



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

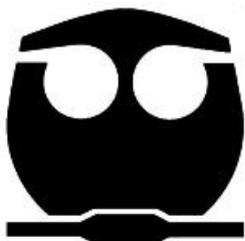
---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

TRASPLANTE AUTÓLOGO INTRACORONARIO DE  
CÉLULAS MADRE DERIVADAS DE MEDULA ÓSEA  
EN INFARTO DE MIOCARDIO (ESTUDIO TRACIA)

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A :  
ELLIOT MANZANO MORALES



México, D.F.

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

---

# Contenido

---

---

Capítulo I: INTRODUCCIÓN .....	- 6 -
Capítulo II: MARCO TEÓRICO .....	- 11 -
El corazón.....	- 11 -
Fisiología del músculo cardíaco.....	- 15 -
Electrocardiograma .....	- 16 -
Cardiopatía isquémica.....	- 19 -
Infarto agudo de miocardio.....	- 20 -
Hipertrofia, necrosis y apoptosis del cardiomiocito.....	- 22 -
Aspectos clínicos del Infarto Agudo de Miocardio .....	- 24 -
Síntomas.....	- 24 -
Diagnóstico diferencial.....	- 24 -
Tratamiento.....	- 26 -
Medidas generales .....	- 27 -
Valoración de la función cardíaca.....	- 29 -
Terapia con células madre en infarto agudo de miocardio.....	- 30 -
Células madre progenitoras cardíacas.....	- 31 -
Células madre adultas derivadas de médula ósea .....	- 33 -
Células Madre Hematopoyéticas .....	- 34 -
Células Madre Mesenquimales.....	- 34 -
Células Progenitoras Endoteliales.....	- 35 -
Nichos de células madre.....	- 35 -
Movilización de células madre de médula ósea y su establecimiento en miocardio isquémico.....	- 36 -
Mecanismos de acción de las células madre en la terapia regenerativa de miocardio.....	- 40 -
Diferenciación en cardiomiocitos .....	- 40 -
Fusión de células madre trasplantadas con cardiomiocitos residentes .....	- 42 -
Efectos paracrinos.....	- 42 -
Vías de administración de las células madre.....	- 43 -
Seguimiento de los pacientes que reciben terapia celular .....	- 44 -

---

Terapia con células madre derivadas de médula ósea, estudios clínicos pioneros .....	- 45 -
<b>Capitulo III: OBJETIVO.....</b>	<b>- 48 -</b>
<b>Capitulo IV: METODOLOGÍA.....</b>	<b>- 49 -</b>
Protocolo del trasplante autólogo de células progenitoras hematopoyéticas derivadas de médula ósea en pacientes con infarto agudo de miocardio. ....	- 49 -
Selección de los pacientes.....	- 50 -
Desarrollo.....	- 51 -
Obtención de CPH. ....	- 51 -
Inyección intracoronaria de células madre.....	- 58 -
Evaluación. ....	- 58 -
Protocolo de resonancia magnética. ....	- 59 -
Protocolo SPECT (Single Positron Emission Computed Tomography) .....	- 61 -
Ventriculografía isotópica en equilibrio. ....	- 61 -
Flujograma del trasplante de CPH.....	- 62 -
<b>Capitulo V: RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>- 63 -</b>
<b>Capitulo VI: CONCLUSIONES.....</b>	<b>- 72 -</b>
<b>Capitulo VII: BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>- 73 -</b>

# Trasplante Autólogo Intracoronario de Células Madre Derivadas de Medula Ósea en Infarto de Miocardio, (estudio TRACIA).

## Capítulo I: Introducción

Las enfermedades cardiovasculares representan una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad general tanto en el mundo, como en México. La importancia de la epidemia de las enfermedades crónicas no transmisibles rebasa ampliamente a la de las enfermedades infecciosas y parasitarias, y su velocidad de propagación es mayor en los países de economía emergente que en los más desarrollados. Se suele considerar que las enfermedades crónicas afectan principalmente a las personas de edad, pero actualmente se sabe que casi la mitad de las muertes por enfermedades crónicas se producen prematuramente, en personas de menos de 70 años y una cuarta parte de esas defunciones se dan en personas de menos de 60 años. <sup>(1)</sup>

En nuestro país, las enfermedades del corazón en conjunto son la primera causa de mortalidad general cuando se desagrupan como causa única, la más prevalente de ellas, la cardiopatía isquémica se convierte en la segunda causa de mortalidad general, debajo de la diabetes mellitus cuya mortalidad es originada principalmente por complicaciones cardiovasculares. Cuando se considera por género, la diabetes mellitus sigue siendo la primera causa de mortalidad en las mujeres pero no en los hombres, en quienes la cardiopatía isquémica ocupa la primera causa de muerte.<sup>(1)</sup>

El infarto agudo del miocardio (IAM) es la primera manifestación de cardiopatía isquémica en más del cincuenta por ciento de los casos; la angina de pecho se presenta en el treinta por ciento, mientras que la muerte súbita en el veinte por ciento. Cada año en los Estados Unidos, 800,000 personas sufren de infarto agudo de miocardio, de las cuales 213,000 fallecen. La mayor mortalidad es por arritmias ventriculares en la primera hora después de iniciados los síntomas y antes de recibir atención médica en los servicios de emergencia. La mayor parte de las muertes hospitalarias se presentan durante los primeros días de la hospitalización. La mortalidad a corto y largo plazo depende de varios factores, los más importantes son la extensión del daño al miocardio y las estrategias para su atención, como es la reperfusión miocárdica temprana, que ha logrado disminuir la mortalidad hospitalaria del 15 al 7%; esta cifra se relaciona con la forma de tratamiento en la fase aguda del infarto del miocardio. El pronóstico a largo plazo está relacionado con la extensión del daño al miocardio. En México, la cardiopatía isquémica es la primera causa de mortalidad en personas en edad productiva. Para reducir el tiempo de atención médica es necesario reconocer que el IAM es una emergencia médica. En algunos casos, el retraso en el tratamiento se relaciona con la falta de atención por parte del paciente para reconocer que es un padecimiento serio y el retraso en acudir a los servicios de urgencias; en otros, las causas son la evaluación pre-hospitalaria de los servicios de emergencia, el tratamiento inicial y el tiempo de transporte para la atención definitiva.<sup>(2)</sup>

En la última década se han dado grandes avances en la terapia con fármacos para tratar el infarto del miocardio, dando así, un aumento en la calidad de vida del paciente. No obstante, los beneficios de la farmacoterapia son limitados en los casos más

severos. A la fecha, el tratamiento está basado en una combinación de medicamentos (agentes trombolíticos, inhibidores de glicoproteínas plaquetarias IIb/IIIa, aspirina, clopidogrel y  $\beta$  bloqueadores), intervención coronaria percutánea, bypass coronario, trasplante de corazón y terapia con dispositivos (marcapasos biventricular y desfibrilador cardíaco interno). <sup>(4)</sup> Sin embargo, la necrosis miocárdica comienza inmediatamente después de la oclusión coronaria, y en la mayoría de los casos se produce la pérdida irreversible de músculo a pesar de tener una reperfusión exitosa.

El tejido necrosado activa una serie de señales bioquímicas intracelulares que inician y posteriormente modulan cambios de reparación que incluyen dilatación ventricular, hipertrofia y la formación de una cicatriz de colágena. Esta remodelación ventricular puede mantenerse por semanas o meses, hasta que las fuerzas de distensión sean contrarrestadas por la fuerza tensional de la cicatriz de colágena. <sup>(5)</sup> Una forma de revertir este proceso de remodelación ventricular, sería la regeneración de cardiomiocitos y la estimulación de neoangiogénesis dentro del tejido infartado.

Avances en la investigación de la biología de células madre han cuestionado la noción de que el infarto del miocardio es irreparable. La pluripotencialidad de las células madre para diferenciarse en líneas celulares especializadas comenzó a ganar interés entre los cardiólogos cuando fue demostrado en modelos animales que la inyección intramiocardio de células madre derivadas de médula ósea pueden incrementar la función cardíaca e incluso reparar el tejido después de un infarto al miocardio inducido. <sup>(6)</sup> De esta manera, una nueva forma adicional de tratamiento parece posible con el advenimiento de la ciencia de las células madre y su aplicación en la cardiología, el cual ofrece la posibilidad de que el miocardio infartado pueda ser reparado. (Figura 1)

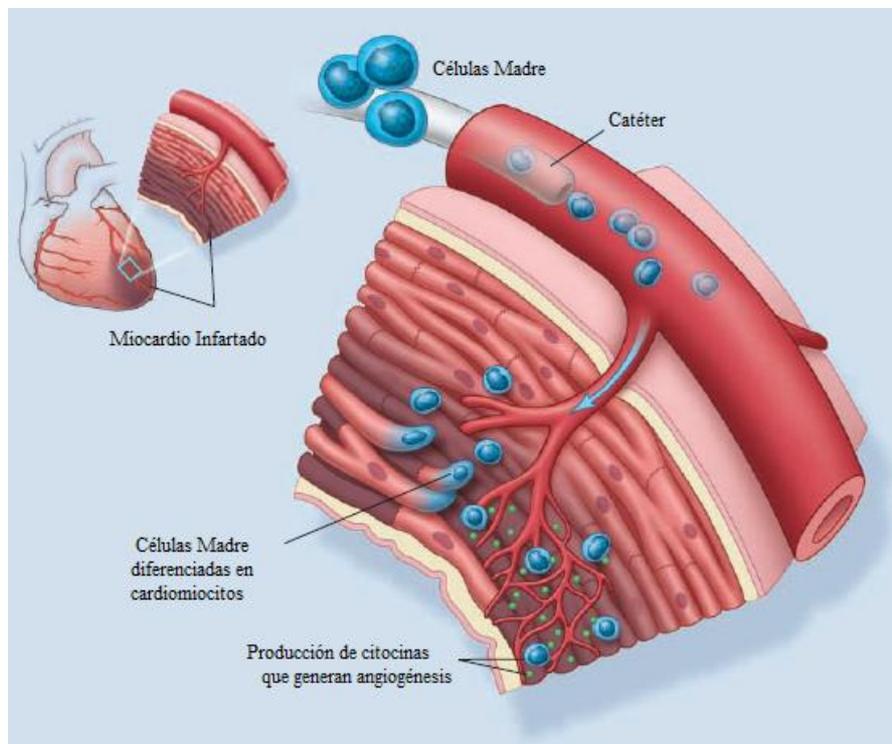


Figura 1. Las células madre son liberadas en el corazón por medio de un catéter intracoronario. Una vez alcanzada el área infartada, las células madre pudieran incrementar la contractibilidad ya diferenciadas en cardiomiocitos funcionales y así aumentar la perfusión con la liberación de citocinas que inducen angiogénesis. (Adaptado de Kang H, et al. Stem cell therapy for myocardial infarction. CMAJ, AUG. 31, 2004; 171)

Durante los últimos 30 años, el pronóstico de los pacientes con infarto de miocardio ha mejorado considerablemente gracias al éxito de las estrategias de limitación de la necrosis, de estabilización eléctrica del miocardio y de facilitación de la eyección ventricular. Sin embargo, debido a las limitaciones en el uso o la eficacia de los tratamientos y a dificultades logísticas, todavía es muy baja la proporción de pacientes con esta entidad en la que se consigue una repermeabilización arterial óptima y una reperfusión tisular adecuada. Esto explica que la disfunción ventricular por remodelado post-infarto siga siendo la causa predominante de la insuficiencia cardíaca y el mecanismo fundamental de su elevada prevalencia. En consecuencia, se comprende también que el interés de la investigación sobre el infarto agudo de miocardio esté enfocado tanto en el incremento de la aplicabilidad y eficacia de las estrategias de reperfusión, como en la búsqueda de terapias que aumenten la resistencia del miocardio a la isquemia grave o que permitan regenerar el miocardio destruido. <sup>(88)</sup>

Si la implantación de células madre derivadas de la médula ósea del paciente en la región infartada será el siguiente paso para atenuar el fenómeno de remodelado y reducir la mortalidad de los pacientes con infarto de miocardio es algo todavía sin respuesta. Sin embargo, los nuevos conceptos sobre la capacidad de regeneración del corazón adulto y los resultados experimentales de esta línea de trabajo obligan a desarrollar estudios clínicos rigurosos sobre la factibilidad y eficacia de este tratamiento.<sup>(88)</sup>

Trabajos experimentales y clínicos sugieren que el tejido necrótico debido al IAM tiene la capacidad de regenerarse. En el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez en colaboración con el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, se ha comenzado un estudio clínico para demostrar que la implantación intracoronaria de células madre es un procedimiento factible y seguro. En el presente trabajo se muestra la información teórica implicada con el tema de la terapia con células madre derivadas de médula ósea. También así, se detalla la metodología por la cual son extraídas, procesadas e inyectadas las Células Progenitoras Hematopoyéticas autólogas

## Capítulo II: Marco Teórico

### El corazón.

El corazón es un órgano cuya función es bombear la sangre a través de los vasos sanguíneos del organismo. Se sitúa en el mediastino medio en donde está rodeado por una membrana fibrosa gruesa llamada pericardio. Esta envuelto laxamente por el saco pericárdico que es un saco seroso de doble pared que encierra al corazón. El pericardio esta formado por una capa Fibrosa y una capa Serosa. La fibrosa esta formado por tejido conectivo y adiposo. La capa serosa del pericardio interior secreta líquido pericárdico que lubrica la superficie del corazón, para aislarlo y evitar la fricción mecánica durante la contracción. Las capas fibrosas externas lo protegen y separan.<sup>(7)</sup>

El corazón se compone de tres tipos de músculo cardíaco principalmente:

- Músculo auricular
- Músculo ventricular
- Fibras musculares excitadoras y conductoras especializadas.

Estos se pueden agrupar en dos grupos, músculos de la contracción y músculos de la excitación. Los músculos de la contracción se encuentran en el músculo auricular y músculo ventricular; mientras que los de excitación se encuentran en las fibras musculares excitadoras y conductoras especializadas. <sup>(7)</sup>

Localización anatómica:

El corazón se localiza en el mediastino inferior medio, entre el segundo y quinto espacio intercostal, izquierdo. El corazón está situado de forma oblicua, aproximadamente dos tercios a la izquierda del plano medio y un tercio a la derecha. El corazón tiene forma de una pirámide inclinada con el vértice en el “suelo” en sentido anterior izquierdo; la base, opuesta a la punta, en sentido posterior y 3 lados: la cara diafragmática, sobre la que descansa la pirámide, la cara esternocostal, anterior y la cara pulmonar hacia la izquierda. <sup>(7)</sup>

Estructura del corazón:

De adentro hacia afuera el corazón presenta las siguientes capas:

- El endocardio, una membrana serosa de endotelio y tejido conectivo de revestimiento interno, con la cual entra en contacto la sangre. Incluye fibras elásticas y de colágena, vasos sanguíneos y fibras musculares especializadas. En su estructura encontramos las trabéculas carnosas, que dan resistencia para aumentar la contracción del corazón.
- El miocardio, el músculo cardíaco propiamente dicho; encargado de impulsar la sangre por el cuerpo mediante su contracción. Encontramos también en esta capa tejido conectivo, capilares, capilares linfáticos y fibras nerviosas.

