos crónicos para ser estudiadas *in vitro* y poder analizar la capacidad migratoria de las mismas.

### 3.7 Infusión intracoronaria de células madre

En el estudio aleatorizado, antes de los 10 días del infarto se programó un cateterismo para la infusión de células madre en los pacientes asignados a este grupo. En el estudio observacional con infartos de más de un mes de evolución la infusión se hizo tras obtener una revascularización completa. Se les realizó ventriculografía izquierda y angiografía coronaria antes de la infusión. Las células se transplantaron directamente en la zona infartada mediante el uso de un cateter balón coaxial que se posicionó en la arteria descendente anterior a nivel del segmento stentado. El tamaño del balón se seleccionó en función del tamaño del vaso de forma que se consiguiera una oclusión completa y un “stop flow” durante la infusión de células. Con esto preveníamos la pérdida de células mediante flujo retrogrado y se proporcionaba un estancamiento del flujo que facilitaba el anidamiento celular. Una suspensión de 10 ml de células madre se inyectó a través del cateter balón durante 3 a 4 minutos.

### 3.8 Estudio estadístico

Todos los datos cuantitativos se expresan como media  $\pm$  desviación típica. Los datos cualitativos se expresan en porcentaje. Se estudió la normalidad de la muestra con el test estadístico de Kolmogorov-Smirnov. La t de Student pareado se utilizó para comparar medias en cada grupo, mientras que el análisis de la varianza y el test de Scheffé se utilizaron para comparar medias entre grupos (comparar tres valores cuantitativos). Para comparar variables

cuantitativas se utilizó el test de chi cuadrado. Los coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ) fueron calculados para valorar las asociaciones lineales. Se efectuó un cálculo del poder estadístico ( $1 - \beta$ ) para la comparación de la ganancia en FE. Se aceptó como significación estadística una  $p < 0.05$ . Para el análisis estadístico se ha utilizado el progre SPSS versión 13.0.

## **4. RESULTADOS**

## 4.1 Estudio observacional con G-CSF en pacientes con IAM.

### Hallazgos clínicos y de laboratorio

Todos los pacientes sobrevivieron al IAM. Cuatro de ellos precisaron fármacos inotropos durante la fase aguda. Ningún paciente presentó complicaciones derivadas del cateterismo cardiaco, tanto en la fase aguda como en el seguimiento. Durante el tratamiento con G-CSF no se observaron aumentos adicionales de las enzimas cardiacas. Se registraron cifras elevadas de leucocitos circulantes durante el tratamiento con G-CSF junto con un aumento del número total de CD34+, cuyo valor máximo se alcanzó al quinto día del inicio del tratamiento.

En la figura 12 se muestra el efecto de G-CSF en los recuentos de serie blanca de sangre periférica, así como el número total de células circulantes. El análisis inmunofenotípico de las células CD 34+ circulantes en el quinto día del tratamiento demostró que aunque muchas células expresaban los marcadores hematopoyéticos típicos (CD33, CD117, CD41, CD71), muchas otras mostraban características de células madre muy inmaduras (CD38-, HLA-DR-, CD90+), proporcionando un número total considerable de células CD34+ teóricamente pluripotentes.

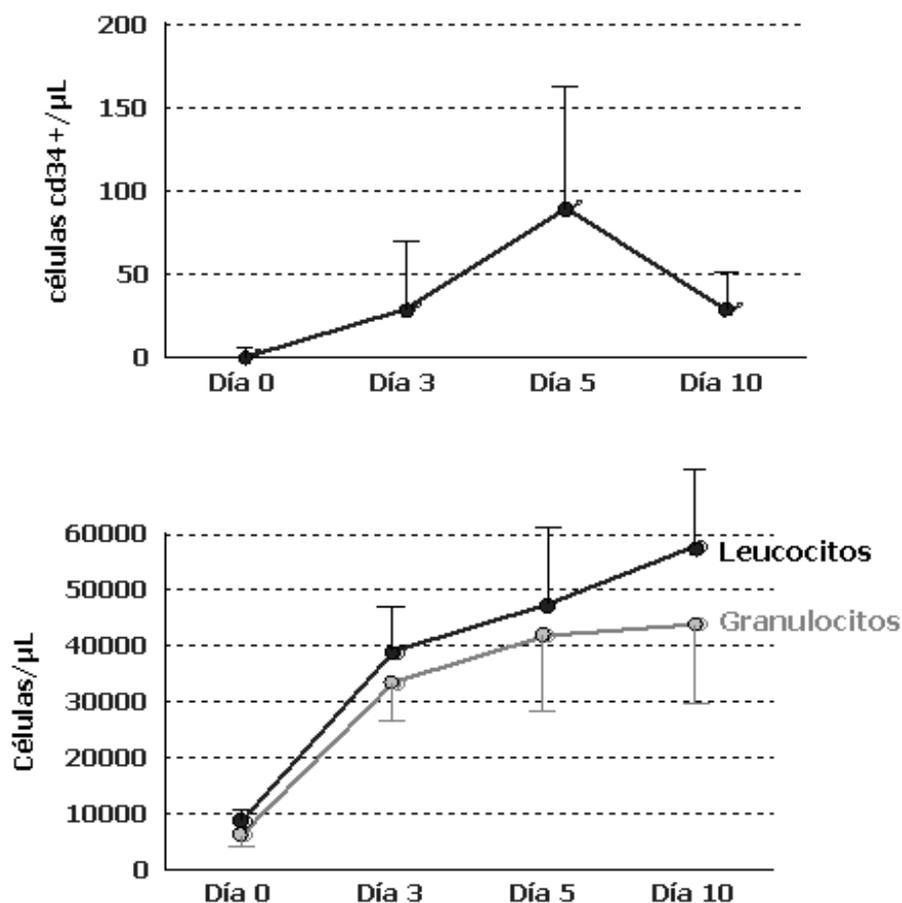


Fig. 12. Determinación seriada del número absoluto de las células CD34+ (arriba) y de leucocitos y granulocitos (abajo) durante el tratamiento con G-CSF. La concentración máxima de CD34+ se observó el quinto día de tratamiento.

En la tabla 5 se exponen los porcentajes y números totales de las distintas subpoblaciones de los CD34+ circulantes. Todos los pacientes fueron dados de alta sin síntomas y bajo tratamiento vasodilatador y antitrombótico. Como efectos adversos se observaron con frecuencia febrícula y dolor muscular leve, normalmente bien tolerados por parte de los pacientes.

**TABLA 5. Inmunofenotipo de células CD 34+ movilizadas al quinto día de tratamiento con G-CSF**

	CD38 -	HLADr-	CXCR4+	CD90+	CD33+	CD117+	CD41+	CD71+
<b>% de CD34+</b>	13.9±9.8	12.3±1.4	7.5±5.8	17.3±4.3	21.6±9.2	67±16.3	4.2±1.1	5.4±1.6
<b>Total circulantes (cells / <math>\mu</math>L)</b>	17±6	13±4	3±1	21±10	22±12	61.4±2.9	3±0.7	6±2

No obstante, el mayor efecto adverso fue observado en un paciente que presentó una rotura esplénica espontánea (figura 13) y precisó una esplenectomía de urgencia en el día 13 tras el IAM, todavía bajo tratamiento con G-CSF. La administración del factor fue interrumpida y el paciente evolucionó favorablemente tras la cirugía. El estudio anatomopatológico puso de manifiesto signos de esplenitis aguda severa y una hemorragia subcapsular como causa de la rotura. Tras un seguimiento clínico medio de 9±2 meses, los 13 pacientes siguieron asintomáticos. Hasta el momento no se han registrado episodios de angina o fallo cardíaco en ningún paciente. La media de  $\Sigma$ Q obtenida en los electrocardiogramas mostró una disminución significativa en el seguimiento (tabla 6) lo que sugeriría algún grado de recuperación eléctrica.

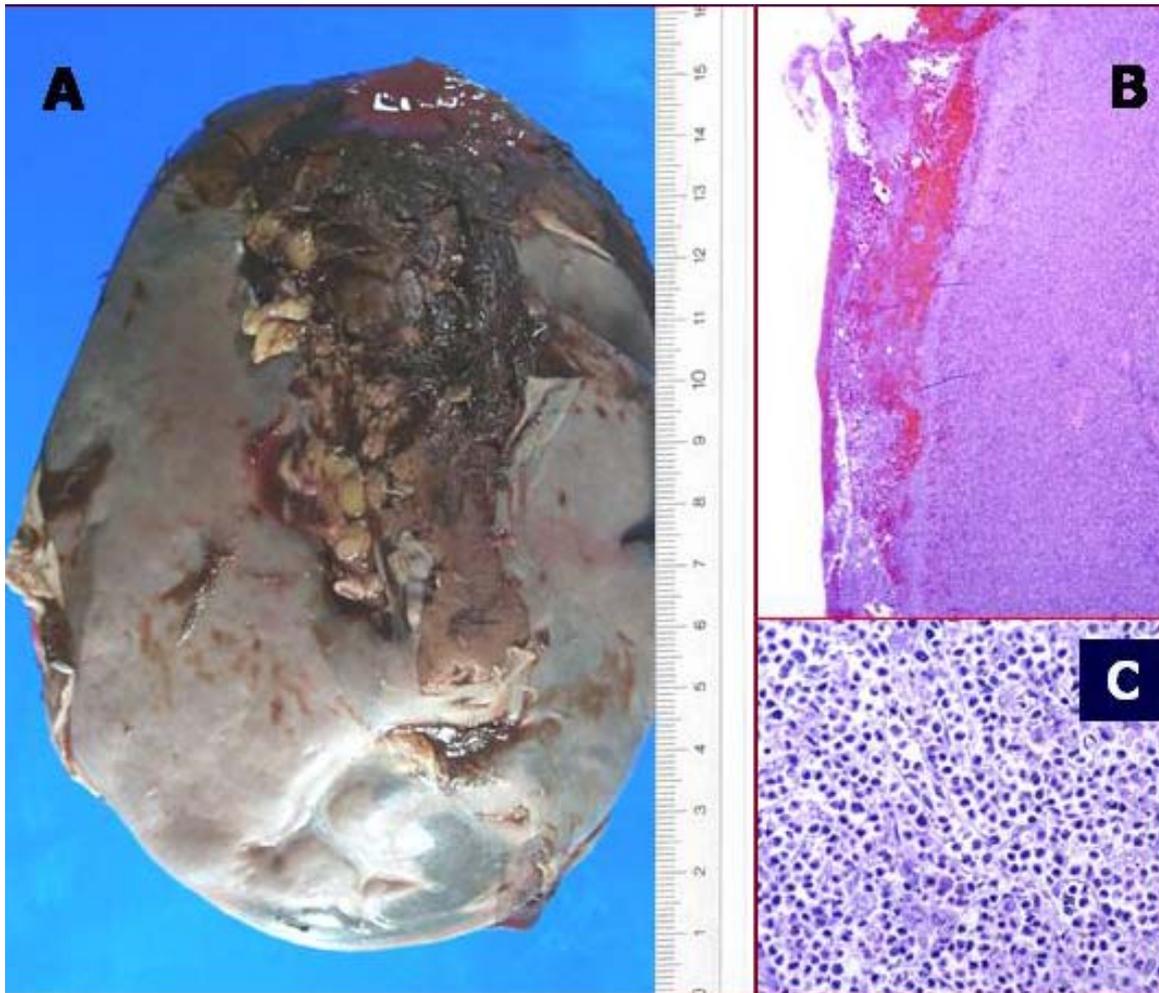


Figura 13 Imagen del bazo tras esplenectomía y corte anatomo patológico

### Hallazgos hemodinámicos y angiográficos

En la tabla 6 se exponen los cambios principales observados en la función ventricular izquierda global y regional, desde la fase aguda hasta los 3 meses de seguimiento. Como se pudo observar no hubo cambios significativos en los volúmenes cardiacos. No obstante, se apreció una mejora en la función global y regional en el seguimiento.

<b>TABLA 6. Hallazgos clínicos, hemodinámicos y angiográficos</b>			
	<b>Basal</b>	<b>3-meses</b>	<b>p</b>
<b><math>\Sigma</math>Q (mm) pared anterior</b>	<b>30±18</b>	<b>19±14</b>	<b>0.001</b>
<b>PTDVI (mmHg)</b>	<b>27±10</b>	<b>24±11</b>	<b>NS</b>
<b>CFR</b>	<b>1.4±0.3</b>	<b>2.4±0.6</b>	<b>NS</b>
<b>VTDVli (ml/m<sup>2</sup>)</b>	<b>138±21</b>	<b>175±43</b>	<b>NS</b>
<b>VTSVli (ml/m<sup>2</sup>)</b>	<b>82±17</b>	<b>98±49</b>	<b>NS</b>
<b>Fracción de eyección (%) (sinusal)</b>	<b>40±7</b>	<b>46±15</b>	<b>0.1</b>
<b>Fracción de eyección (%) (post-PVC)</b>	<b>53±9</b>	<b>58±14</b>	<b>NS</b>
<b>SCA (%) (sinusal)</b>	<b>32±16</b>	<b>21±16</b>	<b>0.002</b>
<b>SCA (%) (post-PVC)</b>	<b>20±16</b>	<b>12±14</b>	<b>0.03</b>
<b>% de radios afectados (sinusal)</b>	<b>46±14</b>	<b>36±24</b>	<b>0.001</b>
<b>% de radios afectados (post-PVC)</b>	<b>36±15</b>	<b>24±21</b>	<b>0.04</b>
<b>MLD-post (mm)</b>	<b>3.2±0.5</b>	<b>2.9±0.7</b>	<b>NS</b>

SCA: segmentos de contracción anormal ; CFR: reserva de flujo coronario; VTDVI: volumen telediastólico del VI; PTDVI: presión telediastólica del VI; VTSVI: volumen telesistólico del VI; MLD: mínimo diámetro luminal obtenido en la lesión diana tras la revascularización; PVC: latido ventricular prematuro ;  $\Sigma$ Q: sumatorio de onda Q;

El porcentaje de segmentos de contracción anormal (SCA) y de radios afectados de la pared anterior en los latidos sinusales presentó una importante reducción en el seguimiento, sin que se observaran cambios en las zonas compensadoras de la pared inferior (tabla 7). Esto condujo a un leve, aunque no significativo incremento de la FE global. De forma similar, los latidos postextrasistólicos mostraron mejora significativa en la capacidad contráctil de la

pared anterior. La CFR del territorio infartado mejoró de forma significativa en el seguimiento y recuperó la respuesta normal a los estímulos vasodilatadores. No hubo relación entre la ganancia en CFR y la observada en la FE.