- El epicardio, es una capa fina serosa mesotelial que envuelve al corazón llevando consigo capilares y fibras nerviosas. Esta capa se considera parte del pericardio seroso. (7)

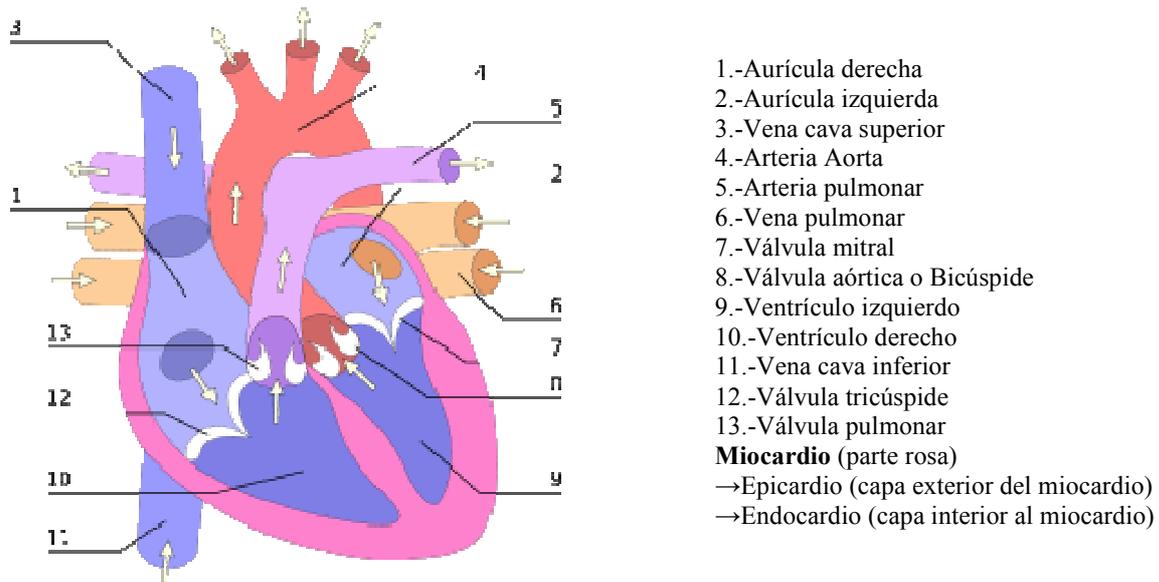


Figura 2. Morfología cardíaca. Las flechas blancas indican el flujo normal de la sangre.

El corazón se divide en cuatro cavidades, dos superiores o aurículas (o atrios) y dos inferiores o ventrículos. Las aurículas reciben la sangre del sistema venoso, pasan a los ventrículos y desde ahí salen a la circulación arterial.

La aurícula derecha y el ventrículo derecho forman lo que clásicamente se denomina el corazón derecho. Recibe la sangre que proviene de todo el cuerpo, que desemboca en la aurícula derecha a través de las venas cavas superior e inferior. Esta sangre, baja en oxígeno, llega al ventrículo derecho, desde donde es enviada a la circulación pulmonar por la arteria pulmonar.

Dado que la resistencia de la circulación pulmonar es menor que la sistémica, la fuerza que el ventrículo debe realizar es menor, razón por la cual su tamaño es considerablemente menor al del ventrículo izquierdo.<sup>(8)</sup>

La aurícula izquierda y el ventrículo izquierdo forman el llamado corazón izquierdo. Recibe la sangre de la circulación pulmonar, que desemboca a través de las cuatro venas pulmonares a la porción superior de la aurícula izquierda. Esta sangre está oxigenada y proviene de los pulmones. El ventrículo izquierdo la envía por la arteria aorta para distribuirla por todo el organismo.<sup>(7)</sup>

El tejido que separa el corazón derecho del izquierdo se denomina septo o tabique. Funcionalmente, se divide en dos partes no separadas: la superior o *tabique interauricular*, y la inferior o tabique interventricular. Este último es especialmente importante, ya que por él discurre el fascículo de His, que permite llevar el impulso a las partes más bajas del corazón.<sup>(7)</sup>

Válvulas cardíacas.

Las válvulas cardíacas son las estructuras que separan unas cavidades de otras, evitando que exista reflujo retrógrado. Están situadas en torno a los *orificios atrioventriculares* (o aurículo-ventriculares) y entre los ventrículos y las arterias de salida. Son las siguientes cuatro:

- La válvula tricúspide, que separa la aurícula derecha del ventrículo derecho.
- La válvula pulmonar, que separa el ventrículo derecho de la arteria pulmonar.
- La válvula mitral, que separa la aurícula izquierda del ventrículo izquierdo.
- La válvula aórtica, que separa el ventrículo izquierdo de la arteria aorta.<sup>(8)</sup>

## Fisiología del músculo cardíaco.

### Ciclo cardíaco.

Cada latido del corazón lleva consigo una secuencia de eventos que en conjunto forman el ciclo cardíaco, constando principalmente de tres etapas: sístole auricular, sístole ventricular y diástole. El ciclo cardíaco hace que el corazón alterne entre una contracción y una relajación aproximadamente 75 veces por minuto, es decir el ciclo cardíaco dura unos 0,8 segundos. <sup>(7)</sup>

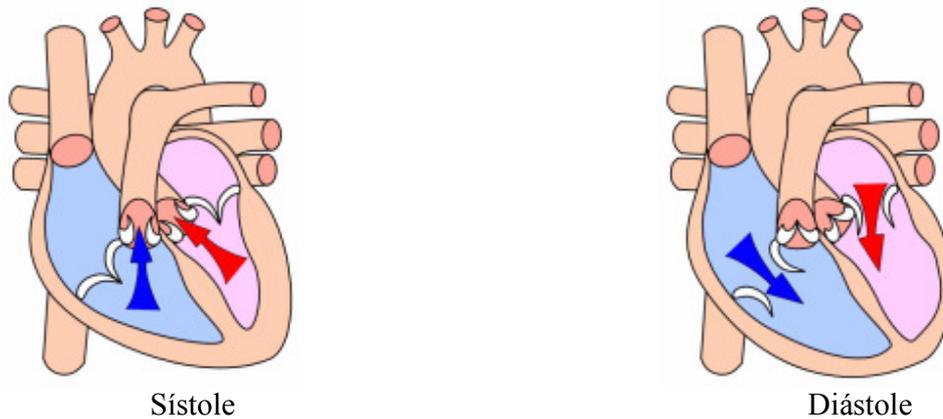


Figura 3. Ciclo cardíaco, durante este ciclo se produce la sístole, que es en si la contracción del músculo cardíaco y la diástole, que es la relajación del tejido cardíaco.

Durante la sístole auricular, las aurículas se contraen y proyectan la sangre hacia los ventrículos. Una vez que la sangre ha sido expulsada de las aurículas, las válvulas atrioventriculares entre las aurículas y los ventrículos se cierran. Esto evita el reflujo de sangre hacia las aurículas. El cierre de estas válvulas produce el sonido familiar del latido del corazón. Dura aproximadamente 0,1 s.

La sístole ventricular implica la contracción de los ventrículos expulsando la sangre hacia el aparato circulatorio. Una vez que la sangre es expulsada, las dos válvulas sigmoideas, la válvula pulmonar en la derecha y la válvula aórtica en la izquierda, se cierran. Dura aprox. 0,3 s. <sup>(7)</sup> (Figura 3)

Por último la diástole es la relajación de todas las partes del corazón para permitir la llegada de nueva sangre. Dura aprox. 0,4 s. <sup>(7)</sup> (Figura 3)

En el proceso se pueden escuchar dos ruidos:

- Primer ruido cardiaco: cierre de válvulas tricúspide y mitral.
- Segundo ruido cardiaco: cierre de válvulas sigmoideas (válvulas pulmonares y aortas). <sup>(7)</sup>

Ambos ruidos se producen debido al cierre súbito de las válvulas, sin embargo no es el cierre lo que produce el ruido, sino la reverberación de la sangre adyacente y la vibración de las paredes del corazón y vasos cercanos. La propagación de esta vibración da como resultado la capacidad para auscultar dichos ruidos.

Este movimiento se produce unas 70 a 80 veces por minuto.

La expulsión rítmica de la sangre provoca el pulso que se puede palpar en las arterias radiales, carótidas, femorales, etc.

En la fisiología del corazón, cabe destacar, que sus células se despolarizan por sí mismas dando lugar a un potencial de acción, que resulta en una contracción del músculo cardíaco. Por otra parte, las células del músculo cardíaco se "comunican" de manera que el potencial de acción se propaga por todas ellas, de tal manera que ocurre la contracción del corazón. <sup>(7)</sup>

## **Electrocardiograma**

Cuando el impulso cardiaco atraviesa el corazón, la corriente eléctrica también se propaga desde el corazón hacia los tejidos adyacentes que lo rodean. Una pequeña parte de la corriente se propaga hacia la superficie corporal. Si se colocan electrodos en la piel en lados opuestos del corazón se pueden registrar los potenciales eléctricos que se generan por la corriente; el registro se conoce como electrocardiograma. <sup>(8)</sup>

El electrocardiograma normal está formado por una onda P, un complejo QRS y una onda T. Con frecuencia, el complejo QRS está formado por tres ondas separadas: la onda Q, la onda R y la onda S. La onda P es producida por los potenciales eléctricos que se generan cuando se despolarizan las aurículas antes del comienzo de la contracción auricular. El complejo QRS está formado por los potenciales que se generan cuando se despolarizan los ventrículos antes de su contracción, es decir, a medida que la onda de despolarización se propaga por los ventrículos. Por tanto, la onda P como los componentes del complejo QRS son las ondas de despolarización.

La onda T es producida por los potenciales que se generan cuando los ventrículos se recuperan del estado de despolarización. Este proceso normalmente aparece en el músculo ventricular entre 0.25 y 0.35 segundos después de la despolarización y la onda T se conoce como onda de repolarización. <sup>(8)</sup>

La onda P se produce al comienzo de la contracción de las aurículas y el complejo QRS de ondas se produce al comienzo de la contracción de los ventrículos. Los ventrículos siguen contraídos hasta después de que se haya producido la repolarización, esto es, hasta después del final de la onda T.

Las aurículas se repolarizan entre 0.15 a 0.2 segundos después del fin de la onda P. Este momento coincide aproximadamente con el momento en el que se registra el complejo QRS en el electrocardiograma. Por tanto, la onda de repolarización auricular, la onda T auricular, habitualmente está oscurecida por el complejo QRS, que es mucho mayor. Por este motivo raras veces se observa la onda T auricular en el electrocardiograma. <sup>(8)</sup>

La onda de repolarización ventricular es la onda T del electrocardiograma normal. Normalmente el músculo ventricular comienza a repolarizarse en algunas fibras aproximadamente 0.2 segundo después del comienzo de la onda de despolarización (complejo QRS), pero en muchas otras fibras tarda hasta 0.35 segundos. Así, el proceso de repolarización ventricular se extiende a lo largo de un periodo prolongado, de aproximadamente 0.15 segundos. Por este motivo la onda T es una onda prolongada en el electrocardiograma. (Figura 4) <sup>(8)</sup>

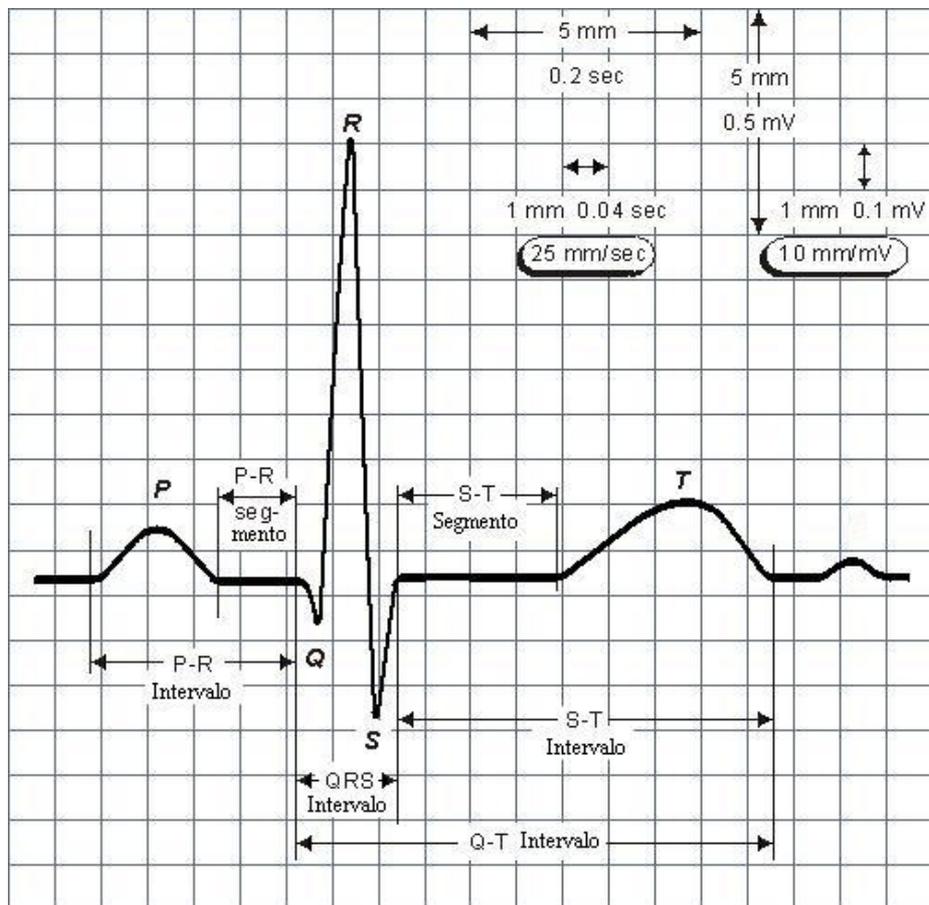


Figura 4. Electrocardiograma normal. El ECG es el estudio por excelencia para el diagnóstico y la clasificación del IAM.