**TABLA 7. Cambios observados en la asinergia ventricular izquierda**

	% de acortamiento de la pared ventricular		p
	Basal	3-Meses	
<b>PARED ANTERIOR</b>			
<b>a- sinusal</b>	<b>46±16</b>	<b>46±21</b>	<b>NS</b>
<b>a- post-EV#</b>	<b>53±12</b>	<b>52±20</b>	<b>NS</b>
<b>b- sinusal</b>	<b>3±9</b>	<b>13±13</b>	<b>0.02</b>
<b>b- post-EV#</b>	<b>7±7</b>	<b>16±15</b>	<b>0.05</b>
<b>c- sinusal</b>	<b>-0.1±13</b>	<b>7±12</b>	<b>0.05</b>
<b>c- post-EV#</b>	<b>6±13</b>	<b>18±17</b>	<b>0.02</b>
<b>PARED INFERIOR</b>			
<b>a- sinusal</b>	<b>25±9</b>	<b>25±8</b>	<b>NS</b>
<b>a'- post-EV#</b>	<b>33±14</b>	<b>30±6</b>	<b>NS</b>
<b>b'- sinusal</b>	<b>36±12</b>	<b>35±15</b>	<b>NS</b>
<b>b'- post-EV#</b>	<b>43±14</b>	<b>45±11</b>	<b>NS</b>
<b>c'- sinusal</b>	<b>32±15</b>	<b>32±28</b>	<b>NS</b>
<b>c'- post-PVC#</b>	<b>44±18</b>	<b>45±28</b>	<b>NS</b>

\***a**: anterobasal ; **b**: antero-ecuatorial; **c**: antero-apical; **a'**: inferobasal;  
**b'**: infero-ecuatorial; **c'**: infero-apical; #**EV**: latido ventricular prematuro

### Determinantes de recuperabilidad funcional

La ganancia absoluta de FE osciló entre -22 y +18% ( $6,2 \pm 12,3$ ) y se correlacionó de forma significativa ( $r = 0,71$ ;  $p < 0,006$ ) con la ganancia en el porcentaje de radios afectados de la pared anterior. De esta manera, aunque la recuperación funcional global varió entre los pacientes, los cambios observados dependían mayormente de los cambios en la pared anterior (figura 14).

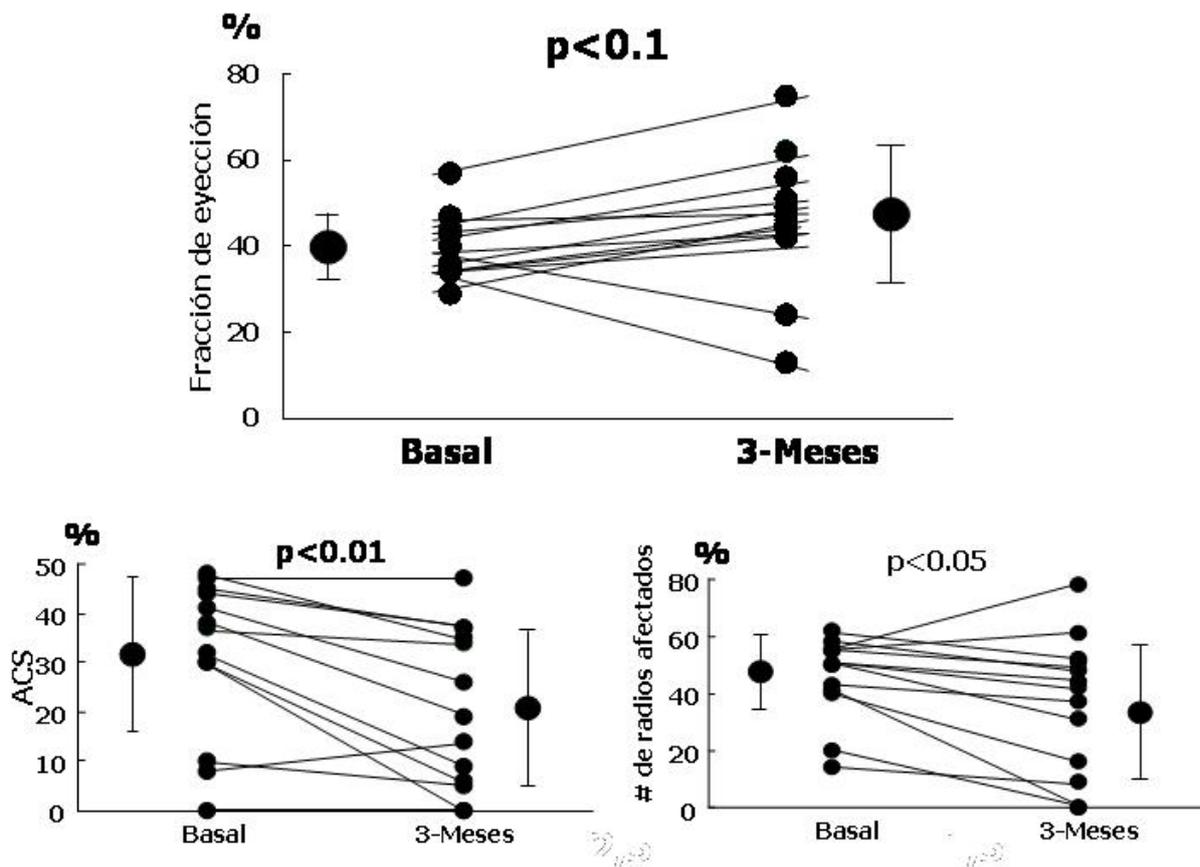


Figura 14. Cambios individuales observados en la fracción de eyección (FE), el segmento de contracción anormal (ACS) y el número de radios afectados de la pared anterior.

En la figura 15 se muestra un ejemplo en el que se producen cambios eléctricos llamativos y en la figura 16 un ejemplo de recuperación funcional significativa. No obstante la función de 2 pacientes (15%) evolucionó de forma desfavorable; a los 3 meses de seguimiento se constató en ellos un claro empeoramiento de la función ventricular izquierda global.

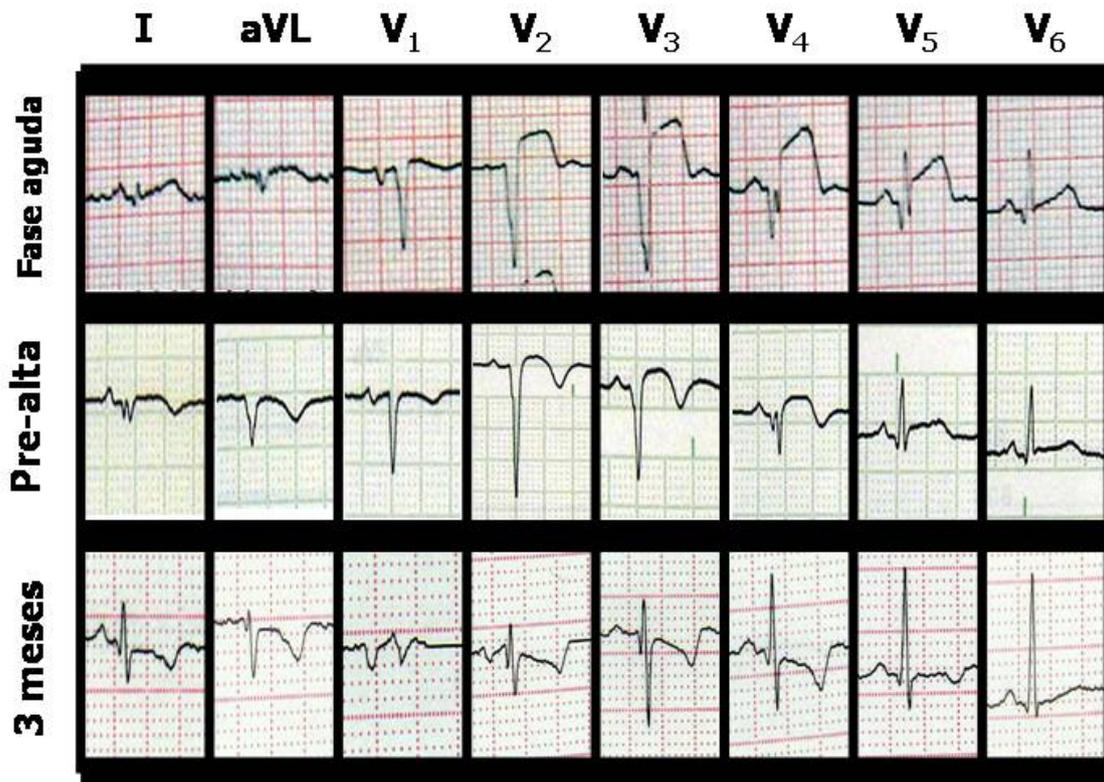


Figura 15. Electrocardiograma al ingreso, al alta y a los 3 meses de seguimiento, observándose una disminución de la onda Q de necrosis

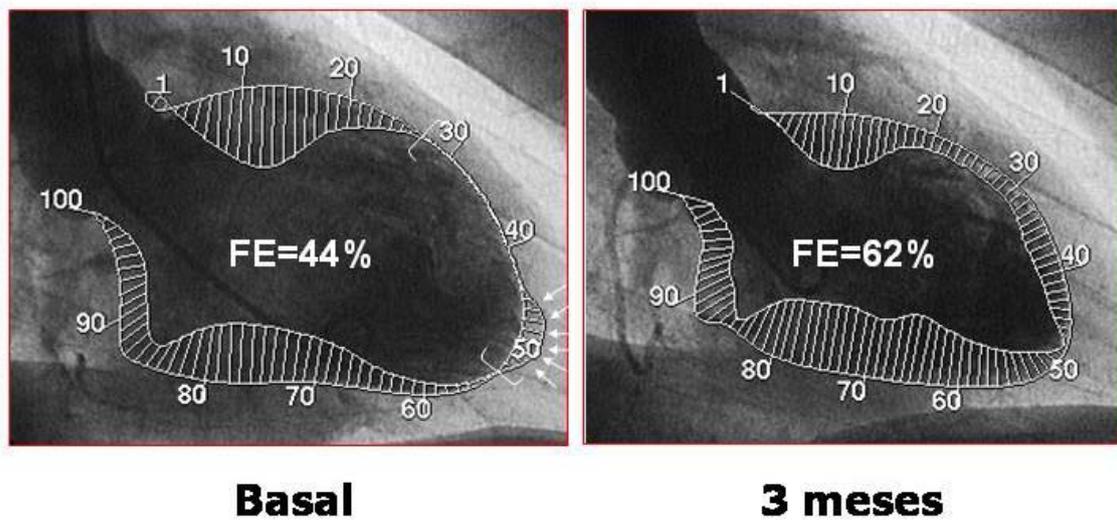


Figura 16. ventriculografía basal y a los 3 meses de seguimiento. Se observa una mejoría funcional significativa al seguimiento. Las flechas muestran el segmento discinético en el ápex. Los corchetes marcan el segmento de contractilidad

Investigamos los factores que podían influir en la recuperación funcional (figura 17).

La ganancia en la FE se relacionó de forma inversa con la presión telediastólica ventricular izquierda en situación basal ( $r = 0,56$ ;  $p < 0,05$ ) y con el valor máximo de la fracción MB de la CK ( $r = -0,82$ ;  $p < 0,002$ ). Estos hallazgos sugieren que un mayor tamaño del infarto ejerce una influencia adversa en el grado de recuperación funcional. Por el contrario la ganancia en la FE se correlacionó de forma directa con el número total de células CD34+38- circulantes al quinto día de tratamiento con G-CSF ( $r = 0,78$ ;  $p < 0,003$ ). Asimismo, el número total de CD34/ $\mu$ l circulantes se correlacionó con el porcentaje de ganancia en la FE ( $r = 0,66$ ;  $p < 0,05$ ). La FE del latido postextrasistólico en condición basal se correlacionó de forma significativa ( $r = 0,70$ ;  $p < 0,01$ ) con la FE en el latido sinusal al seguimiento.

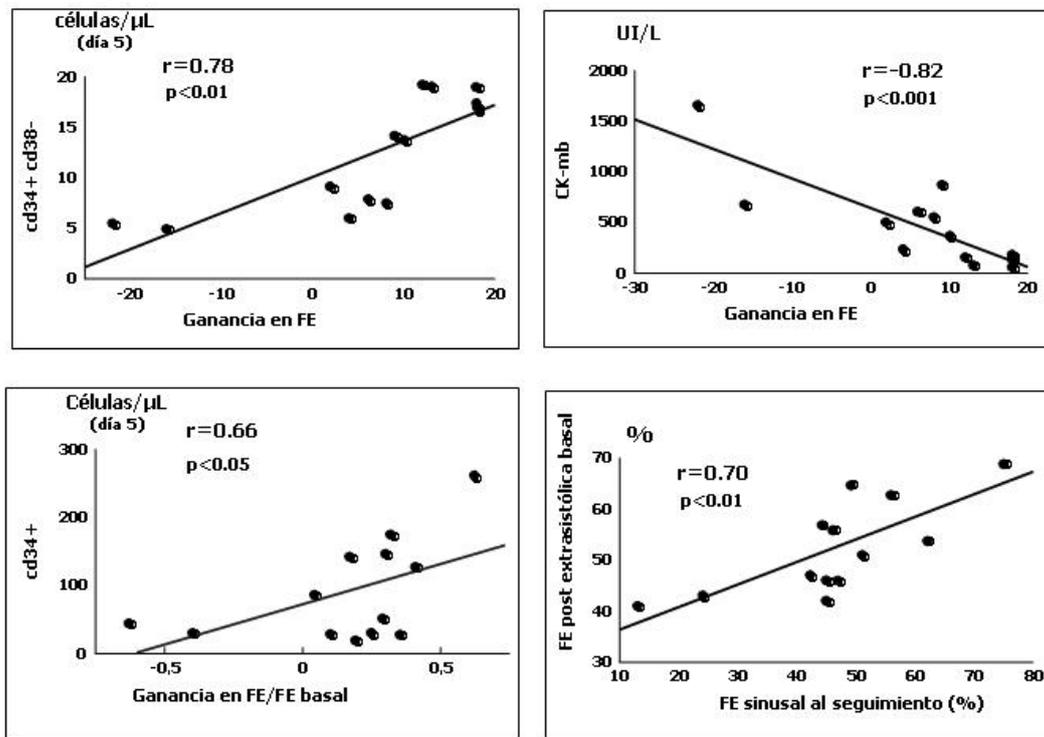


Figura 17 Correlaciones significativas en nuestro estudio

La CFR basal, obtenida inmediatamente después de la implantación del stent, se relacionó de forma inversa con el porcentaje de SCA ( $r = -0,75$ ;  $p<0,003$ ) en la condición basal. Por lo que se refiere a la recuperación funcional de la red capilar de la región infartada, la ganancia absoluta en CFR osciló entre -0,5 y + 2,2 ( $0,98 \pm 0,62$ ). Este incremento no se correlacionó con los parámetros de función ventricular izquierda basal y fue independiente de los cambios de ésta. De igual forma los cambios observados en la CFR no se correlacionaron con el número total de CD34+38- circulantes en el quinto día de tratamiento con factor.

## 4.2 Estudio comparativo entre la infusión intracoronaria de células madre y la movilización masiva de células madre con G-CSF en pacientes con IAM

### Hallazgos clínicos, angiográficos y de laboratorio

La tabla 8 muestra los principales hallazgos clínicos y angiográficos basales en los 3 grupos. No hubo diferencias significativas entre los grupos en términos de tiempo de recanalización, elevación enzimática pico,  $\Sigma Q$  o parámetros basales de función ventricular. Todos los pacientes sobrevivieron al IAM. Doce de ellos necesitaron drogas inotrópicas durante la fase aguda. Ningún paciente presentó complicaciones secundarias a cualquier estudio hemodinámico realizado durante la fase hospitalaria o al seguimiento. En los pacientes del grupo I, el número total de células mononucleares infundidas fue de  $9 \pm 3 \cdot 10^8$ . De ellas,  $17 \pm 13 \cdot 10^6$  fueron CD34+. Los pacientes del grupo II evidenciaron una movilización significativa mediante la elevación de leucocitos circulantes y células CD34+ durante la administración G-CSF. Los niveles máximos de progenitores circulantes fueron observados el día 5 tras el comienzo de la administración de G-CSF. La tabla 9 resume estos hallazgos. En la valoración clínica a los 3 meses de seguimiento, 24 pacientes estaban en clase funcional I, 4 pacientes estaban en clase funcional II y 2 pacientes en clase funcional III. No hubo reestenosis en el estudio hemodinámico a los 3 meses. El diámetro mínimo de la luz del segmento tratado fue de  $2.6 \pm 0.7$  mm y la pérdida luminal tardía fue de  $0.3 \pm 0.4$  mm. No hubo diferencias en clase funcional o en medidas lumbales entre los distintos grupos.

**TABLA 8. Datos basales clínicos y angiográficos**

	<b>Grupo I (Infusión células)</b>	<b>Grupo II (G-CSF)</b>	<b>Grupo III (Control)</b>	<b>p&lt;</b>
<b>Edad (años)</b>	<b>52±12</b>	<b>54±9</b>	<b>55±11</b>	<b>NS</b>
<b>Sexo (masculino)</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>NS</b>
<b>Tiempo de recanalización (h)</b>	<b>4±2</b>	<b>5±3</b>	<b>4±3</b>	<b>NS</b>
<b>CK pico (IU/dl)</b>	<b>4455±1573</b>	<b>4936±3091</b>	<b>3063±1672</b>	<b>NS</b>
<b>CK mb pico (IU/dl)</b>	<b>464±264</b>	<b>579±472</b>	<b>248±197</b>	<b>NS</b>
<b>Σ Q</b>	<b>26±16</b>	<b>34±19</b>	<b>25±9</b>	<b>NS</b>
<b>Fracción de eyección (%)</b>	<b>37±5</b>	<b>39±5</b>	<b>38±6</b>	<b>NS</b>
<b>Presión telediastólica (mmHg)</b>	<b>30±8</b>	<b>29±10</b>	<b>25±7</b>	<b>NS</b>
<b>SCA* (%)</b>	<b>32±12</b>	<b>36±11</b>	<b>28±14</b>	<b>NS</b>
<b>Nº de radios afectados (%)</b>	<b>40±16</b>	<b>47±14</b>	<b>36±11</b>	<b>NS</b>
<b>Potenciación Post-PVC   (%)</b>	<b>15±8</b>	<b>11±7</b>	<b>13±8</b>	<b>NS</b>
<b>Reserva coronaria</b>	<b>1.5±0.3</b>	<b>1.4±0.3</b>	<b>1.7±0.4</b>	<b>NS</b>
<b>Intervalo RR (msec)</b>	<b>983±172</b>	<b>890±161</b>	<b>935±179</b>	<b>NS</b>
<b>Intervalo RR' (msec)</b>	<b>465±111</b>	<b>600±166</b>	<b>580±288</b>	<b>NS</b>
<b>Intervalo R'R (msec)</b>	<b>1152±280</b>	<b>1155±227</b>	<b>940±314</b>	<b>NS</b>

SCA: Segmento de contracción anormal; CK: creatin-quinasa; PVC: Contracción ventricular prematura.

**TABLA 9. Células infundidas y movilizadas**

	<b>Grupo I Células infundidas</b>	<b>Grupo II Células circulantes</b>
<b>MNCs* (x10<sup>8</sup>)</b>	<b>9±3</b>	---
<b>CD34+ cells (x10<sup>6</sup>)</b>	<b>17±13</b>	---
<b>Leucocitos (x10<sup>6</sup>/ml) (día 5 de tratamiento)</b>	---	<b>48±16</b>
<b>Leucocitos (x10<sup>6</sup>/ml) (día 10 de tratamiento)</b>	---	<b>54±16</b>
<b>Granulocitos (x10<sup>6</sup>/ml) (día 5 de tratamiento)</b>	---	<b>43±15</b>
<b>Granulocitos (x10<sup>6</sup>/ml) (día 10 de tratamiento)</b>	---	<b>42±16</b>
<b>Células CD34+ (x10<sup>3</sup>/ml) (día 5 de tratamiento)</b>	---	<b>88±79</b>
<b>Células CD34+ (x10<sup>3</sup>/ml) (día 10 de tratamiento)</b>	---	<b>29±25</b>

**MNCs\*:** Células mononucleares.

### **Volúmenes ventriculares y función cardiaca**

La tabla 10 muestra los cambios observados en los volúmenes de VI y en los parámetros funcionales en los 3 grupos. Se observó una reducción significativa en los volúmenes al seguimiento en el grupo I. En cambio, los pacientes de los grupos II y III no

tuvieron reducciones similares de los volúmenes ventriculares al seguimiento. La FE aumentó significativamente al seguimiento en el grupo I, no observándose cambios significativos en los grupos II y III. La proporción de la recuperación en FE al seguimiento no fue diferente entre los grupos II y III. Además, el porcentaje del SCA 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.

**TABLA 10. Volúmenes y función ventricular izquierda**

	Grupo I (Infusión de células)		Grupo II (G-CSF)		Grupo III (Control)	
	Basal	3 meses	Basal	3 meses	Basal	3 meses
<b>VTDVI (ml/m<sup>2</sup>)</b>	<b>142±35</b>	<b>134±29</b>	<b>141±21</b>	<b>182±46</b>	<b>140±30</b>	<b>159±43</b>
<b>VTSVI (ml/m<sup>2</sup>)</b>	<b>89±27</b>	<b>61±19</b>	<b>87±15</b>	<b>110±50</b>	<b>83±25</b>	<b>87±35</b>
<b>FE (%)</b>	<b>37±5</b>	<b>58±9</b>	<b>37±5</b>	<b>42±14</b>	<b>39±6</b>	<b>45±8</b>
<b>SCA (%)</b>	<b>33±12</b>	<b>8±10</b>	<b>39±7</b>	<b>25±16</b>	<b>27±13</b>	<b>16±9</b>
<b>Radios afectados (%)</b>	<b>47±6</b>	<b>24±17</b>	<b>52±6</b>	<b>44±20</b>	<b>46±11</b>	<b>36±20</b>

SCA: Segmento de contracción anormal. FE: fracción de eyección. VTDVI: volumen telediastólico de ventrículo izquierdo. VTSVI: Volumen telesistólico de ventrículo izquierdo

### **Grado de recuperación funcional**

La figura 18 y la tabla 11 muestran la ganancia neta observada en parámetros funcionales en los 3 grupos. Los pacientes del grupo I siempre mostraron una ganancia favorable en FE que osciló entre +11% y +34%. Los pacientes del grupo II mostraron una

ganancia en FE que osciló entre -22% y +18%. La ganancia en FE en pacientes del grupo control (grupo III) osciló entre -6% y +21%. La ganancia en FE, SCA y número de radios afectados fué significativamente mayor en pacientes tratados con infusión de células intracoronarias.

**TABLA 11. Ganancia neta en recuperación funcional**

	<b>Grupo I células</b>	<b>Grupo II (G-CSF)</b>	<b>Grupo III (Control)</b>	<b>Anova p&lt;</b>
<b>Ganancia en FE</b>	<b>20±8</b>	<b>4±13*</b>	<b>6±10**</b>	<b>0.003</b>
<b>Ganancia en SCA</b>	<b>-20±15</b>	<b>-12±11</b>	<b>-6±3**</b>	<b>0.05</b>
<b>Ganancia en radios afectados</b>	<b>-26±11</b>	<b>-9±16**</b>	<b>-12±12</b>	<b>0.05</b>
<b>Ganancia en CFR</b>	<b>0.9±0.7</b>	<b>1.1±0.5</b>	<b>0.4±0.7</b>	<b>ns</b>
<b>Ganancia en <math>\Sigma</math> Q</b>	<b>-12±10</b>	<b>-13±10</b>	<b>-6±5</b>	<b>ns</b>

SCA: Segmento de contracción anormal; CFR: Reserva coronaria;  
FE: Fracción de eyección. \* p<0.01 vs grupo I. \*\* p<0.05 vs grupo I

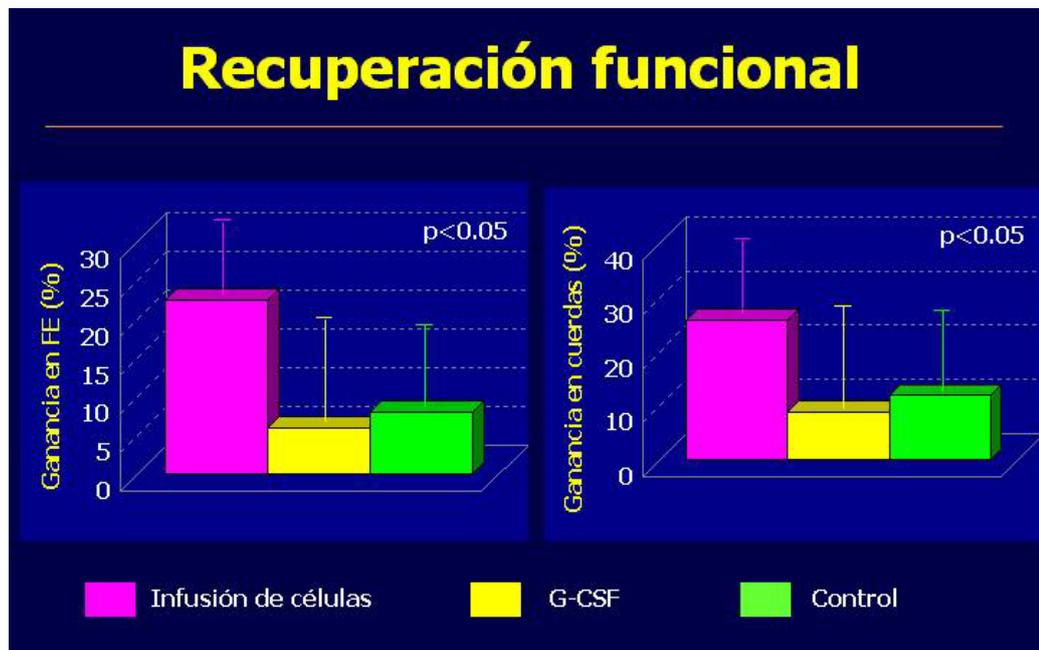


Figura 18. Ganancia en fracción de eyección y cuerdas en los 3 grupos

Se observó una correlación significativa ( $r=0.81$ ;  $p<0.001$ ) entre la ganancia en FE y la reducción en el número de radios afectados en la pared anterior, sugiriendo que los aumentos en la función global fueron principalmente secundarios a la recuperación de la pared anterior infartada. Los pacientes del grupo I mostraron una mejora significativa, no solo en la FE del latido sinusal sino también en la del latido post-extrasistólico, lo cuál no fue observado en los grupos restantes (figura 19).

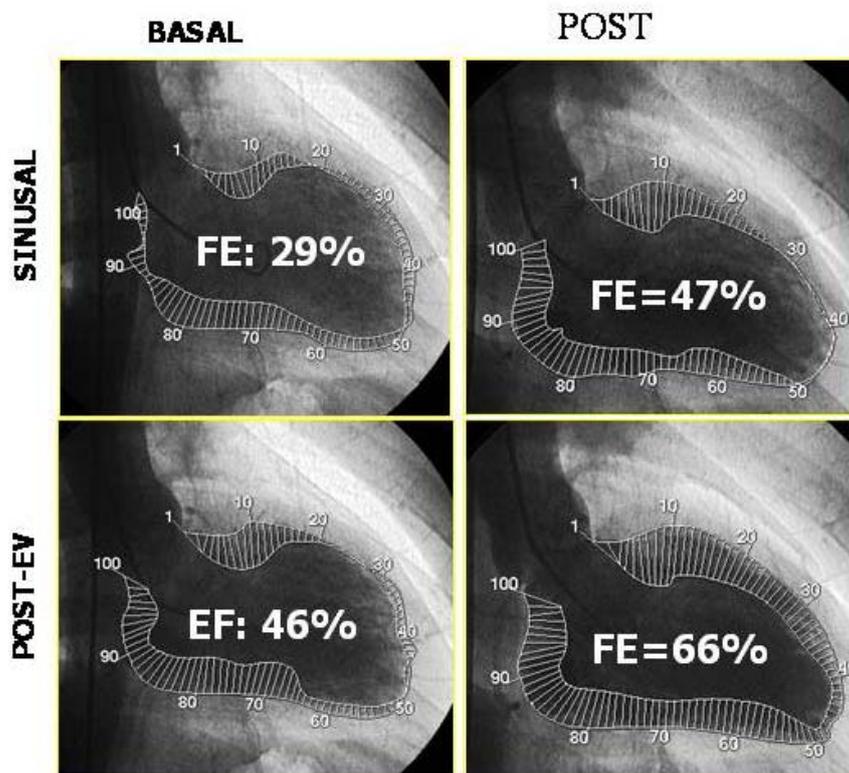


Figura 19. Ventriculografía de latido sinusal y post extrasistólico en condición basal y al seguimiento.

Este hallazgo puede sugerir una mejoría funcional adicional en reserva contráctil en los pacientes que recibieron transferencia de células intracoronarias. Se observó una correlación inversa significativa, ( $r = -0.45$ ;  $p = 0.02$ ) entre la CK pico y la ganancia en FE, lo que sugiere una peor recuperación funcional en pacientes con mayor daño valorado por métodos enzimáticos (figura 20).