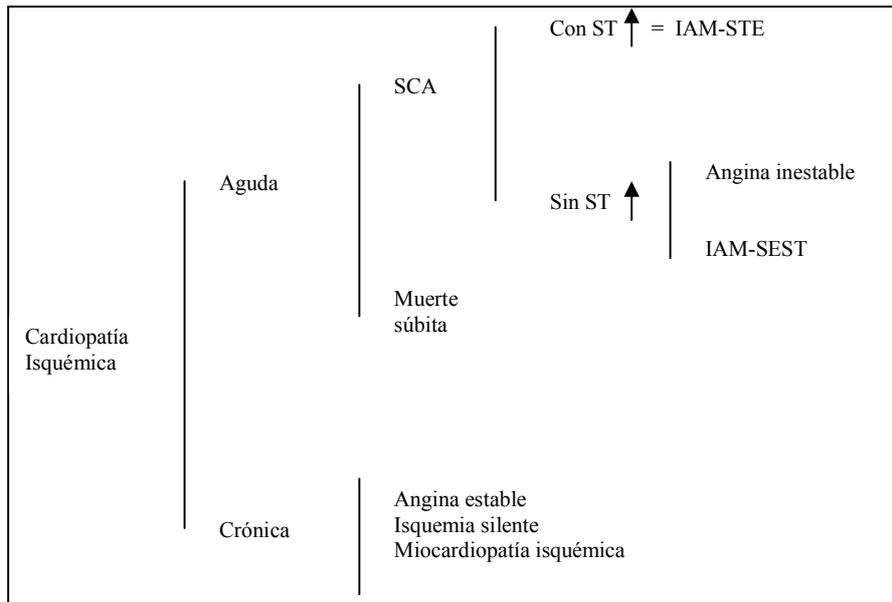
Las alteraciones típicas encontradas en el ECG comienzan por el segmento ST, el que puede supradesnivelarse o infradesnivelarse respecto a la línea base, y prosiguen con los cambios en la onda T. El supradesnivel del ST se considera típico de un IAM que suele evolucionar como transmural, pero cuando es transitorio o cede con nitroglicerina se trata de un fenómeno de Prinzmetal, es decir un espasmo coronario, mientras que el infradesnivel significa una injuria que es compatible con un IAM de localización subendocárdica si es persistente. <sup>(9)</sup>

## Cardiopatía isquémica.

La cardiopatía isquémica es un conjunto de enfermedades del corazón o cardiopatías cuyo origen radica en la incapacidad de las arterias coronarias (coronariopatía) para suministrar el oxígeno necesario a un determinado territorio del músculo cardiaco, lo que dificulta el funcionamiento de éste. Por ello, el corazón enferma debido a la mala función de las arterias coronarias. La causa más frecuente de disminución del flujo sanguíneo coronario es la aterosclerosis. La aterosclerosis es una enfermedad de las arterias grandes e intermedias en la que surgen lesiones grasas llamadas placas ateromatosas en las superficies intermedias de las paredes arteriales. Estas placas comienzan con el depósito de cristales minúsculos de colesterol en la íntima y el músculo liso subyacente.<sup>(8)</sup> Los depósitos de colesterol complementado con la proliferación celular crecen tanto que la placa sobresale en la luz del vaso y reduce en gran medida el flujo sanguíneo, incluso algunas veces obstruye completamente el vaso. Aunque no se llegue a la oclusión, los fibroblastos de la placa acaban depositando tal cantidad de tejido conjuntivo denso que la esclerosis (fibrosis) se intensifica y las arterias se vuelven rígidas e inflexibles. Pasado el tiempo, precipitan sales de calcio junto al colesterol y otros lípidos de las placas, dando así calcificaciones con dureza ósea que hacen a las arterias rígidas. Estos estadios de la enfermedad corresponden a la esclerosis o endurecimiento de las arterias. Las arterias arterioscleróticas pierden distensibilidad y, debido a las zonas degenerativas de las paredes, se rompen con facilidad. Allí donde las placas sobresalen en el flujo sanguíneo, la rugosidad de su superficie provoca la formación de coágulos, con la aparición de trombos que bloquean súbitamente el flujo sanguíneo de la arteria.<sup>(8)</sup>

Estas situaciones dificultan la llegada de la sangre a las células del corazón, que son muy sensibles a la disminución del aporte de sangre. Así, la cantidad de oxígeno que llega al corazón es insuficiente y se manifiesta la enfermedad coronaria o cardiopatía isquémica.<sup>(8)</sup>

El infarto agudo de miocardio integra junto con la angina inestable y la muerte súbita la forma aguda de la cardiopatía isquémica que actualmente recibe el nombre de síndromes coronarios agudos (SCA) <sup>(9)</sup>



Cuadro 1. Clasificación de la cardiopatía isquémica. SCA, síndromes coronarios agudos; ST, IAM-STE, infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST del electrocardiograma; IAM-SEST, infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST del electrocardiograma. (De Mautner B. Cardiología, Basada en la evidencia y la experiencia de la fundación Favolaro. Editorial Grupo Guía, 2003. Buenos Aires , Argentina.)

### Infarto agudo de miocardio.

Se denomina infarto agudo de miocardio (IAM) a la muerte celular de las miofibrillas (grupo de miocitos unidos por colágena) causada por falta de aporte sanguíneo a una zona del corazón que es consecuencia de la oclusión aguda y total de la arteria que irriga dicho territorio. Se dice que la zona de músculo que tiene un flujo cero o poco flujo que no puede mantener la función muscular cardíaca esta infartada. El proceso global se denomina infarto de miocardio. <sup>(7)</sup>

Poco después del inicio del infarto, comienzan a filtrarse pequeñas cantidades de sangre colateral en la zona infartada, lo cual, combinado con la dilatación progresiva de

los vasos sanguíneos locales, hace que la zona se llene en exceso de sangre estancada. Simultáneamente, las fibras musculares usan los últimos vestigios del oxígeno en sangre, provocando que la hemoglobina se desoxigene totalmente. Por tanto, la zona infartada adquiere una coloración azulada o marrón y los vasos sanguíneos de la zona parecen estar ingurgitados, a pesar de la ausencia de flujo sanguíneo. En etapas posteriores las paredes de los vasos son más permeables y pierden líquido; el tejido muscular local se vuelve edematoso y los miocitos cardíacos comienzan a hincharse porque disminuye el metabolismo celular. <sup>(8)</sup>

El IAM tiene dos formas posibles de presentación: la que produce necrosis de todo el espesor del miocardio de epicardio a endocardio, al que se llama IAM transmural, o el que produce necrosis parcial de la pared, por ende no transmural, que lleva un nombre determinado por su ubicación. Si está ubicado en la zona subendocárdica se llama IAM subendocárdico, etc. La mayoría de los IAM transmurales se caracterizan electrocardiográficamente por presentar onda Q patológica y la mayoría de los no transmurales por no presentarla, aunque no siempre se cumple, por lo que para no prejuiciar se dividieron en IAM Q y IAM no Q, lo cual genera diferencias en el manejo y el pronóstico de ambos. <sup>(9)</sup>

Actualmente, el IAM se divide en dos tipos: con elevación del segmento ST del electrocardiograma (IAM-STE) y sin dicha elevación (IAM-SEST). En este último, la diferencia reside, además de los factores que se han mencionado, como la existencia de circulación colateral que suple parcialmente la disminución del flujo coronario por la obstrucción, en la disolución más temprana, generalmente alrededor de una hora, del trombo, con lo cual se produce una isquemia sostenida que llega a necrosar una porción menor del miocardio. En cambio, cuando el trombo no se disuelve produce la necrosis completa del tejido miocárdico irrigado por la coronaria obstruida, generando el cuadro clínico del IAM-STE, comúnmente denominado IAM a secas (cuadro 1) <sup>(9)</sup>

El IAM se ha asociado a factores de estrés emocional o ambiental que activan el sistema nervioso simpático con incremento de las catecolaminas. El aumento de la estimulación simpática eleva el consumo de oxígeno por el corazón con aumento de la contractilidad y la frecuencia, y aumenta también la tensión sufrida por las lesiones

vasculares al incrementar la contracción, la torsión y la presión arterial. Estas fuerzas pueden provocar la rotura de la placa en una zona debilitada por la inflamación. Los niveles elevados de catecolaminas pueden aumentar la formación de trombos activando las plaquetas.<sup>(10)</sup>

Si el deficiente flujo sanguíneo al corazón dura lo suficiente, puede iniciar un proceso llamado cascada isquémica, en la que las células del corazón mueren, principalmente por necrosis, y por apoptosis en menor grado, sin que puedan regenerarse. En ese punto de muerte celular se forma una cicatriz de colágeno permanente, dañando la arquitectura cardíaca.

### **Hipertrofia, necrosis y apoptosis del cardiomiocito.**

La mayoría de los tipos de falla cardíaca son precedidas por hipertrofia celular y de cavidades. El desarrollo de la hipertrofia miocárdica representa en un principio, un mecanismo adaptativo al estrés hemodinámico importante. Este proceso está caracterizado por cambios estructurales en los miocitos, que producen alteraciones en las dimensiones y geometría de las cavidades, lo que se conoce como remodelado. El IAM produce alteraciones en la topografía del ventrículo, tanto en el área infartada como en la no infartada.<sup>(9)</sup>

El proceso de remodelado está determinado por tres factores: tamaño del infarto, cicatrización del área infartada y estrés parietal.

Los mediadores neurohormonales y autocrinos / paracrinos de la hipertrofia incluyen la noradrenalina (vía alfa-receptores o beta-receptores), angiotensina II, la endotelina I, los factores de crecimiento fibroblástico, factores de crecimiento B1, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina 1B (IL-1B). Estos agonistas transmiten sus señales a través de proteínas para activar una familia de enzimas como la proteincinasa, las proteincinasas mitógeno activadas que inducen cambios en la expresión genética de proteínas contráctiles y alteraciones en el metabolismo del  $Ca^{2+}$  que modifican la actividad contráctil. La activación de isoformas de proteincinasas estimulan la hipertrofia que lleva a la miocardiopatía fibrótica.<sup>(9)</sup>

Por lo tanto, la hipertrofia no es simplemente una manifestación de incremento de proteínas contráctiles, sino que se asocia con cambios en la expresión genética que llevan a alteraciones en la función contráctil.

Además de la activación neurohumoral, se estimulan un número de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-1B). Estas provocan inflamación miocárdica mediada por reacción autoinmunitaria, necrosis y apoptosis, intensificando la disfunción cardiaca.<sup>(9)</sup>

**Necrosis.** La necrosis miocárdica puede ocurrir por isquemia grave (lo habitual) y por procesos inflamatorios (menos frecuente). La primera suele ser única y de tamaño importante, dependiente de la arteria de cuya obstrucción depende. Las necrosis inflamatorias son de un tamaño mucho menor y siempre múltiples. Las necrosis isquémicas comúnmente se producen en el ventrículo izquierdo y debido a la escasa o nula circulación perilesional, son de reparación lenta. En consecuencia, las alteraciones eléctricas que se producen persisten por lapsos variables, pero siempre prolongados.<sup>(9)</sup>

**Apoptosis del cardiomiocito.** Un componente muy importante en el proceso de remodelado y de la transición desde la hipertrofia adaptativa hacia la falla cardiaca es la apoptosis. Este programa genético es estimulado por una gran variedad de factores, que incluyen hipoxia, incremento de actividad de proteínas G estimuladas por activación de alfa y beta receptores, angiotensina II (AG II), TNF- $\alpha$ , injuria mitocondrial, sobrecarga miocitaria de Ca<sup>2+</sup>, radicales libres de O<sub>2</sub>; activación de receptores de sarcolema y finalmente la acción de determinadas proteasas (caspasas). El cizallamiento de los sarcomeros resulta en la liberación de AG II desde las células cardiacas, lo cual estimula directamente la apoptosis.<sup>(9)</sup>

## **Aspectos clínicos del Infarto Agudo de Miocardio**

### **Síntomas**

Los síntomas clásicos del IAM consisten en dolor torácico. El dolor tiene intensidad variable; en muchos pacientes es intenso y a veces intolerable. Puede durar desde 30 minutos hasta varias horas. La molestia se describe como una sensación de constricción, aplastamiento, opresión o compresión. El dolor suele ser retroesternal y se difunde a ambos lados de la pared anterior del tórax, con predilección por la mitad izquierda. A menudo se irradia hasta la cara cubital del brazo izquierdo y genera una sensación de hormigueo en la muñeca, mano y dedos. En algunos casos el dolor del infarto comienza en la zona del epigastrio y remeda diversos trastornos abdominales, lo que ocasiona el diagnóstico erróneo de indigestión en vez de infarto. En otros pacientes las molestias se irradian a hombros, miembros escapulares, cuello, maxilar inferior y región interescapular. El dolor por lo común cede con opiáceos, en particular con morfina. se piensa que la angina de pecho y el dolor del AMI nace de terminaciones de nervios en el miocardio isquémico o lesionado pero no necrótico, de este modo, en el infarto agudo la estimulación de fibras nerviosas en la zona isquémica del miocardio que rodea al área central necrótica quizá es la que da origen al dolor. <sup>(11)</sup>

### **Diagnóstico diferencial**

Los criterios de la Organización Mundial de la Salud para diagnosticar IAM exigen la presencia de por lo menos dos de los tres elementos siguientes: antecedente de molestia retroesternal de tipo isquémico, cambios evolutivos en los electrocardiogramas obtenidos de modo seriado, y un incremento y un descenso de los marcadores cardiacos en el suero. <sup>(11)</sup>

### **Diagnóstico electrocardiográfico.**

El electrocardiograma (ECG) es muy sensible para la detección de isquemia e infarto, pero a menudo no posee la capacidad de discriminación suficiente como para diferenciar la isquemia de la necrosis. El ECG permite hacer el diagnóstico de infarto agudo del miocardio en la inmensa mayoría de los casos. Signo de necrosis miocárdica es la aparición de ondas Q anormales. Durante las primeras horas de evolución del infarto, el hallazgo más importante es la elevación del segmento ST-T (lesión subepicárdica) en la fase aguda de la evolución de un infarto en los días siguientes aparecen las ondas Q de necrosis, disminuye la lesión subepicárdica y aparece isquemia subepicárdica (ondas T negativas y simétricas) en el curso de las primeras semanas. <sup>(10)</sup>

En general son suficientes para el diagnóstico de infarto agudo al miocardio, las manifestaciones clínicas y las alteraciones electrocardiográficas, pero deben complementarse con la determinación de las enzimas plasmáticas para asegurar el diagnóstico.