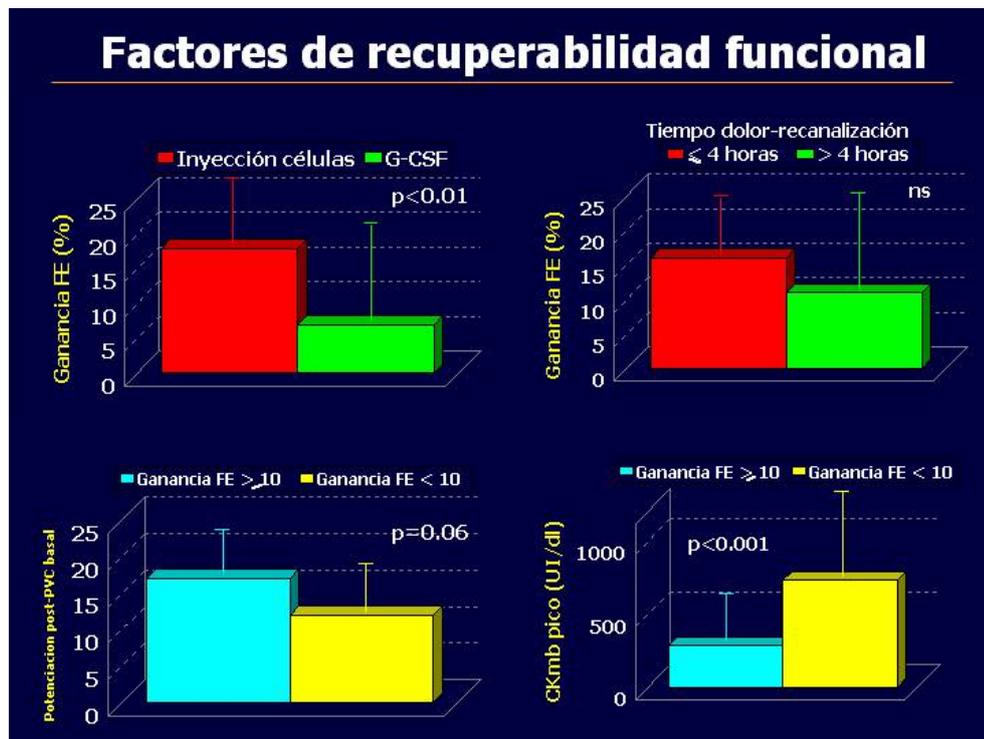


Figura 20. Factores de recuperabilidad funcional

La potenciación post-extrasistólica basal se correlacionó ( $r=0.39$ ;  $p=0.04$ ) con la ganancia en FE sinusal al seguimiento. Además, hubo una correlación significativa ( $r=0.80$ ;  $p<0.001$ ) entre la FE post-extrasistólica a los 3 meses y la ganancia neta en FE sinusal. La CFR no se correlacionó con los parámetros de función ventricular y la ganancia en CFR tampoco se correlacionó con la ganancia en FE en ningún grupo (figura 21).

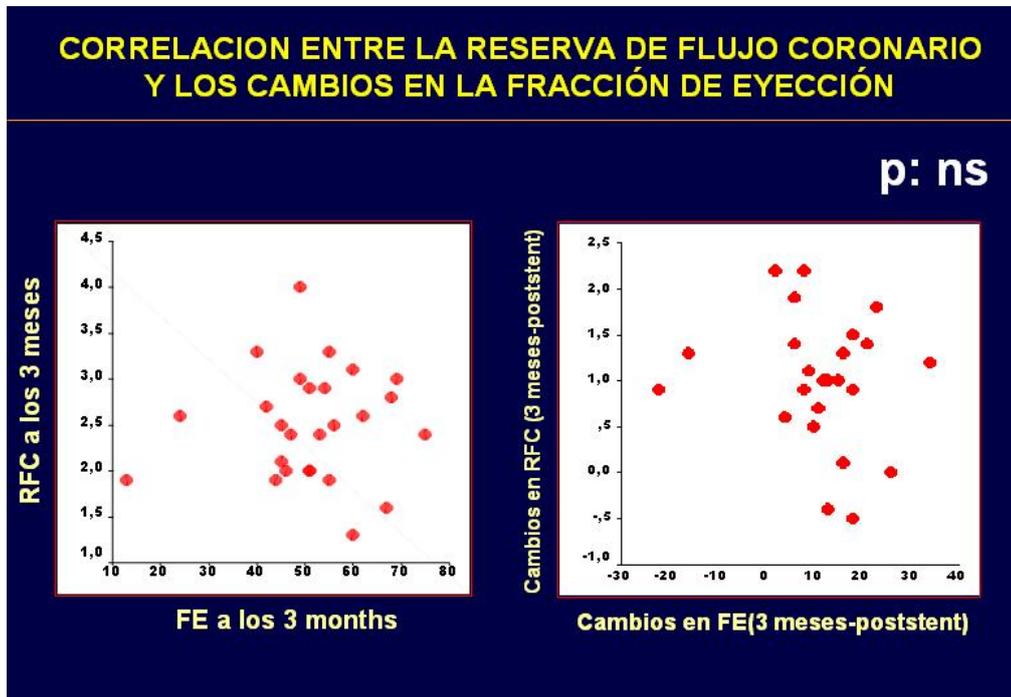


Figura 21. Ausencia de correlación entre la ganancia de FE y de reserva coronaria

### **4.3 Evaluación de la infusión de células madre derivadas de médula ósea en pacientes con cardiopatía isquémica crónica . Estudio observacional**

#### **Hallazgos clínicos, angiográficos y de laboratorio**

En la tabla 12 se resumen los principales hallazgos obtenidos en la evaluación clínica, hemodinámica y angiográfica. Todos los pacientes sobrevivieron al procedimiento y no se detectaron complicaciones derivadas del mismo. Tras la reevaluación angiográfica se produjeron dos fallecimientos, ambos achacados a una progresión de enfermedad coronaria. En uno de los casos se objetivó una reestenosis severa del stent implantado en la DA a los 18 meses y se trató con un stent in stent, pero tras el procedimiento sufrió en la planta de hospitalización un episodio de fibrilación ventricular y parada cardiorrespiratoria. El otro paciente falleció en su domicilio tras haber comenzado dos días antes con angina de esfuerzo 6 meses después de la reevaluación angiográfica. Dos pacientes rechazaron la revisión angiográfica al seguimiento. El número total de células infundidas fue de  $10.6 \pm 4.5 \times 10^8$ , y de ellas,  $26,4 \pm 18 \times 10^6$  fueron CD 34 +. 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). No se objetivaron cambios significativos en el consumo de oxígeno ni en el umbral de anaerobiosis.

**TABLA 12. Hallazgos clínicos, angiográficos y hemodinámicos**

	Basal	6-meses	p
<b>PTDVI (mmHg)</b>	<b>31±110</b>	<b>29±12</b>	<b>NS</b>
<b>CFR</b>	<b>2.4±0.83</b>	<b>2.5±0.9</b>	<b>NS</b>
<b>VTDVIi (ml/m<sup>2</sup>)</b>	<b>227±60</b>	<b>235±69</b>	<b>NS</b>
<b>VTSVIi (ml/m<sup>2</sup>)</b>	<b>165±58</b>	<b>168±62</b>	<b>NS</b>
<b>Fracción de eyección (%) (sinusal)</b>	<b>25±6</b>	<b>32±10</b>	<b>0.02</b>
<b>Fracción de eyección (%) (post-PVC#)</b>	<b>33±8</b>	<b>41±12</b>	<b>0.07</b>
<b>SCA (%) (sinusal)</b>	<b>36±11</b>	<b>32±11</b>	<b>NS</b>
<b>SCA (%) (post-PVC#)</b>	<b>27±14</b>	<b>22±14</b>	<b>NS</b>
<b>% de radios afectos (sinusal)</b>	<b>67±9</b>	<b>48±16</b>	<b>&lt;0.01</b>
<b>% de radios afectos (post-PVC#)</b>	<b>56±11</b>	<b>38±19</b>	<b>0.02</b>
<b>Sumatorio onda Q</b>	<b>27±20</b>	<b>27±17</b>	<b>NS</b>
<b>Consumo de O<sub>2</sub> pico</b>	<b>24,1±10</b>	<b>24,9±5</b>	<b>NS</b>
<b>Umbral de anaerobiosis</b>	<b>18±10</b>	<b>14±3</b>	<b>NS</b>

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

**Volúmenes y función ventricular**

Un paciente deterioró la función ventricular al seguimiento (del 26% pasó al 21%), documentándose reestenosis del stent a la DA que se trató, pero se volvió a reevaluar angiográficamente por recurrencia clínica y se objetivó 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 %. Este incremento de la FE se consiguió a expensas de una disminución de segmentos hipoquinéticos en la pared anterior, tanto en el latido sinusal como el postextrasistólico. La figura 22 muestra los cambios individuales producidos en la FE y la reducción de cuerdas hipoquinéticas, y la figura 23 muestra un paciente con gran mejoría funcional al seguimiento. Se halló una correlación directa entre la ganancia de FE y la disminución de radios afectos en la pared anterior ( $r = 0.76$ ,  $p < 0.01$ ), y una correlación negativa entre la FE al seguimiento y el pico de 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 a la CFR era normal en la condición basal 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 FE basal y distintos indicadores de migración (% de migración basal:  $r = 0.73$ ,  $p < 0.05$ , % de migración a VEGF:  $r = 0.68$ ,  $p < 0.05$ ).

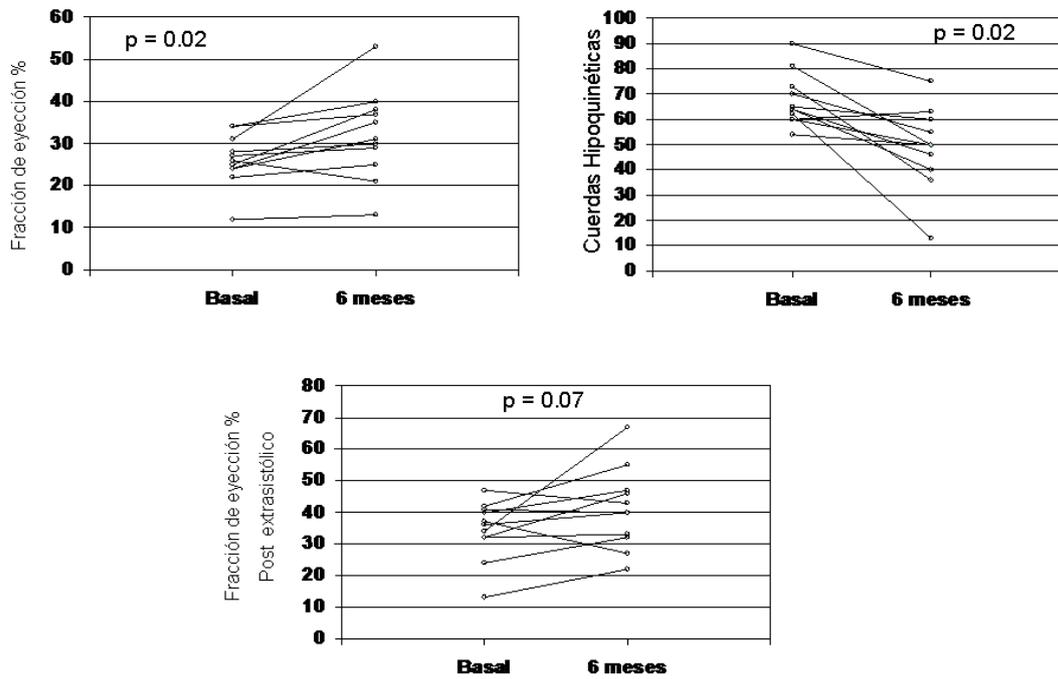


Figura 22. Cambios en la FE y en el número de cuerdas hipoquinéticas

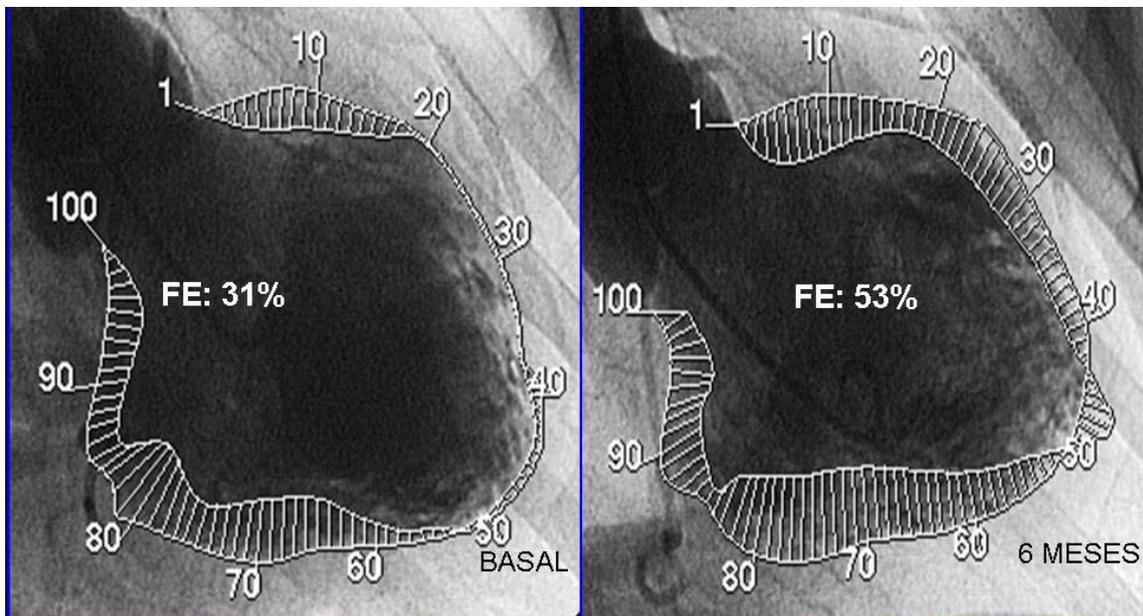


Figura 23. Ventriculografía basal y al seguimiento. A los 6 meses se objetiva un incremento de la FE con una disminución de los segmentos de contracción anormal de la pared anterior

#### 4.4 Evaluación de los cambios electrocardiográficos en pacientes con IAM anterior y tratamiento regenerativo

Los resultados obtenidos quedan resumidos en la tabla 12.

<b>TABLA 12. Hallazgos electrocardiográficos</b>					
	<b>Basal</b>	<b>6 meses</b>	<b>p</b>	<b>1 año</b>	<b>p</b>
<b>FC</b>	<b>68±15</b>	<b>64±16</b>	<b>ns</b>	<b>66±13</b>	<b>NS</b>
<b>ΣQ</b>	<b>35±17</b>	<b>18±13</b>	<b>&lt;0.05</b>	<b>14±13</b>	<b>&lt;0.05</b>
<b>N°Q*</b>	<b>4.5±1.7</b>	<b>2.45±1.6</b>	<b>&lt;0.05</b>	<b>1.84±1.6</b>	<b>&lt;0.05</b>
<b>QTc</b>	<b>360±40</b>	<b>401±24</b>	<b>NS</b>	<b>387±27</b>	<b>NS</b>
<b>QRS mseg</b>	<b>90±22</b>	<b>94±19</b>	<b>NS</b>	<b>88±29</b>	<b>NS</b>
<b>R V6 mm</b>	<b>5,7±2,3</b>	<b>6.3±3</b>	<b>NS</b>	<b>6,6±3</b>	<b>NS</b>

**FC:**frecuencia cardiaca, **ΣQ:**sumatorio de Q, **N°Q:** número de derivaciones con onda Q, **QTc:**QT corregido, **QRSmseg:** duración del QRS, **R V6 mm:** altura de R en V6 en mm

No existieron diferencias en términos de frecuencia cardiaca, eje eléctrico, duración de QRS, QT corregido y amplitud de R en V6. Sin embargo encontramos una reducción significativa y progresiva del Σ de ondas Q (33±16 mm basal, 18±13 mm a los 6 meses y 14 ±14 mm al año; p< 0.001) (figura 24) y del número de derivaciones con onda q (4±1,6 mm al alta, 2,45±1,6 mm a los 6 meses y 1,9±1,6 mm al año). El Σ de ondas Q después de un año se correlacionó de forma inversa con la ganancia en la FE (r= -0.67; p< 0.001) (figura 25).



Figura 24: cambios electrocardiográficos al alta y a los 6 meses, objetivándose una reducción en el número de derivaciones con onda Q en el sumatorio de Q

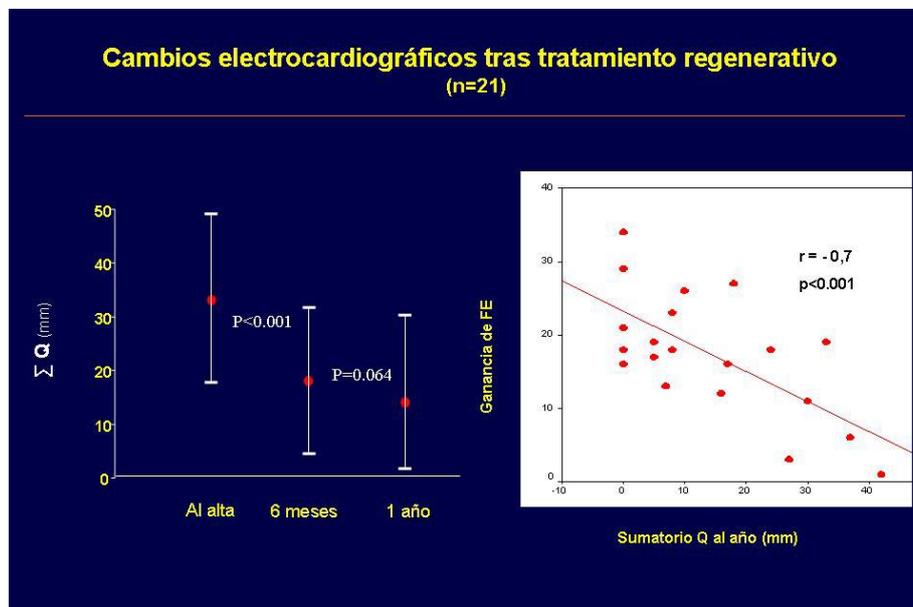


Figura 25: la gráfica muestra la progresiva reducción del sumatorio de Q y su correlación inversa con la ganancia en la FE.

## **5. DISCUSIÓN**

## 5.1 Estudio observacional con G-CSF en pacientes con IAM.

En el primer estudio se demuestra la factibilidad y la seguridad de la movilización de células madre en pacientes con IAM, y se sugiere que el tratamiento con G-CSF podría llegar a influir en la recuperación funcional. El concepto de regeneración miocárdica tras el IAM mediante movilización de células madre fue demostrado por Orlic et al<sup>98,151</sup> en un modelo experimental en ratas. De igual forma, también se ha demostrado en primates que la movilización celular mediante factores hematopoyéticos de crecimiento promueve la angiogénesis del miocardio infartado<sup>158</sup>. No obstante, no se detectó una reparación miocárdica en este modelo experimental, quizá debido a que la reperfusión no fue considerada mandatoria. La naturaleza y el número de células movilizadas también pueden variar entre las especies de mamíferos. Estos hallazgos en modelos animales han generado expectativas sobre una posible aplicación clínica y en la actualidad hay un interés creciente, pese a la escasa información disponible, por la factibilidad, seguridad y eficacia de la movilización de células madre con G-CSF en los pacientes con IAM. Las estrategias, los tiempos, la dosificación y la duración del tratamiento con G-CSF tras el IAM son empíricas y pueden variar según el diseño del estudio. En un artículo, Kang et al<sup>139</sup> estudiaron en 10 pacientes los efectos de la infusión intracoronaria de células madre movilizadas y recogidas mediante aféresis, al mismo tiempo que se practicaba revascularización con stent. En el seguimiento se observó un cambio favorable en términos de función ventricular, pese a una influencia negativa en la incidencia de reestenosis de la lesión causante. Los autores

sugirieron que esta alta incidencia podría estar condicionada por una diferenciación de células progenitoras en células musculares lisas dentro del segmento arterial tratado. Si este hallazgo adverso es atribuible a la movilización de las células madre, podría limitar la eficacia de este tipo de tratamiento y crear nuevas e inesperadas consideraciones al respecto. No obstante, en nuestros pacientes no hemos observado reestenosis. En nuestro estudio de factibilidad en pacientes con IAM anterior, la reperfusión precoz y la revascularización con stent fueron siempre obtenidas como premisa de selección, aunque en 2 de ellos fue preciso realizar un procedimiento de rescate. Así, la implantación del stent en la lesión causante fue efectuada antes del inicio del tratamiento con G-CSF. Considerando que el tratamiento de 10 días, a razón de 10 µg/día de G-CSF, empezaba el quinto día tras el IAM y que el pico de concentración de las células progenitoras movilizadas fue observado al quinto día de tratamiento con el factor, las células madre circulantes podrían tener menor probabilidad de diferenciarse en células musculares lisas dentro del segmento arterial tratado, sobre todo si tenemos en cuenta que las máximas concentraciones en la sangre periférica no coincidían en el tiempo con el implante del stent. Esta diferencia en el tiempo, junto con el uso de los stents liberadores de rapamicina en nuestros pacientes, podría explicar la ausencia de reestenosis en nuestro estudio. No obstante, el seguimiento angiográfico de nuestros pacientes fue realizado a los 3 meses, de manera que siguen bajo una estrecha vigilancia clínica ante la posibilidad de una isquemia residual tardía de la pared anterior. Otro punto de interés es la dosis y la duración ideal del tratamiento con G-CSF. Hemos optado por un período de 10 días empezando el quinto día tras el IAM. Con ello intentamos separar en el tiempo las concentraciones máximas de células progenitoras movilizadas de la fase aguda del infarto.

Esto podría, en teoría, favorecer el anidamiento miocárdico y la diferenciación. Adicionalmente, las células movilizadas no se han utilizado para colectarlas e infundirlas de forma intracoronaria, sino que la movilización masiva y mantenida de las células madre fue inducida con la expectativa de anidación miocárdica en respuesta a las citoquinas quimiotácticas<sup>98,151,159</sup>. La dosis seleccionada de G-CSF está universalmente aceptada para la movilización<sup>160-161</sup> y es la utilizada en nuestro centro en donantes sanos. Las determinaciones de laboratorio seriadas confirmaron una movilización celular persistente hasta el décimo día del inicio de tratamiento con G-CSF, lo que son 15 días tras el IAM. De esta manera, una cantidad considerable de células inmaduras (CD38-, HLA-DR-, CD90+) circulan en la sangre periférica 10 días tras el IAM, brindando una posibilidad para el anidamiento en el miocardio infartado. Adicionalmente, el G-CSF también podría estimular las células madre residentes para su diferenciación y división. Hemos tenido una complicación inesperada en un paciente que presentó una rotura esplénica espontánea al octavo día del tratamiento con G-CSF. La causa fue una esplenitis aguda y una hemorragia subcapsular. Los leucocitos movilizados podrían ser parcialmente capturados por el bazo<sup>162-164</sup> pero la rotura espontánea, aunque descrita en la bibliografía<sup>165-167</sup>, es extremadamente rara como complicación en el tratamiento con G-CSF en pacientes hematológicos o en donantes sanos. Nuestro paciente fue operado con éxito y presentó una mejoría funcional significativa en el seguimiento (ganancia en FE del 13%). La posibilidad de una esplenitis aguda inducida por la masiva movilización celular debe vigilarse con cautela, considerando sobre todo que la hemorragia subcapsular podría estar favorecida por el necesario régimen antitrombótico para prevenir la oclusión subaguda del stent en estos pacientes. Finalmente, el estudio de los efectos de estas

estrategias en la regeneración miocárdica continúa siendo una dificultad para la investigación clínica. Considerando que la reperfusión precoz y la revascularización con stent son necesarias para asegurar el flujo adecuado en el territorio infartado, resulta difícil diferenciar los cambios en la función ventricular izquierda debidos al salvamento del miocardio en riesgo de los que son fruto de una regeneración miocárdica con éxito, sobre todo si consideramos que el grado de movilización de células madre puede variar entre los pacientes y que no siempre es igualmente eficaz. También se puede producir un empeoramiento de la función ventricular izquierda global en un pequeño porcentaje de casos<sup>18</sup> (el 15% en nuestra experiencia). Las razones para explicar este empeoramiento son desconocidas y parecen multifactoriales, incluyendo la lesión posreperfusión y la posibilidad de microinfartos celulares<sup>168</sup>. Se precisan estudios aleatorizados para discernir claramente estos efectos, los de la reperfusión y los de la regeneración miocárdica. Mientras tanto, nuestros hallazgos sugieren que la recuperación funcional de la pared anterior infartada podría estar favorecida por una alta concentración máxima de células inmaduras movilizadas en el quinto día de tratamiento con GCSF. Algún grado de recuperación eléctrica, como el observado en el  $\Sigma Q$  del electrocardiograma de superficie, podría traducir algún grado de electrogénesis en la pared anterior infartada. Nuestro estudio angiográfico seriado de la función ventricular izquierda demuestra mejoras significativas de los parámetros de la función ventricular global y de la movilidad parietal regional, observados no sólo en los latidos sinusales, sino también en los latidos postextrasistólicos. Esto podría sugerir que la mejora en la potenciación postextrasistólica de la pared anterior infartada se traduce en una preservación de la reserva

contráctil<sup>40,154</sup>. No obstante, este beneficio funcional podría estar limitado en los pacientes con infartos más extensos.

## **5.2 Estudio comparativo entre la infusión intracoronaria de células madre y la movilización masiva de células madre con G-CSF en pacientes con IAM**

Una vez evaluada la factibilidad y seguridad del tratamiento con factor era necesario saber cuánto del beneficio funcional era debido a la terapia de reperfusión y cuánto se podía atribuir al tratamiento regenerativo. Para ello diseñamos un estudio aleatorizado en el que comparamos 2 tratamientos regenerativos (infusión de células mononucleares derivadas de la médula ósea o tratamiento con G-CSF) con el tratamiento de reperfusión (grupo control). Analicemos cada uno de los grupos:

### **Terapia de reperfusión**

Las modernas estrategias de reperfusión consiguen una recuperación funcional en una proporción significativa de pacientes que sufren un IAM, lo que ha sido asociado a una mejora de la supervivencia. Sin embargo, esto no siempre ocurre así y otra proporción de pacientes no recupera función o incluso la empeora, a pesar de una reperfusión y revascularización precoz. Los factores que influyen en tales evoluciones diferentes tras terapias de reperfusión en el IAM han sido ampliamente estudiados<sup>40,169-172</sup>. El tiempo de la reperfusión junto a una adecuada recuperación del flujo coronario son de importancia capital. La determinación de un nivel bajo de CK pico, un parámetro que estima la extensión de la necrosis, también ha sido identificado como un potente predictor independiente de una

subsecuente recuperación funcional. Por tanto, diferentes factores y condiciones pueden influir en el grado de recuperación funcional tras un IAM en cada paciente. La valoración de la recuperación funcional también precisa una consideración aparte. La mejora de la motilidad regional en la zona infartada no es inmediata y sigue un curso que puede variar en la fase inicial. Inmediatamente tras la reperfusión puede incluso observarse un ligero empeoramiento de la función global, que parece asociarse a una reducción de la hiperquinesia compensadora en las zonas no infartadas<sup>40,173</sup>. Se ha considerado que el tiempo ideal para valorar el estatus funcional final tras el daño miocardio del IAM es a partir de los 3 días del mismo<sup>170</sup>. En un estudio multicéntrico, se observó que la mayor parte de las mejorías funcionales ocurrieron alrededor del día 14 tras el IAM<sup>172</sup>. A los 90 días, se observó una recuperación completa en el 22% de los pacientes y casi la mitad de los pacientes mostraron una mejoría mayor del 5% en la fracción de eyección, mientras que el 16% de los pacientes estudiados mostró un empeoramiento de la fracción de eyección mayor del 5%. Por tanto, actualmente sabemos que la reperfusión precoz y la revascularización en el IAM, combinado con estrategias farmacológicas modernas, consiguen un amplio espectro de recuperación funcional que oscila entre un claro empeoramiento y una recuperación completa. Este dato debe ser tenido en cuenta a la hora de evaluar el posible beneficio de una nueva terapia coadyuvante para el IAM en estudios clínicos.

### **Movilización con G-CSF**

La movilización de células madre mediante la administración de G-CSF ha sido otro tipo de terapia que ha causado expectación en los últimos tiempos. Sin embargo, los efectos

beneficiosos de la movilización de células madre inducidas por el G-CSF han sido también cuestionada. Diferentes estudios clínicos han evaluado la seguridad y factibilidad del G-CSF recombinado en pacientes con IAM<sup>139,140,174</sup>. Aunque como comentamos previamente un estudio clínico observó un aumento de la frecuencia de reestenosis coronaria intrastent<sup>133</sup> la mayor parte de los estudios clínicos sugieren que la administración de G-CSF puede proporcionar beneficios de recuperación funcional y no muestra influencia sobre la posible reestenosis coronaria. Recientemente, Zohlhofer et al<sup>135</sup> han demostrado que la movilización de células madre mediante G-CSF en pacientes con IAM y reperfusión mecánica con éxito, no tiene influencia sobre el tamaño del infarto, la función ventricular o la reestenosis coronaria. Los resultados de nuestro estudio confirman esta línea de evidencia, mostrando de nuevo que los pacientes que reciben G-CSF y revascularización con stent no difieren del grupo control. Sin embargo, aún persisten muchas cuestiones sobre el papel de la citoquinas como tratamiento del IAM. Existen respuestas individuales en relación al número de progenitores circulantes tras la administración de G-CSF que pueden variar ampliamente entre pacientes. En el estudio observacional previamente detallado, hemos observado una correlación directa y significativa entre los niveles circulantes de progenitores movilizados obtenidos en el día 5 tras el comienzo del tratamiento con G-CSF y la ganancia en fracción de eyección al seguimiento, lo que parece sugerir una mayor recuperación funcional cuando existen niveles altos de progenitores circulantes (22). Actualmente, parece que el tratamiento con G-CSF en infartos revascularizados proporciona un amplio grado de recuperación funcional, pero este no difiere del observado en grupos control. Diferentes razones podrían explicar por qué el tratamiento con G-CSF fracasaría en promover una regeneración

miocárdica significativa. Una explicación biológica podría basarse en la pérdida de propiedades de las células progenitoras movilizadas. La exposición de células madre a citoquinas como el G-CSF, han demostrado inducir cambios en la expresión de moléculas de adhesión, tanto en vivo con propósitos de movilización, como in vitro en la expansión de cultivos<sup>175</sup>. La pérdida de propiedades adhesivas en células circulantes podría dificultar su potencial anidamiento en el miocardio infartado.