### **Marcadores séricos de daño en el miocardio.**

A medida que los miocitos muestran necrosis, se deteriora la integridad de la membrana sarcolémica y comienzan a difundirse en el intersticio cardiaco macromoléculas intracelulares (marcadores séricos del corazón) para pasar por último a vasos más finos y linfáticos en la región del infarto. <sup>(11)</sup> El dato fundamental es la elevación en la concentración de moléculas plasmáticas y las más frecuentemente estudiadas son:

**Cinasa de Creatinina** (creatine kinase, CK). El incremento de CK sérico es un detector enzimático sensible de IAM. La actividad de la CK rebasa los límites normales en término de 4 a 8 h de haber comenzado el infarto agudo de miocardio y disminuye hasta los límites fisiológicos en un lapso de dos a tres días. <sup>(11)</sup>

**Isoenzimas de CK.** Por electroforesis se han identificado tres isoenzimas de la cinasa de creatinina (MM, BB y MB). A pesar de que en tejidos diferentes del corazón se detectan cantidades pequeñas de la isoenzima CK-MB, se considera que el incremento de la actividad sérica de dicha fracción es consecuencia de IAM. <sup>(11)</sup>

**Mioglobina.** Esta proteína se libera en la circulación de células miocárdicas lesionadas y su presencia se demuestra en término de horas de haber comenzado el infarto. Sin embargo la utilidad clínica de las mediciones seriadas de la mioglobina en IAM es mermada por la duración breve de tal incremento y su inespecificidad; esta última es consecuencia del hecho de que la mioglobina es constituyente del músculo estriado. <sup>(11)</sup>

**Troponinas cardioespecíficas.** El complejo de troponina consiste en tres subunidades que regulan el proceso mediado por calcio de la contracción del músculo estriado, estos son: troponina C, troponina I (TnI) y troponina T (TnT). TnI y TnT están en el músculo cardiaco y el estriado. Varias investigaciones han confirmado la fiabilidad de las nuevas técnicas para detectar lesión del miocardio, y se ha postulado que la medición de TnI y TnT constituye un nuevo criterio diagnóstico de IAM. <sup>(11)</sup>

## Tratamiento

El objetivo principal del tratamiento del infarto agudo del miocardio es evitar la muerte del enfermo, evitar la necrosis del miocardio isquémico en riesgo y la extensión del mismo, evitar la aparición de complicaciones o dar tratamiento a ellas si ya se han presentado. Está bien establecido que la mayoría de las muertes por infarto del miocardio ocurren dentro de la primera hora del inicio y que la causa habitual es la fibrilación ventricular. De ahí la importancia del transporte inmediato del paciente a un hospital.

## Medidas generales

**Analgesia.** El alivio del dolor y la ansiedad sigue siendo un elemento esencial en el cuidado del paciente con IAM. El enfoque para el tratamiento del dolor consiste en aliviar la isquemia y atacar el dolor directamente. El tratamiento anti-isquemia consiste en reperfusión, betabloqueantes, nitratos y administración de oxígeno. Los analgésicos narcóticos alivian el dolor no solo de manera directa sino también de manera indirecta al reducir la estimulación del sistema nervioso simpático y la secreción de catecolaminas, lo que disminuye el consumo de oxígeno y la isquemia. En la mayoría de los casos, la morfina es el fármaco de elección, dado que ofrece analgesia y alivia la ansiedad. <sup>(10)</sup>

**Nitroglicerina.** Se trata de un fármaco anti-isquémico, no solo debido a su capacidad de disminuir la precarga y la poscarga, sino también debido a sus acciones vasodilatadoras de las arterias coronarias. <sup>(10)</sup>

**Aspirina.** El ácido acetilsalicílico resulta eficaz en todo el espectro de síndromes coronarios agudos y en la actualidad es parte integral del tratamiento inicial de individuos con sospecha de infarto agudo. Con este fármaco se intenta bloquear a breve plazo la formación de tromboxano A<sub>2</sub> en plaquetas por inhibición de la ciclooxigenasa. <sup>(11)</sup>

**Oxígeno.** En pacientes con IAM puede aparecer hipoxemia, por lo común por anomalías de la ventilación-perfusión que son secuela de insuficiencia ventricular izquierda. Por esta razón se administra oxígeno vía nasal a estos pacientes. <sup>(11)</sup>

**Bloqueadores de los receptores adrenérgicos Beta.** Los betabloqueantes interfieren en los efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos de las catecolaminas, por lo que reducen el consumo de oxígeno por el miocardio. Los únicos betabloqueantes aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) son el metoprolol y el atenolol. <sup>(10)</sup>

**Trombolisis.** En algunos pacientes se produce espontáneamente la reperfusión (riego sanguíneo), pero en la mayoría de los casos hay oclusión trombótica persistente en tanto el miocardio está en fase de necrosis. La reperfusión oportuna constituye el medio más eficaz para restaurar el equilibrio entre el aporte y la demanda de oxígeno del miocardio. <sup>(11)</sup>

Los trombolíticos recanalizan la oclusión trombótica propia de IAM y la restauración del flujo coronario limita el tamaño del infarto y mejora la función y supervivencia del miocardio. <sup>(11)</sup> Se utilizan cuatro trombolíticos para su uso habitual: estreptocinasa (EC), activador del plasminógeno tisular recombinante (rt-PA), anistreplasa (APSAC) y reteplasa (r-PA). Estos han demostrado limitar el tamaño del infarto, preservar la función ventricular y mejorar las tasas de supervivencia. <sup>(10)</sup>

**Angioplastia coronaria.** Una ventaja importante de la angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP), en el IAM es la capacidad de lograr reperfusión del vaso intacto sin el peligro de hemorragia inherente a la administración de trombolíticos. Con una guía de alambre y un catéter con globo es más fácil cruzar una oclusión total de un trombo fresco; de este modo, la angioplastia con globo guiada con alambre es útil para la reperfusión en dos circunstancias: 1) en vez de trombolíticos, en cuyo caso se le conoce como angioplastia directa o primaria, y 2) como terapéutica coadyuvante junto con los trombolíticos. <sup>(11)</sup>

Es una técnica que consiste en introducir un catéter a través de la arteria femoral, cerca de la ingle, a fin de hacerlo llegar a la arteria coronaria donde se ha producido la obstrucción del flujo sanguíneo por acumulación de grasa o trombos. Cuando se llega a la arteria obstruida, un balón inflable en la punta del catéter, es hinchado a una determinada presión para desbloquear y restablecer el flujo sanguíneo. <sup>(11)</sup>

## Valoración de la función cardiaca.

El aparato cardiovascular abastece a los tejidos de oxígeno y sustratos metabólicos y elimina el dióxido de carbono y otros productos del metabolismo. Para estas funciones es necesario que se integren todos sus componentes (circulación venosa, hemicardio derecho, sistema vascular pulmonar, hemicardio izquierdo, circulación arterial y sangre). La mayor parte (aunque no todas) de las disfunciones circulatorias de origen cardiaco en el adulto es ocasionada por anomalías del hemicardio izquierdo. Por tanto, para evaluar la función cardiaca se valora principalmente la función del ventrículo izquierdo. <sup>(11)</sup>

**Métodos incruentos.** El cateterismo cardiaco y la angiografía selectiva cuantitativa constituyen los recursos tradicionales para evaluar la función del corazón, pero estos métodos cruentos conllevan cierto riesgo y no pueden repetirse en el mismo paciente. Por consiguiente, se han buscado alternativas para evaluar el volumen cardiaco sin penetrar en el organismo. Estas técnicas son necesarias en especial para detectar cambios seriados en la función cardiaca y evaluar los efectos tanto agudos como crónicos de algunas acciones, como son las sustancias farmacológicas y la cirugía cardiaca. Cuatro son los métodos incruentos principales para evaluar la función cardiaca: la ecocardiografía, la angiografía con radionúclidos, la tomografía computarizada ultrarrápida y la resonancia magnética con compuerta. Estos métodos son coadyuvantes de la angiografía con contraste, para medir los volúmenes ventriculares y las dimensiones y de esta manera obtener por medios incruentos un cálculo de los índices de la fase de expulsión. La tensión de la pared se calcula combinando la presión arterial, el radio ventricular y el espesor de la pared. Los cuatro métodos imagenológicos permiten calcular los volúmenes ventriculares sistólico, diastólico y la fracción de expulsión (FE), tanto global como regional. <sup>(11)</sup>

**Fracción de expulsión.** Se llama fracción de expulsión (FE) a la razón o cociente entre el volumen sistólico (SV) del ventrículo izquierdo, que es la cantidad de sangre que se expulsa con cada latido, y el volumen telediastólico (EDV); dando así.  $SV/EDV$ . <sup>(11)</sup>

## **Terapia con células madre en infarto agudo de miocardio.**

A pesar de los avances en el tratamiento de problemas cardíacos, la tasa de morbilidad y mortalidad se mantiene alta a nivel mundial <sup>(12)</sup>. Esta epidemia médica sigue incrementándose, dando por un lado, un número considerable de pacientes que sobreviven después de un infarto del miocardio. La patofisiología post-infarto del miocardio es provocada por la pérdida de cardiomiocitos, debida a la necrosis isquémica aguda y a la incapacidad de los cardiomiocitos restantes para compensar dicha pérdida. <sup>(12)</sup> Así, el concepto de reparación o regeneración de tejido miocárdico vía terapia celular (cardiomioplastia) toma suma importancia como alternativa para tratar de mejorar la calidad de vida de los pacientes.

En la década pasada, muchas de las investigaciones se enfocaron en identificar el tipo celular ideal con la cual se pudiera promover la regeneración del miocardio. Muchos tipos celulares fueron estudiados en modelos animales incluyendo, fibroblastos, mioblastos óseos <sup>(13)</sup>, cardiomiocitos fetales <sup>(14)</sup>, y células progenitoras endoteliales<sup>(15)</sup>. Los resultados con estas células fueron alentadores con apreciables beneficios para la renovación post-infarto del miocardio; aunque ninguno resultó en una definitiva diferenciación fisiológica significativa en la regeneración de cardiomiocitos.

En el año 2002, notables investigaciones sugirieron, por primera vez, que células madre derivadas de medula ósea (células madre hematopoyéticas) podrían tener el potencial de regenerar cantidades significativas de miocardio en ratones después de un infarto inducido <sup>(16,17)</sup>, dando inmenso entusiasmo y subsecuentemente escepticismo en la reparación y regeneración de tejido cardíaco. Más recientemente, la identificación de células madre progenitoras cardíacas residentes ha atraído aun más el interés de los científicos. Estos resultados han impulsado el entendimiento de la biología y fisiología del miocardio y han introducido un nuevo paradigma sobre el corazón como un órgano no-terminalmente diferenciado.

A pesar de la incapacidad del tejido miocárdico para recuperarse adecuadamente después de un daño agudo, la polémica para considerar el tipo celular ideal para la terapia, y la falta de comprensión del mecanismo celular fundamental mediador en la regeneración cardiaca, se mantiene el optimismo que la terapia celular pueda ser suficientemente desarrollada para regenerar efectivamente tejido del miocardio después de un infarto. <sup>(18)</sup>

### **Células madre progenitoras cardiacas.**

Por décadas, el corazón ha sido considerado como un órgano terminalmente diferenciado con capacidad de proliferación limitada. Los cardiomiocitos sufren hipertrofia, poco después hiperplasia, en respuesta al estrés hemodinámico, en contraste con otros tejidos, como lo puede ser el hígado, intestinos, y músculo esquelético. Estos principios de la biología del miocardio recientemente han sido cuestionados y se ha propuesto que se considere al corazón como un órgano parcialmente auto-renovable.

La identificación de células madre progenitoras cardiacas residentes ha puesto, a este concepto, a la vanguardia científica <sup>(19,20)</sup> y sugiere la capacidad del miocardio de mantenerse en homeostasis fisiológico, en cierto grado, por medio de las células madre cardiacas residentes. <sup>(21)</sup> (Tabla 1)

Los estudios hechos por Hierlihy et al <sup>(22)</sup> en 2002 fueron los primeros en identificar la presencia de un tipo de células madre en corazones adultos basados en la capacidad específica de estas células para teñirse con la técnica de Hoechst. Esta técnica fue utilizada en un principio para identificar células progenitoras hematopoyéticas altamente enriquecidas, denominadas “Side Population” (SP), en medula ósea <sup>(23)</sup>. Recientemente, esta metodología ha sido utilizada para identificar células madre progenitoras en otros órganos incluyendo páncreas, pituitaria, testículos, glándulas mamarias, pulmones, hígado, músculo esquelético, y por supuesto, corazón <sup>(24)</sup>. Usando análisis inmunohistoquímico, Hierlihy et al encontraron que tejido miocárdico retenía células SP específicas, capaces de diferenciarse en cardiomiocitos, *in vitro* <sup>(22)</sup>.

En 2003, Beltrami et al describieron detalladamente un conjunto de células madre cardiacas (células c-kit+) encontradas en racimos residiendo entre cardiomiocitos en corazón adulto <sup>(19)</sup>. *In vitro*, las células cardiacas c-kit+ parecen ser clonogénicas, ya que fueron capaces de sufrir auto-renovación y diferenciación a líneas celulares cardiacas (cardiomiocitos, endotelio y músculo liso).

Más importante aún, estas células c-kit+, cuando fueron trasplantadas en corazones de ratón después de un infarto del miocardio, mantuvieron la capacidad de diferenciarse en cardiomiocitos, *in vivo*. En este mismo año, Oh et al emplearon un marcador diferente de células madre, Sca-1, para identificar otra población de células progenitoras cardiacas residentes en corazones adultos. Similarmente, las células Sca-1 fueron capaces de diferenciarse en cardiomiocitos, *in vitro* e *in vivo*, en respuesta a la 5-azacitidina e ischemia del miocardio, respectivamente. <sup>(25)</sup>

Komuro et al estudiaron la eficiencia en el establecimiento y la diferenciación de las células cardiacas SP cuando fueron inyectadas por vía intravenosa a tejido miocárdico de rata <sup>(26)</sup> dañado intencionalmente. Se encontró que células cardiacas SP de rata neonatal eran capaces de establecerse en áreas donde el miocardio estaba dañado y sufrir diferenciación en cardiomiocitos, células endoteliales, células de músculo liso y fibroblastos. Otro marcador potencial de células progenitoras cardiacas, Isl-1, fue recientemente reportado por Laugwitz et al <sup>(27)</sup>. Estas células guardan similar potencial cardiomiogénico *in vitro*, aunque fueron fenotípicamente distintas que las células SP. Sigue en investigación si estas poblaciones de células progenitoras son realmente diferentes entre si, o son las mismas células, pero en una diferente fase en el proceso de diferenciación.