### **Infusión intracoronaria de células de la médula ósea**

Diferentes estudios en humanos han demostrado que la inyección intracoronaria de células madre derivadas de médula ósea autóloga puede tener un efecto beneficioso en el remodelado ventricular post-infarto. Además, se han observado mejorías significativas en la función ventricular que oscilan en una mejora de la fracción de eyección entre el 2% y el 9%<sup>130-138</sup>. El mecanismo biológico que explica tales efectos beneficiosos aún resulta desconocido. Los resultados de este estudio muestran claramente que los pacientes que recibieron terapia coadyuvante con la infusión intracoronaria de células de la médula ósea tuvieron una importante mejoría en la función ventricular (ganancia neta del 20% en FE) que fue significativamente diferente de una mejora media del 4% y del 6% en los pacientes del grupo II y III, respectivamente. Además, los pacientes que recibieron infusión intracoronaria de células mostraron al seguimiento un aumento significativo en la máxima capacidad contráctil (FE post-extrasistólica), lo cuál no fue observado en los pacientes de los grupos II y III. La potenciación post-extrasistólica proporciona un estímulo efectivo para detectar la reserva contráctil en pacientes con disfunción miocárdica isquémica. El análisis de esta

capacidad podría ayudar a discriminar entre la recuperación funcional observada en ciertos pacientes con IAM revascularizado de aquella recuperación adicional proporcionada por un tratamiento regenerativo efectivo. La detección de una respuesta similar o peor en reserva contráctil al seguimiento puede representar la no viabilidad del tejido necrosado. Sin embargo, mejoras en la reserva contráctil al seguimiento representan un beneficio adicional.

La ganancia neta media del 20% en FE observada en nuestros pacientes del grupo I contrasta con los valores menores observados en otros estudios<sup>130-138</sup>, en los que se efectuó de forma similar infusión intracoronaria de células en pacientes con IAM (Tabla 13).

**TABLA 13. Número de células infundidas y recuperación funcional en estudios previos**

Referencia	#células infundidas (x10 <sup>8</sup> )	# células CD34+ infundidas (x10 <sup>6</sup> )	FE basal* (%)	Ganancia en FE* (%)
Strauer et al <sup>130</sup>	0.28	0.59±0.78	51±14	2
Asmus et al <sup>136</sup>	---	7.35±7.3	52±9	8
Fernández A. et al <sup>132</sup>	0.78±0.41	-	51±7	6
Schächinger et al <sup>131</sup>	2.13±0.75	2.6±2.5	50±10	8
Wollert et al <sup>133</sup>	24.6±9.4	9.5±6.3	50±10	7
Janssens et al <sup>137</sup>	1.72±0.72	2.8±1.7	49±7	3
Lunde et al <sup>138</sup>	0.68†	0.7†	42±11	8
Schächinger et al <sup>135</sup>	2.36±1.74	3.6±3.6**	48±9	5.5
Nuestro estudio	9±3	17±13	37±5	20

FE\*: fracción de eyección; \*\*: CD34+CD133+CD45+.

Varias razones podrían explicar estas diferencias. Por un lado, el número total de células CD34+ infundidas directamente en nuestro estudio es de 2 a 5 veces mayor que el publicado previamente. Una mayor concentración de progenitores infundidos localmente en el miocardio infartado podría jugar un papel en proporcionar mejores respuestas funcionales al seguimiento. En estudios experimentales con ratas, Schuster et al<sup>176</sup> observó que un aumento del número de angioblastos traficando en la zona infartada resultó en una neovascularización dosis-dependiente, con desarrollo de capilares progresivamente mayores de tamaño. Hoffmann et al<sup>177</sup> han monitorizado recientemente 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. Recientemente se han comparado los protocolos de 2 estudios<sup>178</sup> con diseños similares y resultados dispares (el estudio ASTAMI<sup>138</sup> en el que no se evidenció una mejoría significativa de la FE en el grupo al que se le administró células, frente al REPAIR-AMI<sup>135</sup>, en el que se objetivó un incremento de la FE en el grupo con terapia celular). Esta publicación muestra que con el protocolo usado en el REPAIR-AMI se obtenía mayor número de células madre a pesar de tener el mismo volumen de aspirado medular, y además estas células tenían mayor capacidad

migratoria y mayor capacidad de neovascularización en un modelo in Vitro. Nuestro protocolo es similar al usado en el REPAIR-AMI<sup>135</sup>, con la diferencia de que las células se infunden inmediatamente y no se conservan durante la noche. Por otro lado, en la mayor parte de estudios que evalúan los cambios en función ventricular en el IAM tras terapia celular presentan una FE basal que se acerca a valores normales (media 50%). En pacientes con infartos pequeños y, consecuentemente fracción de eyección casi normal, el beneficio funcional de un tratamiento dado puede resultar más difícil de evaluar si no se investiga la reserva contráctil. El estudio comparativo de infartos grandes con pobre función ventricular puede detectar mejor el grado de recuperación funcional. El estudio REPAIR-AMI<sup>135</sup> ha mostrado también mejores respuestas funcionales en pacientes con IAM y pobre función ventricular.

La principal limitación de nuestro estudio es el pequeño número de pacientes estudiados, pero el estudio posee un poder estadístico suficiente para detectar un 14% de diferencia en ganancia de fracción de eyección entre los grupos (poder=91.6%). La estricta selección de pacientes fue diseñada para analizar infartos extensos localizados en el mismo territorio e irrigados por la misma arteria. El estudio de un modelo uniforme de IAM puede limitar el número de observaciones pero podría también mejorar la exactitud de la observación. Por otro lado, el pequeño tamaño de la muestra no garantiza la eficacia de la randomización ni la distribución homogénea entre grupos de los parámetros basales que podrían también influir en cambios en la función ventricular, a pesar de no mostrar diferencias significativas

### **5.3 Evaluación de la infusión de células madre derivadas de médula ósea en pacientes con cardiopatía isquémica crónica . Estudio observacional**

La mejora de la función ventricular en pacientes con infarto agudo de miocardio tras administración intracoronaria de células madre derivadas de la médula ósea ha sido demostrada, tanto en nuestro estudio como los publicados en la literatura. Estos resultados obtenidos invitan a pensar que este tratamiento regenerativo, podría ser beneficioso en pacientes con infartos crónicos, por lo que diseñamos un estudio para evaluar los efectos de esta terapia en pacientes con un modelo de infarto similar al de nuestros estudios previos (infarto anterior revascularizado y función ventricular deprimida) pero con más de un mes de evolución (tiempo medio desde el infarto hasta el tratamiento con células de 29 meses).

La ganancia neta en la FE al seguimiento fue del 7%, observándose a los tres meses una disminución de los segmentos de contracción anormal en la pared anterior. También se incrementó la reserva contráctil al seguimiento, con una ganancia de la FE en el latido postextrasistólico del 8,4%. Estos resultados son prometedores, y sugieren que el estancamiento de células madre en la región infartada podría provocar un anidamiento de las células a dicho nivel e inducir mecanismos regenerativos. Sin embargo, el beneficio funcional obtenido es menor que el conseguido con pacientes agudos, y no se consigue un remodelado favorable, ya que los volúmenes ventriculares no disminuyen en el seguimiento. Esto se podría explicar por una serie de factores que exponemos a continuación.

La peculiaridad de los pacientes crónicos de nuestro estudio radica en que el infarto se ha consumado, y persisten con disfunción ventricular a pesar de la revascularización, por lo que la esperanza de una mejoría funcional es muy baja. Además, en esta situación no se produce la “llamada de socorro” que ocurre en la isquemia aguda, en la que se podría conseguir a través de la quimiotaxis y de efectos parácrinos estimular tanto a las células madre residentes como a las de la médula ósea. El SDF-1 es un potentísimo factor quimiotáctico que atrae a las células madre circulantes al unirse al receptor CXCR4 que éstas expresan en su membrana. Es posible que las concentraciones de SDF-1 en este escenario sean menores a las que existen en la fase aguda del infarto, y esto condicione una menor capacidad migratoria de las células al tejido dañado, determinando un menor grado de regeneración. Por otro lado, estudios previos sugieren que los pacientes con cardiopatía isquémica crónica tienen afectación medular<sup>179</sup>, ya que las células madre tienen menor capacidad migratoria que las derivadas de una médula ósea sana. De hecho, se especula que un daño medular, podría desencadenar o acelerar el desarrollo de enfermedad coronaria en un individuo, ya que la capacidad de “reparación cardíaca” por parte de la médula ósea está mermada. Los hallazgos obtenidos en nuestro laboratorio van en concordancia con esta teoría, y podrían explicar un efecto regenerativo menos potente. No obstante, en el estudio realizado in vitro sobre las células infundidas, vimos que existía una correlación positiva entre la reserva contráctil y distintos indicadores de migración (el porcentaje de migración basal, el porcentaje de migración a VEGF, y el porcentaje de migración específica a VEGF). Por tanto, en este sustrato de pacientes, aquellos con mayor reserva contráctil, conservan mayor capacidad de migración, y por ende mayor capacidad regenerativa.

Por otro lado, se trata de infartos muy extensos, con gran componente cicatricial, lo que determina que la función ventricular basal esté severamente deprimida (FE:  $25\% \pm 6$ ). La CK media de este grupo de pacientes fue la más alta de todos los estudios presentados (tabla 14), y tuvo una correlación negativa con la FE a los 6 meses, al igual que en el estudio realizado en agudos, en el que también los infartos con CK más alta eran los que menos mejoría funcional tenían. Por tanto, el gran tamaño de los infartos podría explicar una menor ganancia funcional.

**TABLA 14. Tamaño del infarto en los diferentes estudios**

	<b>Células crónicas (13)</b>	<b>G-CSF agudos (13)</b>	<b>Células agudos comparativo(10)</b>	<b>G-CSF agudos comparativo(10)</b>	<b>Control agudos (10)</b>
<b>CK pico</b>	<b>6134±4080</b>	<b>3950±3110</b>	<b>4155±1573</b>	<b>4936±3091</b>	<b>3063±1672</b>
<b>CK pico Mb</b>	<b>827±630</b>	<b>486±470</b>	<b>464±264</b>	<b>579±472</b>	<b>248±197</b>
<b>FE</b>	<b>25±6</b>	<b>40±7</b>	<b>37±6</b>	<b>39±5</b>	<b>38±6</b>

CK: creatin quinasa, FE: Fracción de eyección

Además hay que tener en cuenta que la disfunción ventricular es un predictor independiente de efectos adversos al seguimiento, lo que supone otro handicap a tener en cuenta; de hecho, en este estudio se documentó una reestenosis severa en un paciente que

fallecería posteriormente y en otro paciente se documentó oclusión del stent, lo que determinó un empeoramiento funcional y tuvo que entrar en lista de trasplante. En cuanto a la CFR, a diferencia de lo que ocurre en los infartos agudos, no existe compromiso de la microcirculación, y por tanto los valores basales son normales, y no se modifican al seguimiento.

La mayor limitación del estudio es que la muestra es pequeña, por lo que los resultados obtenidos se han de analizar con cautela. No obstante, estudios como los de Strauer et al<sup>143</sup> invitan al optimismo, ya que consiguen en pacientes crónicos una reducción del área del infarto y un incremento de la FE del 15%.

## 5.4 Evaluación de los cambios electrocardiográficos en pacientes con tratamiento regenerativo

Los ensayos clínicos más importantes en los que se ha evidenciado una mejoría funcional con tratamiento regenerativo con células madre autólogas obtenidas de médula ósea han sido enumerados a lo largo de los distintos estudios presentados. Sin embargo poco se ha descrito a cerca de los cambios electrocardiográficos observados en este grupo de pacientes. La mayoría de las observaciones han ido encaminadas a descartar trastornos del ritmo, que si bien han sido descritos en el tratamiento con mioblastos<sup>180</sup>, no han sido documentados cuando las células empleadas han sido células madre derivadas de la médula ósea. Nosotros estudiamos los electrocardiogramas basales y al seguimiento de 21 pacientes con IAM anterior extenso que recibieron tratamiento regenerativo con células mononucleares derivadas de la médula osea.

La disminución del número de derivaciones con ondas Q y del sumatorio de Q hace pensar que el tratamiento regenerativo se acompaña de una electrogénesis, y que ésta se correlaciona con el grado de ganancia funcional. Además se puede deducir que la regeneración es global, y que la miogénesis, se acompaña de angiogénesis y electrogénesis ordenada (no arritmias documentadas).

## **5.5 Nuevas perspectivas**

Por tanto, una vez analizados los 4 estudios y evaluado las distintas terapias regenerativas, parece que la infusión intracoronaria de células madre es superior al factor, y este beneficio ha sido testado tanto en la fase aguda del infarto como en la cardiopatía isquémica crónica. Sin embargo los escenarios en los que se está aplicando la terapia regenerativa aumentan. Actualmente están en desarrollo estudios en pacientes con miocardiopatía dilatada a los que se les está aplicando esta terapia. Los buenos resultados obtenidos en nuestro estudio nos invitaron a utilizar la terapia con células madre en un caso excepcional que les muestro a continuación con resultados sorprendentes.

Se trata 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 da la cara 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 cardíaca, 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 25). 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 25).

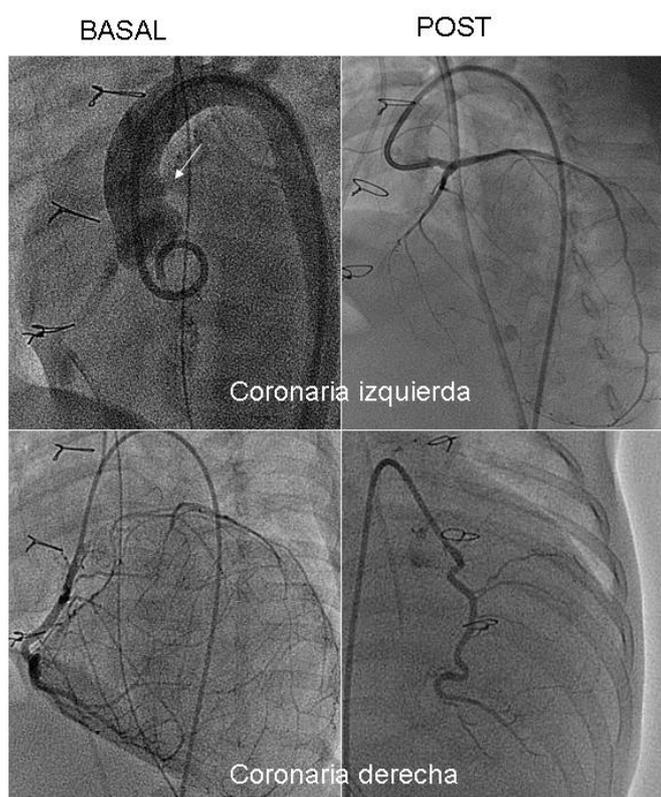


Figura 25. Coronariografía pre y post

Se inició entonces un régimen antitrombótico con aspirina ticlopidina y fragmin ajustado al peso del lactante. 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 ST-T (Figura 26). Sin embargo a los 15 días 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 5 días después, comenzando con un episodio de insuficiencia cardiaca aguda que precisó intubación orotraqueal, elevación del ST-T en precordiales y elevación de marcadores de necrosis miocárdica. Se realizó un nuevo cateterismo el el que se decidió optimizar el stent del tronco con un balón de 3 mm de diámetro, reintroduciéndose entonces la heparina.