La identificación de células madre progenitoras cardiacas residentes evoca un nuevo entendimiento del mecanismo por el cual el corazón adulto puede mantenerse en homeostasis. Esto aun es una cuestión de debate entre si la homeostasis es mantenida únicamente por células progenitoras endógenas o mediante fuentes extra-cardiacas, células madre derivadas de medula ósea. <sup>(28,29)</sup>

Tabla 1. Sumario de células madre progenitoras cardiacas reportadas. <sup>(18)</sup>

Célula	Marcador de superficie	Expresión genética	Auto renovación	Diferenciación in vitro	Diferenciación in vivo	Especies
SP	Sca-1+, CD31+, CD34-, c-kit-, CD45-, Isl-	Nkx2.5, GATA4, MEF2C, Tie2	Sí	Cardiomiocito, Células endoteliales, Células de músculo liso.	Cardiomiocito, Células endoteliales	Ratón, cerdo, humano
c-kit	Sca-1+, SP+Lin-, CD45-, CD31-, CD34-	Nkx2.5, GATA4, MEF2C	Sí	Cardiomiocito, Células endoteliales, Células de músculo liso.	Cardiomiocito, Células endoteliales, Células de músculo liso.	Ratón, rata, perro, cerdo, humano
Sca-1	CD31+, CD34- Lin-, CD45-, c-kit-	Nkx2.5, GATA4, MEF2C, Tie2	No Determinado	Cardiomiocito	Cardiomiocito	Ratón, perro
Isl-1	Lin-, CD45-, c-kit-, CD34-, CD31-, SP-	Nkx2.5, GATA4	Sí	Cardiomiocito	No Determinado	Ratón, rata, humano

SP, células side population; c-kit, células c-kit; Sca-1, antígeno de células madre 1 (adaptado de Liao R, et al. The Bone Marrow - Cardiac Axis of Myocardial Regeneration. Prog Cardiovasc Dis. 2007 ; 50(1): 18–30.)

### Células madre adultas derivadas de médula ósea

Es sabido que la médula ósea es un excelente reservorio de muchas células madre adultas, y que células madre derivadas de médula ósea han sido empleadas para el tratamiento de trastornos hematológicos. Investigaciones recientes han demostrado que células madre derivadas de médula ósea tienen la capacidad de cruzar fronteras entre líneas celulares y transdiferenciarse en hepatocitos, células endoteliales, músculo esquelético y neuronas con la apropiada estimulación <sup>(30,31)</sup>. Mientras la habilidad de las células madre para diferenciarse en cardiomiocitos se mantiene en controversia, mucho del progreso de las investigaciones en regeneración cardiovascular, en animales y humanos, ha sido logrado mediante el uso de poblaciones de células madre derivadas de médula ósea, incluyendo células madre hematopoyéticas (HSC), células madre mesenquimales (MSC), y células progenitoras endoteliales (EPC).

### **Células Madre Hematopoyéticas (HSC)**

Las HSC pueden ser aisladas de la médula ósea a través de una tipificación selectiva de los receptores de superficie particulares (lineage<sup>-</sup>, c-kit<sup>+</sup>, Sca-1, CD34<sup>lo</sup>, CD38<sup>hi</sup>)<sup>(32,33)</sup>. La habilidad de las HSC para reconstituir el sistema hematopoyético de un paciente mieloablativo condujo a la primera aplicación de células madre adultas hace ya más de tres décadas<sup>(34)</sup>. No obstante, el fracaso de los estudios para probar definitivamente la diferenciación de HSC en cardiomiocitos, *in vitro*, algunos estudios en ratones han demostrado el potencial de las HSC para diferenciarse en cardiomiocitos o células vasculares después de una falla cardíaca, *in vivo*<sup>(35)</sup>.

### **Células Madre Mesenquimales (MSC)**

Dentro del estroma de la médula ósea se encuentra una pequeña población de células no-hematopoyéticas que tienen la capacidad de diferenciarse en células de origen mesenquimal<sup>(36)</sup>. Estas células representan aproximadamente 0.001 a 0.01% del total de la población de células nucleadas de la médula. Las MSC son auto-renovables y pueden desarrollarse *in vitro* usando técnicas estándar de cultivo celular.

Inmunofenotípicamente, las MSC carecen de antígenos hematopoyéticos típicos (CD45, CD34, CD14), pero expresan moléculas de adhesión específicas (ALCAM/CD44) y otros antígenos (SH2/SH3/SH4/STRO-1)<sup>(37)</sup>. En un principio, se pensó que las MSC contribuían solamente a la formación del microambiente del estroma de la médula ósea y que mantenía las funciones y la supervivencia de las HSC. Subsecuentes estudios dieron a conocer que las MSC por si mismas tiene la capacidad de ser multipotenciales, y diferenciarse en osteoblastos, neuronas, músculo esquelético y cardiomiocitos<sup>(30,38,39)</sup>.

## Células Progenitoras Endoteliales (EPC)

Las células progenitoras endoteliales (EPC) representan un subtipo de células madre hematopoyéticas. Las EPC expresan los marcadores de células madres hematopoyéticas CD133, CD34 y el marcador endotelial Flk-1 (VEGFR-2). Las EPC pueden ser aisladas directamente de la médula ósea o de sangre periférica y desarrollarse, *in vitro*.<sup>(40)</sup>

## Nichos de células madre

El concepto de nicho hace referencia a un microambiente, donde las interacciones entre moléculas de adhesión y sus respectivos ligandos, así como citocinas, quimiocinas y sus correspondientes receptores dirigen el destino de las células madre y su progenie. En la médula ósea adulta, los osteoblastos son componentes críticos para mantener la auto-renovación de las HSC, la propiedad esencial para la hematopoyesis. Mecanismos intrínsecos y extrínsecos definen el estado en el que la célula puede encontrarse. Los mecanismos intrínsecos incluyen factores de transcripción y reguladores epigenéticos actuando a través de remodelación de cromatina. Los mecanismos extrínsecos son dictados por el ambiente estromal y los osteoblastos. Algunas quimiocinas son responsables para el establecimiento de las HSC en el nicho. La interacción física directa entre las HSC y el nicho celular esta mediado por moléculas de adhesión, tales como integrinas y caderinas.<sup>(40)</sup>

Citocinas secretadas localmente definen el curso que tomarán las HSC por medio de la activación de mecanismos de señalización específicos entre las células. Los ejemplos más notables son el factor de células madre (SCF), el ligando flt3, angiopoyetina, ligandos Notch y ligandos wnt, los cuales en conjunto actúan de manera sinérgica.<sup>(40)</sup>

(Figura 5)

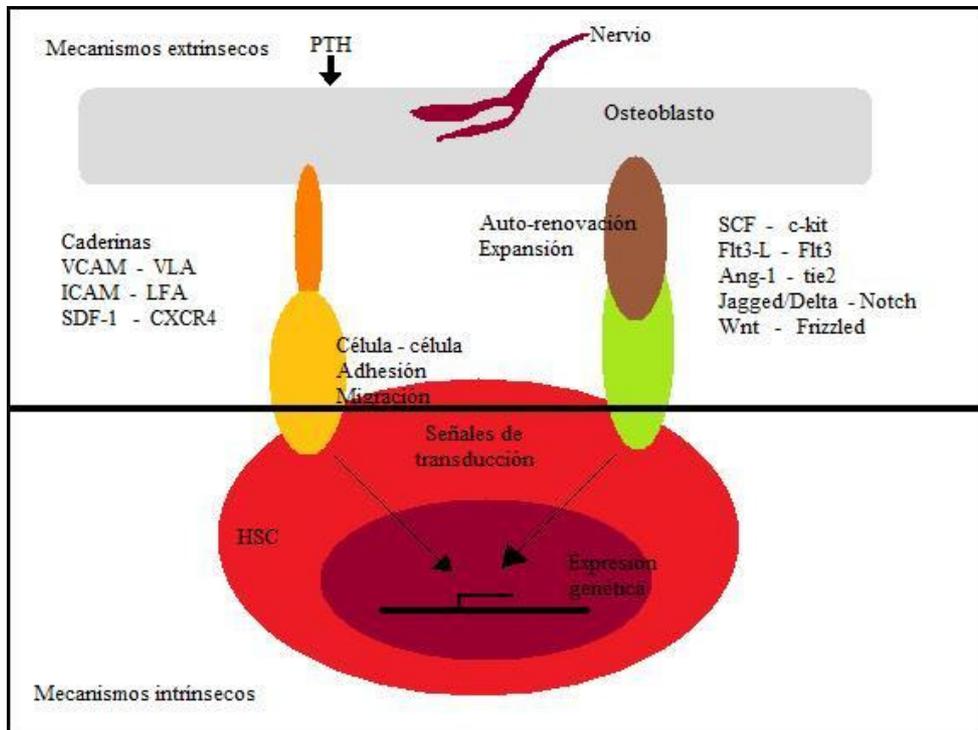


Figura 5. Representación grafica de los mecanismos extrínsecos e intrínsecos en el nicho iniciados con la interacción funcional de la hormona paratiroide (PTH) y el sistema nervioso con los osteoblastos, el establecimiento de HSCs en respuesta a la quimiocinas (SDF-1, factor de derivación estromal 1), la interacción física que incluye a las caderinas e integrinas (VLA); y regulación del estado de las HSC, autorrenovación y expansión por acción de citocinas: SCF, factor de células madre; ligando Flt3 (Flt3-L), angiopoyetina-1 (ang-1), ligando notch (jagged y delta) y ligando wnt. Seguida por la señalización de los receptores y comenzando así la expresión de genes. (Adaptado de Haematopoietic stem cell transplantation. The EBMT handbook. J. Apperley, E. Carreras. 2008)

### Movilización de células madre de médula ósea y su establecimiento en miocardio isquémico

A pesar de la existencia de células madre progenitoras cardiacas, la capacidad endógena de regeneración es insuficiente para mediar en la reparación después de una falla cardíaca severa. Así, la habilidad del miocardio dañado para reclutar células madre extra-cardiacas seguido de un daño es crítico para ayudar en la reparación y regeneración del tejido. <sup>(18)</sup>

Al menos tres son los componentes importantes en la regulación de esta complicada orquesta, el miocardio dañado, la médula ósea y la circulación periférica.

El miocardio dañado es el responsable de enviar señales vía sangre periférica para la movilización de células madre extra-cardíacas del mayor reservorio, la médula ósea, hacia circulación periférica. Después de movilizadas las células, son capaces de seguir señalizaciones específicas, subsecuentemente salen de circulación, y migran hacia el sitio dañado para iniciar el proceso de reparación del tejido (figura 6).

Estas tres partes involucradas en la movilización y establecimiento deben de trabajar conjuntamente para lograr una significativa y funcional reparación y regeneración del tejido mediada por células madre. <sup>(18)</sup>

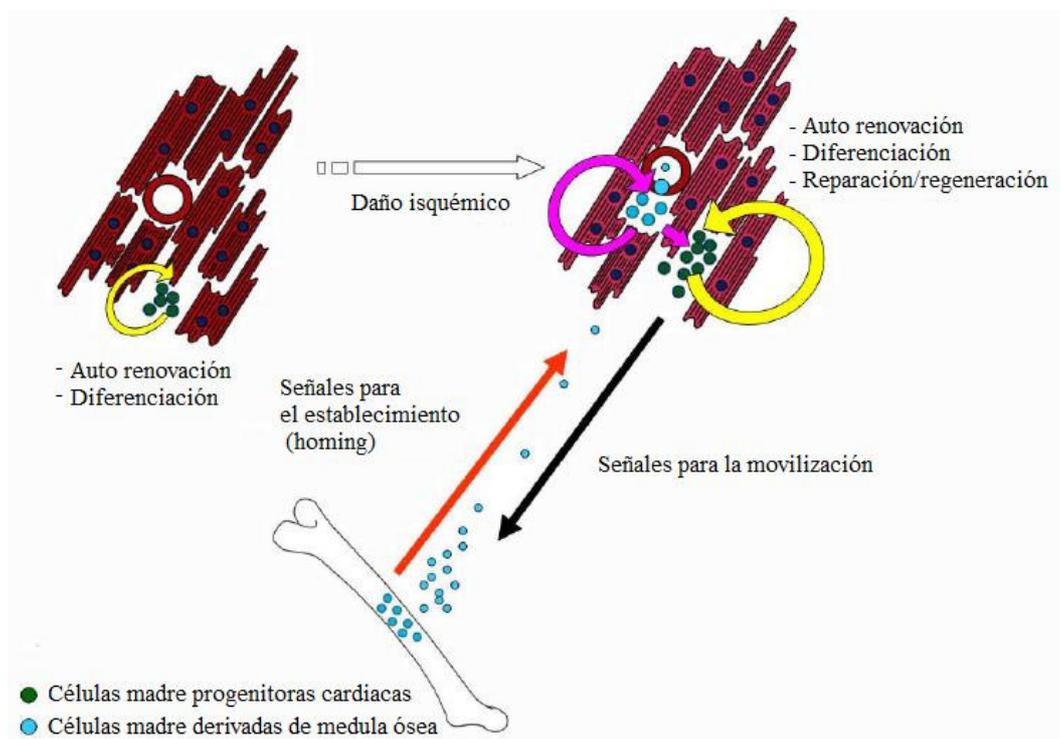


Figura 6. Representación esquemática de la reparación miocárdica mediante células madre. Señales de movilización y establecimiento deben de trabajar de forma integrada entre el miocardio, sangre periférica y médula ósea para lograr la regeneración y la reparación funcional significativa. (adaptado de Liao R, et al. The Bone Marrow - Cardiac Axis of Myocardial Regeneration. Prog Cardiovasc Dis. 2007 ; 50(1): 18–30.)

Se ha demostrado que existen factores cruciales que promueven la movilización de las células madre derivadas de médula ósea hacia circulación periférica, tales como factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos/ macrófagos (GM-CSF), factor de células madre (SCF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y eritropoyetina (EPO) <sup>(42)</sup>. Se sabe que la isquemia del miocardio induce movilización de G-CSF<sup>(43,44)</sup>, SCF<sup>(43,44)</sup>, VEGF<sup>(44,45,46)</sup>, SDF-1<sup>(43-46)</sup> y EPO<sup>(47,48)</sup>, estas citocinas parecen ser las responsables del establecimiento de las células madre derivadas de médula ósea después de un infarto del miocardio.