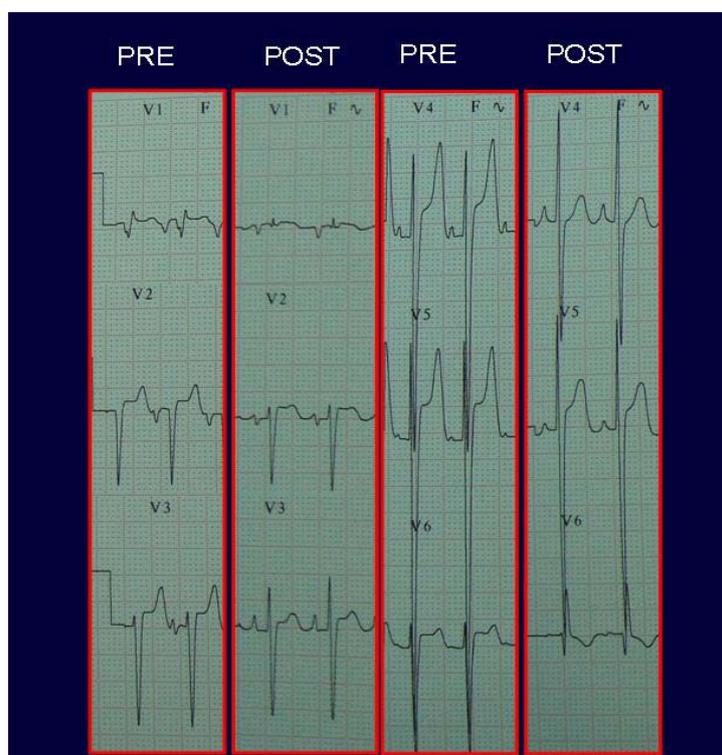


Figura 26: cambios producidos en el ECG tras recuperar la coronaria izquierda

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 27).



**Figura 27.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 la potencia de la terapia regenerativa y nos muestra un horizonte esperanzador, en el que es posible que el abanico de enfermedades cardiovasculares que podrían beneficiarse de esta terapia aumenten en los próximos años.

## **6. CONCLUSIONES**

1- La movilización de células madre con G-CSF es un tratamiento factible para intentar la regeneración miocárdica en pacientes con IAM anterior revascularizado percutáneamente aunque la posibilidad de producirse una esplenitis aguda inducida por la movilización celular masiva en el contexto de un regimen antiagregante y anticoagulante debe tenerse en cuenta.

2- El número total de células inmaduras movilizadas al quinto día de tratamiento (CD 34+ CD 38 -) se correlacionó de forma directa con la ganancia en la FE. Por el contrario dicha ganancia fue inversamente proporcional al valor máximo de de la CK-MB, lo que sugiere que un tamaño mayor del infarto ejerce una influencia adversa en el grado de recuperabilidad funcional.

3- La inyección intracoronaria de células madre derivadas de la médula ósea en pacientes con IAM anterior y función ventricular deprimida promueve una mejora funcional de la zona infartada (ganancia de FE del 20% y reducción significativa de los volúmenes ventriculares) a corto plazo, siendo significativamente mayor que la obtenida en el grupo de tratamiento con factor y en el grupo control.

4- 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 y a que los pacientes seleccionados tenían un infarto extenso, a diferencia de la mayoría de los estudios, en los que los pacientes seleccionados tenían infartos

pequeños y una función ventricular preservada, siendo en estos casos difícil de evaluar el beneficio funcional de un tratamiento regenerativo

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

**6-** La movilización de células madre con G-CSF en estos pacientes no tuvo una influencia significativa en el grado de recuperación funcional, siendo similar a la obtenida en el grupo control.

**7-** El tratamiento regenerativo con células madre derivadas de la médula ósea en pacientes crónicos es factible y seguro. En nuestro estudio se produjo una ganancia funcional media del 7%.

**8-** Podemos observar una mejoría eléctrica progresiva en pacientes con IAM anterior revascularizados percutáneamente y posterior infusión de células madre derivadas de médula ósea, y una correlación inversa entre el  $\Sigma Q$  al año y la mejoría de la función.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

- <sup>1</sup> Braunwald E. Evolution of the management of acute myocardial infarction: a 20th century saga. *Lancet* 1998;352:1771-4.
- <sup>2</sup> Heberden W. Some account of a disorder of the breast. *Med Trans Coll Physicians London* 1772;2:59-67.
- <sup>3</sup> Weigert C. Ueber die pathologische Gerinnungs-Vorgänge. *Arch Path Anat (Virchow)* 1880;79:87-123.
- <sup>4</sup> James B. Herrick Clinical features of sudden obstruction of the coronary arteries. *JAMA* 1912;59:2015.
- <sup>5</sup> Parkinson J, Bedford E. Cardiac infarction and coronary thrombosis. *Lancet* 1928;1:4-11.
- <sup>6</sup> Craven LL. Acetylsalicylic acid: possible preventive of coronary thrombosis. *Ann West Med Surg* 1950;4:95-9.
- <sup>7</sup> Craven LL. Experiences with aspirin (Acetylsalicylic acid) in the nonspecific prophylaxis of coronary thrombosis. *MissValley Med J* 1953;75:38-44.
- <sup>8</sup> Craven LL. Prevention of coronary and cerebral thrombosis. *Miss Valley Med J* 1956;78:213-5.
- <sup>9</sup> Julian DG. Treatment of cardiac arrest in acute myocardial ischemia and infarction. *Lancet* 1961; ii: 840-44.
- <sup>10</sup> Armstrong PW, Baigrie RS, Dalyh PA. Natural history of acute coronary attack community study . *Br Heart J.* 1972.; 34:67-80.
- <sup>11</sup> Day H. An intensive coronary care area. *Dis Chest* 1963; 44: 423-27.
- <sup>12</sup> Lown B, Klein M, Herschburg P. Coronary and pre-coronary care.. *Am J Med.* 1969; 46:705-712.
- <sup>13</sup> BEECIM. Balance Epidemiológico Español contra el Infarto de Miocardio. Informe General. Edit Egraf, S.A. Madrid.
- <sup>14</sup> Swan HJC, Ganz W, Forrester J, et al. Catheterization of the heart in man with use of a flow-directed balloon-tipped catheter. *N Engl J Med* 1970; 283: 447-51.

- 15 Forrester J, Diamond G, Chatterjee K, et al. Medical therapy of acute myocardial infarction by application of hemodynamic subsets (first of two parts). *N Engl J Med* 1976; 295:1356–1362.
- 16 Forrester J, Diamond G, Swan H. Correlative classification of clinical and hemodynamic function after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1977; 39:137–145.
- 17 Pantridge JF, Geddes JS. A mobile coronary care unit in the management of myocardial infarction. *Lancet* 1967; i: 271–73.
- 18 Grace WJ, Chadbourn JA The mobile coronary care unit.. *Chest*. 1969; 55: 452-455.
- 19 Crampton RS, Aldrich RF, Gascho JA, Miles JR Jr, Stillerman R..Reduction of prehospital ambulance and community death rate by the community-wide emergency cardiac care system. *Am J Med*. 1975; 58: 151-165.
- 20 Tillett WS, Garner RL. The fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. *J Exp Med* 1933;58:485-502.
- 21 Tillett WS, Sherry S. The effect in patients of streptococcal fibrinolysin (streptokinase) and streptococcal desoxyribonuclease on fibrinous, purulent, and sanguinous pleural exudations. *J Clin Invest* 1949;28:173-90.
- 22 Sherry S, Tillett WS, Read CT. The use of streptokinase-streptodornase in the treatment of hemothorax. *J Thorac Surg* 1950;20:393-417.
- 23 Cathie IA. Streptomycin-streptokinase treatment of tuberculous meningitis. *Lancet* 1949;1:441.
- 24 Johnson AJ, Tillett WS. The lysis in rabbits of intravascular blood clots by the streptococcal fibrinolytic system (streptokinase). *J Exp Med* 1952;95:449-64. 45.
- 25 Fletcher AP, Alkjaersig N, Smyrniotis FE, Sherry S. The treatment of patients suffering from early myocardial infarction with massive and prolonged streptokinase therapy. *Trans Assoc Am Physicians* 1958;71:287-96.
- 26 Rueggsegger P, Nydick I, Hutter RC, Freiman AH, Bang NU, Clifton EE, Ladue JS. Fibrinolytic (plasmin) therapy of experimental coronary thrombi with alteration of the evolution of myocardial infarction. *Circulation* 1959;19:7-13.

- 27 Boucek RJ, Murphy WP Jr. Segmental perfusion of the coronary arteries with fibrinolysin in man following a myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1960;6:525-33.
- 28 Dewar HA, Stephenson P, Horler AR, Cassells-Smith AJ, Ellis PA. Fibrinolytic therapy of coronary thrombosis. Controlled trial of 75 cases. *Br Med J* 1963;1:915-20.
- 29 Schmutzler R, Heckner F, Kortge P, van der Loo J, Pezold A, Poliwoda H, et al. Thrombolytic therapy of recent myocardial infarction. I. Introduction, plan of trial, general clinical results. *Ger Med Mon* 1966;11:308-14.
- 30 Poliwoda H, Gillmann H, Gebauer D, Kortge P, Schmutzler R, van der Loo J, et al. The thrombolytic therapy of acute myocardial infarction. VI. World Congress of Cardiology Abstracts; 1970. p. 251.
- 31 Amery A, Roeber G, Vermeulen HJ, Verstraete M. Singleblind randomised multicentre trial comparing heparin and streptokinase treatment in recent myocardial infarction. *Acta Med Scand Suppl* 1969;505:1-35.
- 32 Wessler S, Sherman LA. Antiplatelet aggregant agents and thrombolytic compounds in myocardial infarction: current status. *Circulation* 1972;45:911-8.
- 33 Dioguardi N, Lotto A, Levi GF, Rota M, Proto C, Mannucci PM, et al. Controlled trial of streptokinase and heparin in acute myocardial infarction. *Lancet* 1971;2:891-5.
- 34 Australian multicentre trial of streptokinase in acute myocardial infarction. *Med J Aust* 1977;1:553.
- 35 Streptokinase in acute myocardial infarction. European Cooperative Study Group for Streptokinase Treatment in Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 1979;301:797-802.
- 36 Rentrop KP, Blanke H, Karsch KR, Wiegand V, Kostering H, Oster H, Leitz K. Acute myocardial infarction: intracoronary application of nitroglycerin and streptokinase. *Clin Cardiol* 1979;2:354-63.
- 37 Chazov EI, Matveeva LS, Mazaev AV, et al. Intracoronary administration of fibrinolysin in acute myocardial infarction. *Terapeuticheskii Arkhiv* 1976; 48: 8-19.

- <sup>38</sup> Dewood MA, Spores J, Notske R, Mouser LT et al. Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1980; 303: 897-901.
- <sup>39</sup> Braunwald E. Myocardial reperfusion limitation of infarct size, reduction of left ventricular dysfunction and improved survival: should the paradigm be expanded?. *Circulation*. 1989; 79: 441-444.
- <sup>40</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>41</sup> Gruentzig AR, Senning A, Siegenthaler W. Non-operative dilatation of coronary artery stenosis: Percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N. Engl J Med* 1979; 301:61-68.
- <sup>42</sup> De Feyter PJ, Serruys PW, Wijns W, Van den Brand M: Emergency PTCA in unstable angina pectoris refractory to optimal medical treatment. *N Engl J Med* 1985;313:342-346.
- <sup>43</sup> Grines CL, Browne KF, Marco J, et al. Comparison of immediate angioplasty with thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993;328:673-679.
- <sup>44</sup> Weintraub W, Jones E, Morris D, King S III, et al. Outcome of reoperative coronary bypass surgery versus coronary angioplasty after previous bypass surgery. *Circulation* 1985;72:1314-1320.
- <sup>45</sup> Cowley MJ, Vetrivec GW, Disciascio G, et al. Coronary angioplasty of multiple vessels: Short term outcome and long-term results. *Circulation* 1985;72:1314-1320.
- <sup>46</sup> Ellis S, Tamai H, Nobuyoshi M, Kosuga K, Colombo A, et al. Contemporary percutaneous treatment of unprotected left main coronary stenoses. Initial results from a Multicenter Registry analysis 1994-1996. *Circulation* 1997;96(11):3867-3872.
- <sup>47</sup> Ricci DR, Ray S, Buller CE, O'Neill B, Foster C, Almond D, et al. Six month follow up of patients randomized to prolonged inflation or stent for abrupt occlusion during

- PTCA- clinical and angiographic data: TASC II. *Circulation* 1995;92 (Supl abstracts from the 68 th scientific sessions):475.
- <sup>48</sup> Hearn JA, King SB, Douglas JS, Carlin SF, Lembo NJ, Ghazzal ZMB. Clinical and angiographic outcomes after coronary artery stenting for acute or threatened closure after percutaneous transluminal coronary angioplasty: initial results with a balloon-expandable, stainless steel design. *Circulation* 1993;88:2086-2096.
- <sup>49</sup> Schoming A, Kastrati A, Mudra H, Blasini R, Schunlen H, Klauss V et al. Four year experience with Palmaz Schatz stenting in coronary angioplasty complicated by dissection with threatened or present vessel closure. *Circulation* 1994;90:2716-2724.
- <sup>50</sup> Rensing BJ, Hermans WR, Vos J, Bossuyt P, Rutsch P, Serruys PW. Angiographic risk factors of luminal narrowing after coronary balloon angioplasty using measurements to reflect stretch and elastic recoil at the dilatation size. *Am J Cardiol* 1992;69:584-591.
- <sup>51</sup> Haude M, Erbel R, Issa H, Meyer J. Quantitative analysis of elastic recoil after balloon angioplasty and after intracoronary implantation of balloon-expandable Palmaz-Schatz stents. *J Am Coll Cardiol* 1993;21:26-34.
- <sup>52</sup> Medina A, Pan M, Suárez de Lezo, J, Romero M, Hernández E, Segura J, Melián F, Ortega J, Morales J, Wanguemert F, Benitez F, Alonso S, Benitez J, Jaramillo N, Dios F. "Primary stent treatment in the acute phase of myocardial infarction" . *Rev Esp Cardiol* 1997;50:2:63-68.
- <sup>53</sup> Grines CL, Browne KF, Marco J, Rothbaum D, Stone GW, O'Keefe J et al Coronary angioplasty A comparison of immediate angioplasty with thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *N Engl Med.* 1993; 328: 673-679.
- <sup>54</sup> The global use of strategies to open occluded coronary arteries in acute coronary syndromes (GUSTO IIb) angioplasty substudy investigator. A clinical trial comparing primary with tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction. *N. England J. Med* 1997; 336: 1621-1628.
- <sup>55</sup> Furie B, Furie BC. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N Eng J Med* 1992; 326: 800-806.