SCF, ligando para c-kit, es un receptor expresado en células madre incluyendo células madre cardiacas residentes. Al igual que G-CSF y GM-CSF, SCF es un factor hematopoyético que regula la proliferación, diferenciación y supervivencia de células madre derivadas de médula ósea.<sup>(49,50)</sup>

SDF-1, y su receptor CXCR4, son componentes importantes en la regulación de la movilización de células madre hacia el miocardio dañado. Se ha demostrado que la inhibición de SDF-1/CXCR4, mediante la neutralización con anticuerpos, retarda la movilización de células madre <sup>(51)</sup>.

Se sabe que la isquemia del miocardio induce producción de citocinas y moléculas de adhesión, causando movilización de células madre provenientes de médula ósea, como son células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas y células progenitoras endoteliales hacia el sitio de la lesión por medio de un proceso llamado “establecimiento” (homing) <sup>(52-54)</sup>. De entre las citocinas y quimiocinas producidas en respuesta al IAM, se encuentran el factor de derivación estromal (SDF-1 $\alpha$ ), tenascina C, fibronectina, molécula-1 de adhesión celular vascular (VCAM-1), laminina, y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Esta última particularmente responsable de la movilización de las diferentes células madre de médula ósea <sup>(55,56)</sup>.

Todos estos factores liberan proteasas que parten las moléculas de adhesión para así ayudar a las células a disociarse de la matriz de la médula ósea. <sup>(57)</sup>

Las células madre mesenquimales usan integrina  $\alpha 4/\beta 1$ , integrina  $\alpha 5/\beta 1$ , y CD29 para migrar hacia el miocardio isquémico. Pero la producción endógena de todos estos factores no son suficientes para obtener beneficios terapéuticos significantes. <sup>(52)</sup>

Por esta razón, diversos métodos terapéuticos han sido usados para aumentar y promover la movilización endógena de células madre. El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) aumenta la liberación de metaloproteinasas-9, neutrófilo elastasa y catepsina G. Estas proteasas cortan a las moléculas de adhesión en el estroma de la médula ósea y facilitan así la movilización de células madre hematopoyéticas, monocitos y macrófagos hacia sangre periférica.<sup>(58)</sup> G-CSF actúa a través de la vía SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 para movilizar diversas células madre.<sup>(86)</sup> Pero el riesgo de una seria complicación, como lo es una restenosis de las arterias coronarias, limita su uso.<sup>(87)</sup>

No obstante, los últimos beneficios obtenidos de la terapia moduladora de la movilización de células madre endógenas esta aun muy lejos de las expectativas.<sup>(59)</sup> Los resultados desalentadores de las terapias de movilización han establecido la necesidad del trasplante de células madre.<sup>(60)</sup> (figura 7)

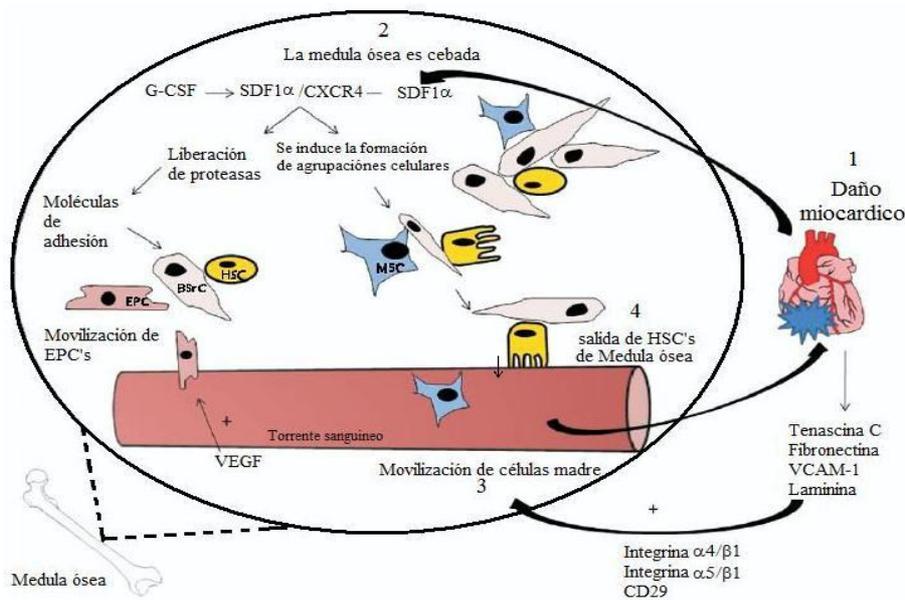


Figura 7. Movilización de células madre de médula ósea y establecimiento en miocardio isquémico. Después del evento isquémico inicial (1), la médula ósea es cebada (2) por el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y por el factor de derivación estromal (SDF-1 $\alpha$ ), causando la liberación de proteasas granulocíticas y la formación de agrupaciones celulares, las cuales provocan la salida de células progenitoras endoteliales (EPC) y células madre hematopoyéticas (HSC). Al mismo tiempo, la movilización de células madre ocurre a través de integrinas (3). Estando ya en circulación sanguínea (4), las células llegan al tejido afectado. BSrC, células estromales de médula ósea; CXCR4, quimiocina (C-X-C motif) receptor 4; MSC, célula madre mesenquimal; VCAM-1, molécula-1 de adhesión celular vascular; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular. (Adaptado de Nathan M Novotny, et al. Stem Cell Therapy in Myocardial Repair and Remodeling. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2008.04.013.)

## **Mecanismos de acción de las células madre en la terapia regenerativa de miocardio**

Se ha propuesto que la terapia de células madre pudiera actuar a través de alguno de los siguientes mecanismos: diferenciación en cardiomiocitos, fusión de las células trasplantadas con cardiomiocitos residentes del paciente y efectos paracrinos.<sup>(61)</sup>

### **Diferenciación en cardiomiocitos**

Recientes estudios indican la posibilidad de división de cardiomiocitos en adultos<sup>(62,63)</sup>. Estas investigaciones mostraron que una fracción significativa de cardiomiocitos, en corazón de rata adulta, disminuían la actividad en la telomerasa y se apreciaba el acortamiento de la longitud del telomero asociados con el recambio de miocitos. Esto sugiere que la existencia de la división de cardiomiocitos juega un rol vital en la restauración de la función cardiaca normal. Corazones post-infartados de pacientes mostraron un marcado incremento del número de miocitos en el borde de la zona isquémica una semana después del infarto.<sup>(64)</sup>

El crecimiento celular por si solo no puede compensar la pérdida de cardiomiocitos ni el daño provocado luego de un infarto de miocardio, así también la proliferación celular ocurre solo en la buena reperusión de la zona infartada.<sup>(65)</sup> Pero el origen de los precursores de miocitos cardiacos esta aun por determinarse. Ellos pueden originarse de células madre cardiacas residentes o de células madre circulantes que se dirigen al corazón después del infarto. El daño del órgano y el alto nivel de células madre en circulación son dos importantes factores que influyen en la transdiferenciación de dichas células en distintos sitios.<sup>(66)</sup>

Mecanismos de señalización, incluyendo G-CSF y proteína jagged-1, son utilizados por el microambiente miocárdico dañado para estimular a células madre para diferenciarse.<sup>(67)</sup> También se ha observado que el contacto célula con célula esta implicado en este mecanismo de diferenciación.<sup>(68)</sup> (figura 8).

Interesantemente, células  $\text{Lin}^- \text{c-kit}^+$  al igual que células derivadas de médula ósea, pueden reconstituir miocardio de ratón in vivo. <sup>(16,58)</sup> G-CSF incrementa el reclutamiento de monocitos y células  $\text{c-kit}^+$  derivadas de médula ósea o macrófagos, que se diferencian en miofibroblastos en la zona infartada. <sup>(59,60)</sup> G-CSF también aumenta la diferenciación cardiomiocítica de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea. <sup>(59,61)</sup>

Fibroblastos cardiacos y cardiomiocitos maduros, que se encuentran en el borde de la zona isquémica, forman nuevos cardiomiocitos. La reperfusión luego de la isquemia, eleva la transcripción de actina de músculo liso y es responsable de la diferenciación de fibroblastos cardiacos en miofibroblastos. <sup>(66)</sup>

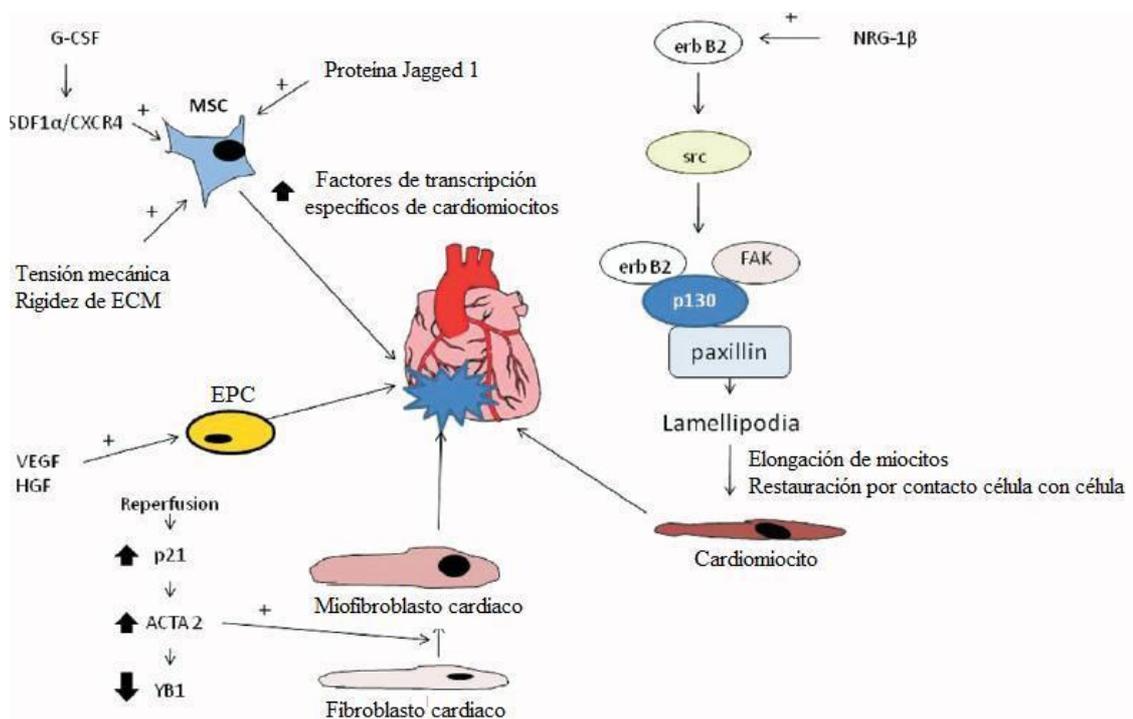


Figura 8. Mecanismos de diferenciación celular. En este diagrama se representa a los mecanismos de respuesta de cada tipo celular que se movilizan al tejido isquémico en el corazón: MSC, EPC, fibroblastos cardiacos y cardiomiocitos. Acta2, actin alpha 2; CXCR4, quimiocina (C-X-C motif) receptor 4; EPC, célula progenitora endotelial; G-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos; HGF, factor de crecimiento de hepatocitos; MSC, células madre mesenquimales; NRG-1β, neuregulin-1β; SDF-1α, factor derivado estromal-1α; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; YB1, proteína de unión Y-box. (Adaptado de Nathan M Novotny, et al. Stem Cell Therapy in Myocardial Repair and Remodeling. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2008.04.013.)

## **Fusión de células madre trasplantadas con cardiomiocitos residentes**

Algunas investigaciones sugieren que la expresión de marcadores proteínicos cardiacos dirigen hacia fusión celular en vez de un proceso de diferenciación. Se piensa que los genes de las células trasplantadas pudieran compensar la pérdida de material genético de las células residentes afectadas durante el daño isquémico y adoptar el fenotipo de los cardiomiocitos ahí existentes. <sup>(69,70)</sup> El trasplante de células derivadas de médula ósea puede inducir el crecimiento de nervio cardiaco mejorando la función inotrópica del corazón. <sup>(71)</sup> La fusión de células madre con células de Purkinge ha sido también demostrada. <sup>(72)</sup> Estos estudios sugieren que la fusión celular es un importante mecanismo para regenerar tejido después de un infarto de miocardio.

## **Efectos paracrinos**

Se piensa que los efectos benéficos inmediatos de la terapia celular en el infarto de miocardio son mediados a través de acción paracrina. Si bien, muchas células trasplantadas inicialmente injertan en el miocardio hospedero exitosamente, también sufren muerte celular no apoptotica con el paso del tiempo. <sup>(73)</sup>

Las células madre inhiben apoptosis en cardiomiocitos, aumentan la angiogenesis, y salvan miocitos dañados mediante la acción de citocinas y factores de crecimiento producidas por las células implantadas o por el tejido reactivado del hospedero de modo autocrino o paracrino. <sup>(74)</sup> El factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  protege a miocitos cardiacos de daño hipóxico. <sup>(75)</sup> El VEGF incrementa la angiogenesis en la zona próxima al infarto. <sup>(76)</sup> Las células madre trasplantadas modifican la matriz extracelular y promueven favorablemente la remodelación mediante la disminución de la producción de colágena tipo I, colágena tipo III, y metaloproteinasa 1, oponiéndose así a los efectos de los fibroblastos cardiacos, los cuales sobre-expresan las anteriores moléculas. Como resultado, las células madre limitan significativamente la expansión del infarto y la hipertrofia del miocardio mediante reducción de la reactividad de la colágena. <sup>(61)</sup>

## Vías de administración de las células madre

Las rutas potenciales de liberación de células madre en el corazón son varias: inyección intramiocárdica directa durante la cirugía cardíaca abierta, inyección intramiocárdica con catéteres de forma percutánea guiados por fluoroscopia o con técnicas de cartografía electromecánica, administración intracoronaria de las células, movilización de las células de la médula ósea usando agentes farmacológicos que son capaces de estimular la proliferación de estas células en la propia médula ósea y su posterior liberación al torrente sanguíneo. Otras vías hipotéticas en investigación serían la simple administración intravenosa periférica o de forma directa en el sistema venoso coronario a través del seno coronario. Todas estas vías de administración tienen sus ventajas y sus inconvenientes, pero todavía se está lejos de saber cuál es la más ventajosa y adecuada. Quizá todas ellas tengan aplicaciones determinadas según la situación clínica del paciente. En un paciente con infarto agudo de miocardio, la vía intracoronaria sería la más adecuada, o bien la movilización de células madre con fármacos. Sin embargo, lejos de buscar una competencia entre las diferentes formas de administración de las células madre, lo más sensato es complementarlas y usar la más adecuada según las características del paciente y la situación clínica que se quiera resolver. <sup>(3)</sup>

Otro tema en plena fase de investigación es cuál es el momento más adecuado para realizar el trasplante de células madre. Esto tiene una gran importancia en los pacientes con infarto agudo de miocardio. Los datos de experimentación animal indican que el mayor beneficio se obtiene después de la fase inflamatoria del infarto agudo de miocardio y antes de comenzar la fase de necrosis. En los humanos se han utilizado ventanas que van de los 4 a los 15 días postinfarto de miocardio. <sup>(3)</sup>

## Seguimiento de los pacientes que reciben terapia celular

El seguimiento de los pacientes que reciben terapia celular tiene una enorme importancia por dos motivos: para valorar la seguridad y la eficacia de la técnica. En relación con la seguridad, tiene una gran trascendencia conocer el daño miocárdico secundario a la técnica empleada. Los siguientes parámetros pueden usarse para valorar la eficacia: función ventricular global y regional, viabilidad, tamaño del infarto, grosor de la pared infartada, reserva contráctil, perfusión y reserva coronaria.

Las funciones global y regional pueden calcularse con angiografía, ecocardiografía y resonancia cardíaca. Quizá esta última técnica sea la de elección para seguir a estos pacientes, al tratarse de un procedimiento no invasivo, con una alta resolución temporal y espacial y, además, con una alta reproducibilidad. Además, es más precisa que la angiografía y la ecocardiografía para valorar el remodelado, porque no realiza asunciones en relación con la geometría ventricular, que es crucial en los ventrículos distorsionados después de un infarto de miocardio. <sup>(3)</sup>

La viabilidad es otro parámetro de gran importancia en estos pacientes. Puede calcularse con ecocardiografía de estrés con dobutamina a dosis bajas, técnicas de medicina nuclear o mediante resonancia cardíaca con realce tardío con gadolinio. Varias investigaciones han demostrado que el grosor de la pared infartada, calculado por resonancia cardíaca o ecocardiograma, se correlaciona bien con la viabilidad. La reserva contráctil se define como la potencialidad del miocardio para incrementar su contractilidad después de la administración de inotrópicos y se puede determinar monitorizando la respuesta del ventrículo con ecocardiografía o resonancia magnética con administración de dobutamina a dosis bajas (desde 5 a 10-20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ). La tomografía de emisión de positrones y las técnicas de medicina nuclear permiten una estimación muy precisa de la perfusión miocárdica. <sup>(3)</sup>

## **Terapia con células madre derivadas de médula ósea, estudios clínicos pioneros**

En los primeros estudios clínicos, el trasplante intracoronario de células progenitoras adultas después de IAM probaron la factibilidad y seguridad de la aplicación terapéutica de estas células. Adicionalmente, pacientes tratados con esta terapia experimentaron un inesperado incremento en la vascularización, un modesto incremento de la función ventricular izquierda y reducción del remodelamiento patológico, indicando así un efecto benéfico del tratamiento con células madre en las consecuencias post-infarto. <sup>(77,78)</sup> A continuación se hace mención a los primeros y más notables estudios realizados.

La primera experiencia clínica fue reportada por Strauer en el año 2002. Se incluyeron pacientes con IAM reperfundidos exitosamente con ACTP primaria, a los que una semana después de la reperfusión se les administró por vía intracoronaria, células madre derivadas de médula ósea autólogas (del propio paciente). <sup>(79)</sup>

El grupo de Fernández-Aviles incluyó 20 pacientes en donde se evaluó la capacidad regenerativa in vitro y el efecto en la remodelación ventricular post-IAM de la infusión de células madre derivadas de médula ósea. A 6 meses de seguimiento, se encontró una mejoría significativa del volumen sistólico final y de la fracción de expulsión. <sup>(80)</sup>

El estudio clínico "TOPCARE-AMI" (Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction) investigó los efectos de la infusión intracoronaria de células progenitoras circulantes y de células madre derivadas de médula ósea en pacientes con IAM (un tipo celular por paciente, no los dos). La angiografía del ventrículo izquierdo a los 4 meses posteriores, reveló un incremento en la fracción de expulsión y un decremento en el volumen sistólico final. No hubo diferencias considerables entre los dos tipos celulares. Un año después con ayuda de resonancia magnética de alto contraste se demostró un aumento en la fracción de expulsión y ausencia de hipertrofia, sugiriendo así una regeneración funcional de los ventrículos infartados. <sup>(81)</sup>

El estudio clínico, "BOOST" (The Bone Marrow Transfer to Enhance ST-Elevation Infarct Regeneration); aleatorizado, fue diseñado para evaluar si el trasplante autólogo intracoronario de células derivadas de médula ósea podía aumentar la función global

del ventrículo izquierdo en pacientes post-IAM tratados con intervención coronaria percutánea. La fracción de expulsión ventricular izquierda global cambió respecto a la línea base en los 6 y 18 meses de seguimiento. A los 6 meses, hubo un aumento de la función ventricular izquierda sistólica determinada mediante resonancia magnética. Por otro lado, no se observaron problemas adversos provocados por el trasplante. A los 18 meses, el estudio falló al no demostrarse mejoría sostenida de la función ventricular izquierda ni de la fracción de expulsión global ventricular izquierda al comparar los resultados con los de un grupo control de pacientes con IAM sin trasplante de células.<sup>(88)</sup>

El estudio titulado “REPAIR-AMI” (The Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction) investigó los efectos de la infusión intracoronaria de células mesenquimales de médula ósea en la regulación del flujo sanguíneo coronario en pacientes reperfundidos luego de un IAM. El estudio fue diseñado con modalidad de aleatorizado y un grupo de pacientes a los que se les infundió un placebo. Un Doppler intracoronario fue usado para medir el flujo de la arteria coronaria. El flujo fue normal (aproximadamente 90%) en los pacientes tratados con células madre respecto a los pacientes con placebo. Además se observó que en los pacientes trasplantados con células madre no hubo recurrencia de infarto de miocardio ni rehospitalización por alguna falla cardíaca. Estos resultados sugieren que hay beneficios terapéuticos con la infusión intracoronaria de células madre derivadas de médula ósea luego de un IAM.<sup>(83)</sup>

Otro estudio aleatorizado, el estudio clínico “ASTAMI” (Autologous Stem Cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction) no encontró un aumento significativo de la función ventricular izquierda después de 6 meses de la administración de células progenitoras derivadas de médula ósea en pacientes con IAM.<sup>(84)</sup>

Diferencias en el tratamiento y procesamiento de las células, así como las características funcionales de cada tipo celular pudieron haber influido en los resultados de los diferentes estudios clínicos mencionados.<sup>(85)</sup>

La insuficiencia cardíaca post-IAM debido a remodelación ventricular, es un problema que se observa cada vez con mayor frecuencia. Una opción terapéutica novedosa para revertir esta secuela es aumentar la angiogénesis y la regeneración de cardiomiocitos en la zona infartada. Los estudios mencionados anteriormente, han mostrado evidencia de mejoría a través de inyección intracoronaria de célula madre, sin embargo los ensayos clínicos diseñados para evaluar la mejoría de la función ventricular con esta técnica son escasos y ofrecen resultados no muy claros. El incrementar la FE en estos pacientes podría a mediano y largo plazo mejorar la sobrevida.

## *Capítulo III: Objetivo*

### Objetivo General

Estandarización del procedimiento por el cual son obtenidas, procesadas e infundidas las Células Progenitoras Hematopoyéticas derivadas de Médula Ósea Autóloga en pacientes con Infarto Agudo de Miocardio.

## *Capítulo IV: Metodología*

A continuación se detalla el protocolo completo sobre el trasplante autólogo de células progenitoras hematopoyéticas derivadas de médula ósea en pacientes con infarto agudo de miocardio.

Nota: Se incluye el protocolo completo del estudio, sin embargo para los fines de esta tesis los resultados se limitan a la estandarización del método más no a los resultados del estudio clínico completo.

## Selección de los pacientes

1.- Población objetivo: adultos de cualquier género con IAMCESST

2.- Población elegible: adultos con IAMCESST que ingresen a la unidad coronaria del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

3.- Criterios de inclusión:

- ❖ Adultos, ambos géneros; 20 a 75 años de edad.
- ❖ Diagnóstico de IAMCESST con < 24 hrs. de inicio de síntomas, reperfundidos exitosamente con ACTP primaria e implante de Stent y con una PE < 45% medias por ventriculografía postcateterismo y/o ecocardiograma.
- ❖ Firma del consentimiento informado.

4.-Criterios de exclusión:

- Infarto con onda Q.
- Choque cardiogénico.
- Sospecha o evidencia de complicación mecánica del infarto.
- Tratamiento en las 4 semanas previas con cualquier fármaco en investigación.
- Uso actual de fármacos antineoplásicos y/o inmunosupresores.
- Historia de cáncer en los últimos 5 años.
- Hemopatía maligna previa (leucemia, linfoma).
- Insuficiencia renal conocida con creatinina > 2.6 mg/dL.
- Accidente vascular cerebral de cualquier tipo en el último año.
- Cualquier enfermedad que pueda afectar la sobrevida del paciente durante la duración del estudio.

#### 5.- Criterios de eliminación:

- Solicitud de alta voluntaria.
- Reinfarto y/o complicaciones durante el procedimiento.
- Imposibilidad técnica para obtener suficiente aspirado de médula ósea y/o CPH.

#### 6.- Técnica de selección y asignación:

Selección.- Dado que en la Institución no se cuenta con una población finita de estos pacientes, se realizará un muestreo no probabilístico secuencial.

Asignación.- Cada paciente será asignado a un grupo control o grupo de médula ósea de manera aleatoria simple, empleando la tabla de números aleatorios. Se realizarán bloques balanceados para evitar que un brazo tenga mayor número de pacientes.

## Desarrollo

### I. Cumplir con los criterios de selección.

### II. Obtención de CPH.

- Se realiza la extracción de células madre a las 7:00 h en una sala de hemodinamia del INCICH. Se comienza el procedimiento bajo sedación consciente y analgesia, utilizando una vía periférica o catéter central. Durante el procedimiento el paciente está vigilado con monitores de la TA, ECG y saturación de O<sub>2</sub>
- Previo al inicio de la extracción, se administra al paciente 0.5 cc de heparina no fraccionada al 1% por cada 10 Kg. de peso corporal vía intravenosa.

- Se prepara en un “riñón” una solución con 100 cc de solución fisiológica mas 1cc de heparina no fraccionada al 1% sin conservadores.
- Se prepara así mismo, una bolsa transfer de 100 cc a la que se añade 10 cc de solución fisiológica y 1 cc de heparina no fraccionada al 1 % sin conservadores a través de un sampler previamente colocado a dicha bolsa.
- La extracción de médula ósea se realiza mediante punciones repetidas de cresta iliaca posterior, previa asepsia y antisepsia de la piel con isodine, con una aguja de punción conectada a una jeringa de 200 cc. En una punción se aspira aproximadamente 5 cc de médula ósea. Después de cada punción-aspiración, la aguja con la jeringa se enjuaga en el riñón con la solución fisiológica y heparina para su reutilización. Este procedimiento se repite hasta obtener entre 50 y 70 cc de médula ósea.
- Una vez terminado el procedimiento, se limpia la zona de la punción con isodine y se coloca un apósito
- Posteriormente, la bolsa de médula ósea es trasladada en fresco al Centro Nacional de la Trasfusión Sanguínea (CNTS) para su procesamiento y separación de las Células Progenitoras Hematopoyéticas mediante la siguiente metodología.

A continuación se muestra el protocolo de separación de células mononucleadas a partir de médula ósea utilizando un gradiente de densidad con Ficoll® con el kit CS-900 en el sistema automatizado Sepax® S-100 de Biosafe (ver Anexo ).

a) Recolección de la muestra:

- La muestra de médula ósea la debe realizar un médico entrenado y en un quirófano que cumpla con las especificaciones de limpieza.
- El volumen a recolectar debe estar entre 80 a 120 mL en bolsa. Esta muestra debe estar filtrada para evitar el paso de grasa o restos de hueso en el sistema de separación.
- La muestra debe llegar al Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea dentro de las dos primeras horas luego de su recolección y a temperatura ambiente, con una solicitud expedida por el centro de trasplante indicando resumen clínico del paciente, datos demográficos para procesamiento de CPH, así como el consentimiento firmado.

b) *Material, Equipos y Reactivos:*

- Kit Sepax CS-900 de separación celular.
- Bolsa de 500 mL de solución salina isotónica (SSI) estéril.
- Gradiente de densidad de 1.077 g/cm<sup>3</sup> (Ficoll®) estéril.
- Albúmina humana al 25 % o 20 % estéril.
- Equipo Sepax® S-100 de Biosafe (con versión "Ficoll® V100" incluida).
- Campana de Bioseguridad clase II.
- Jeringas de 3, 5, 20 y 60 mL.
- Aguja del número 18 (rosas) y 21 (verdes).
- Gasas y cloruro de benzalconio al 0.13 % (merthiolate blanco)
- Tijeras.
- Bolsa transfer de 75 o 150 mL estéril.
- Pinzas de rodillo.