- <sup>56</sup> George JN. Platelets. *Lancet* 2000; 355: 1531-1539.
- <sup>57</sup> Hirsh J, Weitz JI. New antithrombotic agents. *Lancet* 1999; 353: 1431-1436.
- <sup>58</sup> Mueller RL, Scheidt S. History of drugs for thrombotic disease. Discovery, development, and directions for the future. *Circulation* 1994; 89: 432-449.
- <sup>59</sup> López Bescós L, Arós Borau F, Lidon Corbi RM, Cequier Fillat A, Bueno H, Alonso JJ, et al. Actualización (2002) de las Guías de Práctica Clínica de la Sociedad Española de Cardiología en angina inestable/infarto sin elevación del segmento ST. *Rev Esp Cardiol*. 2002;55:631-42.
- <sup>60</sup> Silber S, Albertsson P, Aviles FF, Camici PG, Colombo A, Hamm C, et al.. Guidelines for percutaneous coronary interventions. The Task Force for Percutaneous Coronary Interventions of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2005;26:804-47.
- <sup>61</sup> Quinn MJ, Fitzgerald DJ. Ticlopidine and clopidogrel. *Circulation* 1999; 100: 1667-1672.
- <sup>62</sup> Bennet CL, Connors JM, Carwile JM, Moake JL, Bell WR, Tarantolo SR et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with clopidogrel. *N Eng J Med* 2000; 342: 1773-1777.
- <sup>63</sup> Rupprecht HJ, Darius H, Borkowski U, Voigtlander T, Nowak B, Genth S et al. Comparison of antiplatelet effects of aspirin, ticlopidine, or their combination after stent implantation. *Circulation* 1998; 97: 1046-1052.
- <sup>64</sup> Moussa I, Oetgen M, Roubin G, Colombo A, Wang X, Iyer S, et al. Effectiveness of clopidogrel and aspirin versus ticlopidine and aspirin in preventing stent thrombosis after coronary stent implantation. *Circulation* 1999; 99: 2364-2366.
- <sup>65</sup> CAPRIE Steering Committee. A Randomised, blinded trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996; 348: 1329-1339.
- <sup>66</sup> Madan M, Berkowitz SD, Tcheng JE. Glycoprotein IIb/IIIa integrin blockade. *Circulation* 1998; 98: 2629-2635.
- <sup>67</sup> Topol EJ, Byzova TV, Plow EF. Platelet IIb/IIIa blockers. *Lancet* 1999; 353; 227-231.

- <sup>68</sup> Dasgupta H, Blankenship JV, Wood GC, Frey CM, Demko SL, Menapace FJ. Thrombocytopenia complicating treatment with intravenous glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitors: a pooled analysis. *Am Heart J* 2000; 140: 206-211.
- <sup>69</sup> Vorchheimer DA, Fuster V. Oral platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists: the present challenge is safety. *Circulation* 1998; 97: 312-314.
- <sup>70</sup> Topol EJ. Toward a new frontier in myocardial reperfusion therapy. Emerging platelet preeminence. *Circulation* 1998; 97: 211-218.
- <sup>71</sup> Chesebro JH, Badimon JJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade in unstable coronary disease. *N Eng J Med* 1998; 338: 1539-1540.
- <sup>72</sup> Adgey AAJ. An overview of the results of clinical trials with glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Eur Heart J* 1998; (Suppl 1): D10-D21.
- <sup>73</sup> Hamm CW, Heeschen C, Goldman B, Vahanian A, Adgey J, Macaya C et al. Benefit of abciximab in patients with refractory unstable angina in relation to serum troponin T levels. *N Engl J Med* 1999; 340: 1623-1629.
- <sup>74</sup> Abildgaard U. Inhibition of the thrombin-fibrinogen reaction by heparin and purified cofactor. *Scand J Haematol.* 1968;5(6):440-53.
- <sup>75</sup> Hirsh J. Heparin. *N Engl J Med.* 1991;324:1565-74.
- <sup>76</sup> Granger CB, Hirsh J, Califf RM, Col J, White HD, Betriu A, et al.. Activated Partial thromboplastin time and outcome after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: results from the GUSTO-I Trial. *Circulation.* 1996;93:870-78.
- <sup>77</sup> Harenberg J, Jorg I, Fanyvesi T.. Heparin-induced thrombocytopenia: pathophysiology and new treatment options. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002;32:289-94.
- <sup>78</sup> Hirsh J. Low molecular weight heparin. A review of the results of recent studies of the treatment of venous thromboembolism and unstable angina. *Circulation* 1998; 98: 1575-1582.
- <sup>79</sup> Fragmin and fast revascularisation during instability in coronary artery disease (FRISC II) investigators. Long-term low-molecular-mass heparin in unstable coronary-artery disease. FRISC II prospective randomised multicentre study. *Lancet* 1999; 354: 701-707.

- <sup>80</sup> Dunn AS, Collier B. Outpatient treatment of deep vein thrombosis: translating clinical trials into practice. *Am J Med* 1999; 106: 660-669.
- <sup>81</sup> Cannon CP, Braunwald E. Hirudin: initial results in acute myocardial infarction, unstable angina and angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25 (Suppl. 7): 30S-37S.
- <sup>82</sup> Organisation to Assess Strategies for Ischemic Syndromes (OASIS-2) Investigators. Effects of recombinant hirudin (lepidurin) compared with heparin on death, myocardial infarction, refractory angina and revascularization procedures in patients with acute myocardial ischaemia without ST elevation: a randomised trial. *Lancet* 1999; 353: 429-438.
- <sup>83</sup> Eriksson BI, Wille-Jorgensen P, Kalebo P, Mouret P, Rosencher N, Bosch P et al. A comparison of recombinant hirudin with a low-molecular weight heparin to prevent thromboembolic complications after total hip replacement. *N Eng J Med* 1997; 337: 1329-1335.
- <sup>84</sup> Parry MA, Maraganore JM, Stone SR.. Kinetic mechanism for the interaction of Hirulog with thrombin. *Biochemistry*. 1994;33:14807-14.
- <sup>85</sup> GISSI (Gruppo Italiano per lo Studio della Streptochinasi nell'infarto miocardico). Effectiveness of intravenous thrombolytic treatment in acute myocardial infarction. *Lancet* 1986; 1: 397-401.
- <sup>86</sup> ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. *Lancet* 1988; 2: 349-360.
- <sup>87</sup> ISIS-3 (Third International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. ISIS-3: A randomised trial of streptokinase vs tissue plasminogen activator vs anistreplase and of aspirin plus heparin vs aspirin alone among 41299 cases of suspected acute myocardial infarction. *Lancet* 1992; 339: 753-770.
- <sup>88</sup> The GUSTO Investigators. An international randomized trial comparing four thrombolytic strategies for acute myocardial infarction. *N Eng J Med* 1993; 329: 673-682.

- <sup>89</sup> Boersma E, Maas ACP, Deckers JW, Simmons M. Early thrombolytic treatment in acute myocardial infarction: reappraisal of the golden hour. *Lancet* 1996; 348: 771-775.
- <sup>90</sup> The Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries (GUSTO-III) Investigators: A comparison of reteplase with alteplase for acute myocardial infarction. *N Eng J Med* 1997; 337: 1118-1123.
- <sup>91</sup> Assessment of the safety and efficacy of a new thrombolytic (ASSENT-2) investigators. Single-bolus tenecteplase compared with front-loaded alteplase in acute myocardial infarction: the ASSENT-2 double blind randomised trial. *Lancet* 1999; 354: 716-722.
- <sup>92</sup> Haude M, Erbel R, Issa H, Straub U, Rupprecht HJ, Treese N, Meyer J. Subacute thrombotic complications after intracoronary implantation of Palmaz-Schatz stents. *Am Heart J.* 1993 Jul;126(1):15-22.
- <sup>93</sup> Pan M, Suárez de Lezo J, Velasco F, Romero M, Medina A, Segura J, Hernández E, Pavlovic D, Melian F, Gallardo A, Zayas R, Ruiz M, Torres A. Reduction of thrombotic and hemorrhagic complications after stent implantation. *Heart J.* 1996 Dec;132(6):1119-26.
- <sup>94</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>95</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>96</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>97</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>98</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>99</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>100</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>101</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>102</sup> Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; 416: 545-548.
- <sup>103</sup> Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; 297: 2256-2259.
- <sup>104</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>105</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>106</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.
- <sup>107</sup> Armitage JO. Medical progress: bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1994; 330: 827-838.
- <sup>108</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>109</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>110</sup> Korbling 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>111</sup> Martin-Rendon E, Watt SM. Stem cell plasticity. *Br J Haematol* 2003; 122: 877-891.
- <sup>112</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>113</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>114</sup> Koc ON, Lazarus HM. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 235-239.
- <sup>115</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>116</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>117</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>118</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>119</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>120</sup> Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114: 763-776.
- <sup>121</sup> Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422: 901-604.
- <sup>122</sup> Rideout WM, 3RD, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 2001; 293: 1093-1098.
- <sup>123</sup> Odelberg SJ, Kollhoff A, Keating MT. Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by *msx1*. *Cell* 2000; 103: 1099-1109.
- <sup>124</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>125</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>126</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>127</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>128</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>129</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>130</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>131</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>132</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.
- <sup>133</sup> 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.
- <sup>134</sup> 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.
- <sup>135</sup> 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.
- <sup>136</sup> 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.
- <sup>137</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>138</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>139</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>140</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>141</sup> Zohnhöfer 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 myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2006 Mar 1;295(9):1003-10.
- <sup>142</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>143</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>144</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>145</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>146</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>147</sup> Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282: 1145-7.
- <sup>148</sup> Solter D, Gearhart J. Putting stem cells to work. *Science* 1999;283: 1468-70.
- <sup>149</sup> Tomita S, Li RK, Weisel RD et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999; 100 (suppl II): 247-256.
- <sup>150</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>151</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>152</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.
- <sup>153</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>154</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>155</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>156</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>157</sup> Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR. Single platform flow cytometry absolute CD34+ cell counts based in the ISHAGE guidelines International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *Cytometry* 1998; 34: 61-70.

- <sup>158</sup> Norol F, Merlet P, Isnard R, Sebillon P, Bonnet N, Cailliot C, Carrion C, Ribeiro M, Charlotte F, Pradeau P, Mayol JF, Peinnequin A, Drouet M, Safsafi K, Vernant JP, Herodin F. Influence of mobilized stem-cells on myocardial infarct repair in a nonhuman primate mode. *Blood* 2003; 102: 4361-4368.
- <sup>159</sup> Ciulla MM, Lazzari L, Pacchiana R, Esposito A, Bosari S, Ferrero S, Gianelli U, Paliotti R, Busca G, Giorgetti A, Magrini F, Rebullia P. Homing of peripherally injected bone marrow cells in the rat after experimental myocardial injury. *Haematologica* 2003; 88: 614-621.
- <sup>160</sup> Dreger P, Haferlach T, Eckstein V, Jacobs S, Suttorp M, Loffler H, Muller-Ruchholtz W, Schmitz N. G-CSF mobilized peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation.: safety, kinetics of mobilization and composition of the graft. *Br J Haematol* 1994; 87:609-613.
- <sup>161</sup> Korbling M, Przepiorka D, Huh YO, Engel H, van Besien K, Giralt S, Andersson B, Kleine HD, Seong D, Deisseroth AB, et al. Allogeneic blood stem-cell transplantation for refractory leukemia and lymphoma: potential advantage of blood over bone marrow allografts. *Blood* 1995; 85:1659-1665.
- <sup>162</sup> Platzbecker U, Prange-Krex G, Bornhauser M, Koch R, Soucek S, Aikele P, Haack A, Haag C, Schuler U, Berndt A, Rutt C, Ehninger G, Holig K. Spleen enlargement in healthy donors during G-CSF mobilization of PBPCs. *Transfusion* 2001; 41: 184-189.
- <sup>163</sup> Stroncek D, Shawker T, Follmann D, Leitman SF. G-CSF induced spleen size changes in peripheral blood progenitor cell donors. *Transfusion* 2003; 43: 609-613.
- <sup>164</sup> Picardi M, De Rosa G, Selleri C, Scarpato N, Soscia E, Martinelli V, Ciancia R, Rotoli B. Spleen enlargement following recombinant human G-CSF administration for peripheral blood stem-cell mobilization. *Haematologica* 2003; 88:794-800.
- <sup>165</sup> Pitini V, Ciccolo A, Arrigo C, Aloï G, Micali C, La Torre F. Spontaneous rupture of spleen during peripheral blood stem-cell mobilization in a patient with breast cancer. *Haematologica* 2000; 85: 559-60.
- <sup>166</sup> Falzetti F, Aversa F, Minelli O, Tabilio A. Spontaneous rupture of spleen during peripheral blood stem-cell mobilization in a healthy donor. *Lancet* 1999; 353: 555.

- <sup>167</sup> Becker PS, Wagle M, Matous S, Swanson RS, Pihan G, Lowry PA, Stewart FM, Heard SO. Spontaneous splenic rupture following administration of G-CSF: occurrence in an allogeneic donor of peripheral blood stem-cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 1997; 3: 45-49.
- <sup>168</sup> Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet* 2004; 363: 783-784.
- <sup>169</sup> Sheehan FH. Determinants of improved left ventricular function after thrombolytic therapy in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1987;9:937-44.
- <sup>170</sup> Sheehan FH, Doerr R, Schmidt WG, Bolson EL, Uebis R, von Essen R, et al. Early recovery of left ventricular function after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: an important determinant of survival. *J Am Coll Cardiol* 1988;12:289-300.
- <sup>171</sup> Lancellotti P, Albert A, Berthe C, Pierard LA. Full recovery of contraction late after myocardial infarction: determinants and early predictors. *Heart* 2001;85:521-6.
- <sup>172</sup> Solomon SD, Glynn RJ, Greaves S, Ajani U, Rouleau JL, Menapace F, et al. Recovery of ventricular function after myocardial infarction in the reperfusion era: the healing and the early afterload reduction therapy study. *Ann Intern Med* 2001;134:451-8.
- <sup>173</sup> Schmidt WG, Sheehan FH, von Essen R, Uebis R, Effert S. Evolution of left ventricular function after intracoronary thrombolysis for acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1989;63:497-502.
- <sup>174</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>175</sup> Herrera C, Sánchez J, Torres A, Pascual A, Rueda A, Alvarez MA. Pattern of expression of CXCR4 and adhesion molecules by human CD34+ cells from different sources: role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica* 2004;89:1037-45.

- <sup>176</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>177</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>178</sup> Seeger FH, Tonn T, Krzossok N, Zeiher AM, Dimmeler S. Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2007 Mar;28(6):766-72. Epub 2007 Feb 13.
- <sup>179</sup> Heeschen C, Lehmann R, Honold J, Assmus B, Aicher A, Walter DH, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation*. 2004 Apr 6;109(13):1615-22. Epub 2004 Mar 22.
- <sup>180</sup> Menasché P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Apr 2;41(7):1078-83.