- Sellador dieléctrico HEMATRON III de Baxter ®.
- Plumón indeleble.
- Guantes de látex; gradilla para criotubos.
- Tubos Eppendorf y criotubos de 1.5 mL estériles con tapón de rosca.
- Agitador armónico.

c) Cálculo del volumen de médula ósea:

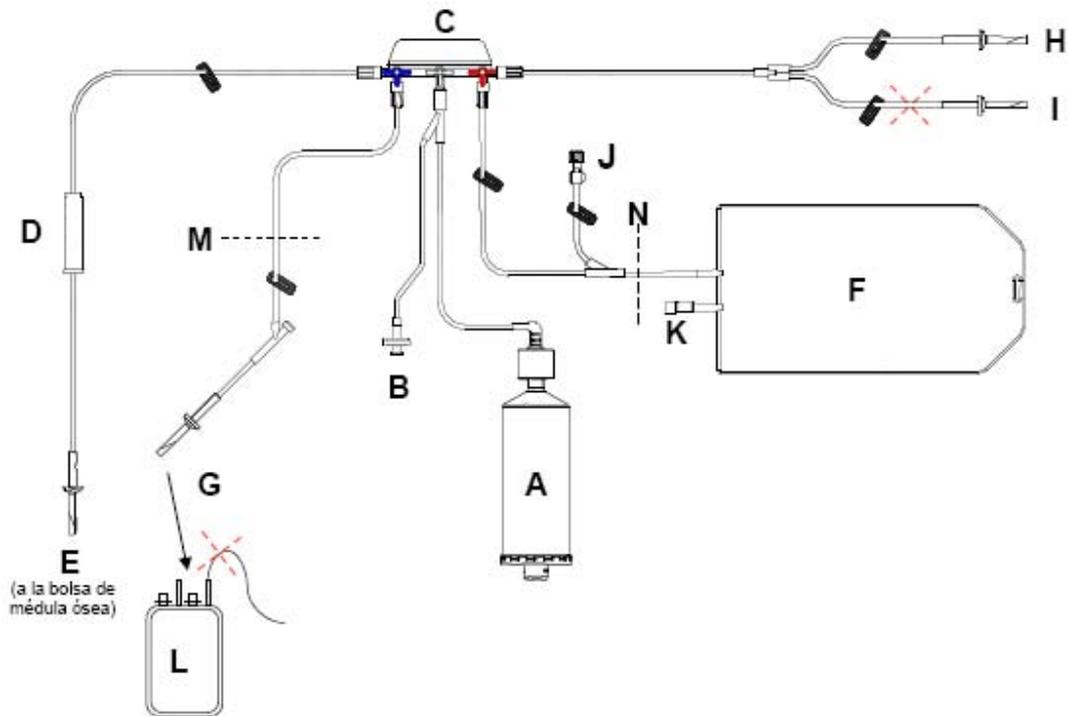
- se ingresa la información en la base de datos, para obtener etiquetas y rotular documentos, tubos, bolsas y microbiológicos.
- se prepara la campana de bioseguridad con albúmina, Ficoll®, bolsa transfer, kit sepax® CS-900, SSI estéril, gasas, merthiolate, tijeras y gradilla con dos tubos eppendorf (BH inicial y final) y un criotubo (cultivos clonogénicos), perfectamente rotulados, frascos aerobio y anaerobio para cultivos microbiológicos.
- se sella y corta la línea con filtro de la MO. Se identifica esta bolsa con plumón indeleble.
- se pesa la bolsa y se calcula el volumen con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen total} = \text{Peso de la bolsa (g)} - \text{Tara} / 1.022 \text{ g/mL}$$

- se homogeneiza la bolsa con médula ósea, se aseptiza y se toma 0.5 mL de muestra con jeringa de 3 o 5 mL y con aguja verde. Colocar en tubo eppendorf para biometría hemática inicial y citometría de flujo.

d) Programación del equipo automatizado Sepax®.

e) Preparación del kit SEPAX CS-900 de separación.



Esquema representativo del kit CS-900 de separación. , significa sellar.

Donde:

A: Cámara de separación 220 mL.

B: Línea de presión con filtro.

C: Soporte de los rotors de stopcock.

D: Cámara de bulbo para purga.

E: Línea con bayoneta para entrada a la bolsa principal de MO.

F: Bolsa de recolección de PVC de 1000 mL; de manera inicial, se pondrán 100 mL de Ficoll®; de manera final, es la bolsa de desechos.

G: Línea con bayoneta donde se colocará la bolsa transfer de 150 mL.

H: Línea con bayoneta para colocar la solución de lavado (buffer de albúmina al 2.5 %).

I: Línea con bayoneta para colocar la bolsa con medio de cultivo (opcional).

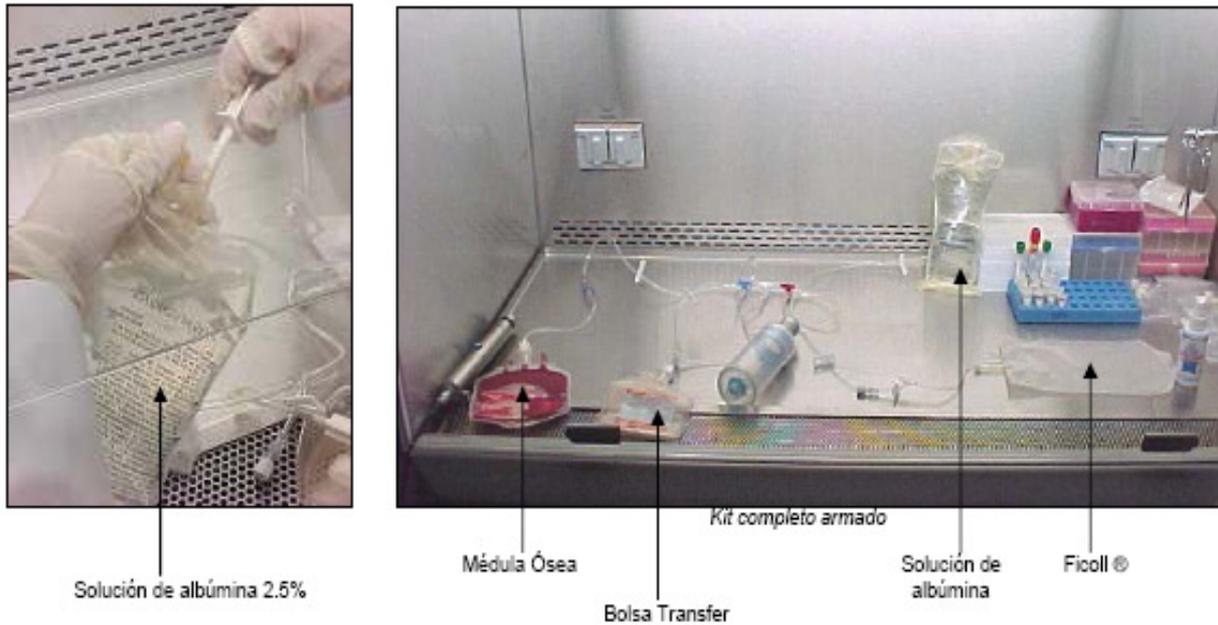
J: Entrada tipo lúer para jeringa.

K: Sampling de la bolsa de recolección (para hacer control microbiológico al final del proceso)

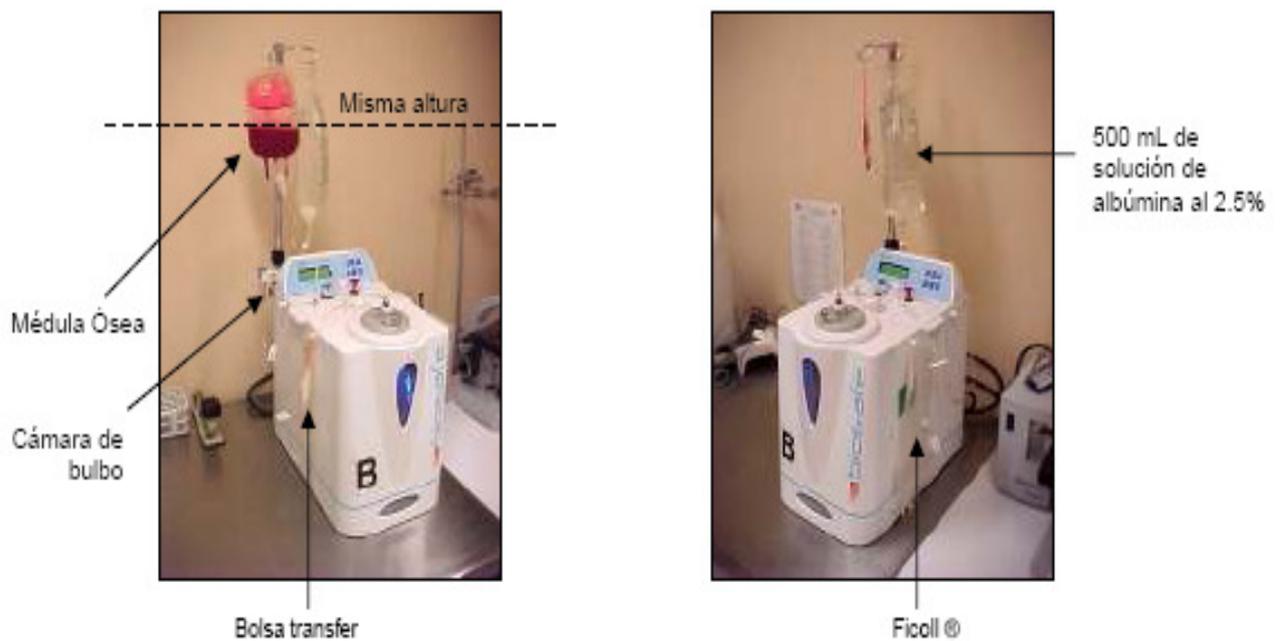
L: Bolsa transfer de 75 o 150 mL.

f) Preparación del amortiguador de albúmina al 2.5 %

El objetivo de usar la solución de lavado con albúmina es simplemente para evitar la adherencia celular en los materiales que se vayan a utilizar.



g) Instalación del kit completo en el equipo de separación SEPAX



El tiempo aproximado del proceso es de 1 hora y 15 minutos.

De la bolsa de CPH (una vez agitada) se toma 1.0 mL de muestra a partir del sampling (previa asepsia), homogeneizando tres veces con la misma jeringa.

Se coloca 0.5 mL en tubo estéril (criotubo) para realizar cultivos clonogénicos. Los otros 0.5 mL se colocan en tubo eppendorf para realizar biometría hemática final, CD34+ y viabilidad celular por citometría de flujo.

h) Realización de cultivos microbiológicos

Como parte del control de calidad, se realizan los cultivos microbiológicos aerobios y anaerobios para asegurar que la unidad este estéril.

i) Resultados (en volumen final de 50 mL de la bolsa transfer)

Debido a que es un proceso controlado y totalmente automatizado, los resultados que se obtienen en promedio son los siguientes:

Recuperación de MNC	Recuperación de CD 34+	Viabilidad posterior	Depleción de Granulocitos	Depleción de RBC	Depleción de PLT
56%	88%	98%	88%	99.7%	66%

De esta manera, y a petición del médico, la dosis se ajusta entre  $1.0 \times 10^6$  y  $2.0 \times 10^6$  células en máximo 20 mL de amortiguador.

### III. Inyección intracoronaria de células madre.

- ✓ Se realiza punción de la arteria femoral derecha o izquierda con técnica de Seldinger modificada utilizando un sistema 6 Fr. Se canula la arteria responsable del infarto utilizando un catéter guía correspondiente (JI, JR, etc.). antes del primer disparo de control se infunden 200 microgramos de nitroglicerina intracoronaria. Los disparos de control se harán en la mejor proyección que determine exactamente la zona del implante del Stent. Posteriormente se avanzará una guía de angioplastia 0.014 tipo CHOICE PT hasta la porción distal del vaso y en este momento se administra una dosis de heparina no fraccionada ajustada al peso del paciente. Una vez colocada la guía de angioplastia, se avanza un catéter balón "over the wire" hasta el sitio del Stent. Se insufla el balón con material de contraste diluido al 50 % a bajas presiones (2-3 atmósferas), se retira la guía de ACTP y en ese momento se comienza la infusión del concentrado de células madre durante 2 minutos, y posteriormente el balón se desinfla durante 1 minuto. Esta operación se repite hasta completar la dosis total de células madre.
  
- ✓ La inyección de CPH, se hace de preferencia el mismo día de la extracción en una sala de hemodinámica del INCICH.

### IV. Evaluación.

#### a) BASAL (previo a la inyección intracoronaria).

- clase funcional, BH, QS, enzimas cardiacas.
- Ventriculografía izquierda y/o Ecocardiograma.
- Gamagrafía cardiaca (SPECT)
- Resonancia magnética con Gadolinio

## b) SEGUIMIENTO

1er y 3er mes: clase funcional, efectos adversos, BH, QS, enzimas cardiacas.

6 meses: clase funcional, efectos adversos, BH, QS, enzimas cardiacas.

- Coronariografía con ventriculografía izquierda.
- Gamagrafía cardiaca.
- Resonancia magnética con Gadolinio

### **Protocolo de resonancia magnética (RM).**

El scanner utilizado en la valoración cardiovascular es un Sonata 1.5 Teslas optimizado para corazón. La exploración se realiza sincronizada con el ciclo cardiaco, y se requieren periodos cortos de apnea.

El estudio se inicia con imágenes localizadores, seguidas de corte ortogonales en los tres planos en secuencia HASTE (half acquisition turbo spin echo) utilizadas como referencia para las adquisiciones de imágenes de alta resolución ponderadas por T2, obteniendo 16 imágenes de único impulso de actividad, por medio de la reconstrucción semi-Fourier.

Para planear las imágenes orientadas al eje ventricular izquierdo, en el localizador axial a la mitad de los ventrículos, se realiza corte longitudinal justo por la mitral y hasta el apex, para obtener una imagen sagital oblicua, que será el eje largo del ventrículo izquierdo. De esta imagen obtenida, se logran tres localizadores en eje corto, uno a través de la válvula, uno intermedio y uno en los músculos papilares, perpendicular a la válvula.

El plano cuatro cámaras se planea sobre los localizadores del eje corto, en la mitad de los ventrículos y se hace colocando una línea a través del centro geométrico del ventrículo y el margen agudo, que es el mas externo del ventrículo derecho, formado por la transición de las paredes diafragmática y libre del ventrículo derecho.

Los ejes cortos se planean en el cuatro cámaras definiéndose por líneas perpendiculares el eje largo ventricular obtenido por la imagen de cuatro cámaras dando ocho imágenes en cine con apnea del paciente de la base al apex.

Para obtener una imagen en 2 cámaras, también se toma como referencia el eje corto localizador, en este caso el corte es paralelo al Septem interventricular y se detiene a través de la válvula mitral.

El análisis morfológico funcional incluye imágenes en cine eco de gradiente en plano 4 cámaras, 5 cámaras, tracto de salida del ventrículo izquierdo y tracto de salida del ventrículo derecho. En cada proyección se captura al menos un ciclo cardiaco (intervalo R-R del electrocardiograma) con una secuencia rápida Turbo-FLASH.

Con la finalidad de valorar la viabilidad miocárdica se administra posteriormente Gadolinio intravenoso (15 mL), adquiriendo imágenes inmediatas en dos cámaras y eje corto denominadas "first pass", en las que se identifica el paso de contraste de cavidades derecha a izquierda y posteriormente se observa la perfusión homogénea del músculo cardiaco. Quince a veinte minutos después de la administración del contraste se adquieren imágenes en cuatro cámaras, eje corto y dos cámaras en secuencia de inversión recuperación, para búsqueda de reforzamiento tardío en relación a necrosis miocárdica, se determina la localización, es decir el segmento involucrado, la extensión y severidad si se trata de afección subendocárdica, no transmural, o transmural. Este método es considerado dentro de los mejores en la determinación de viabilidad miocárdica gracias a la excelente resolución espacial y temporal del método.

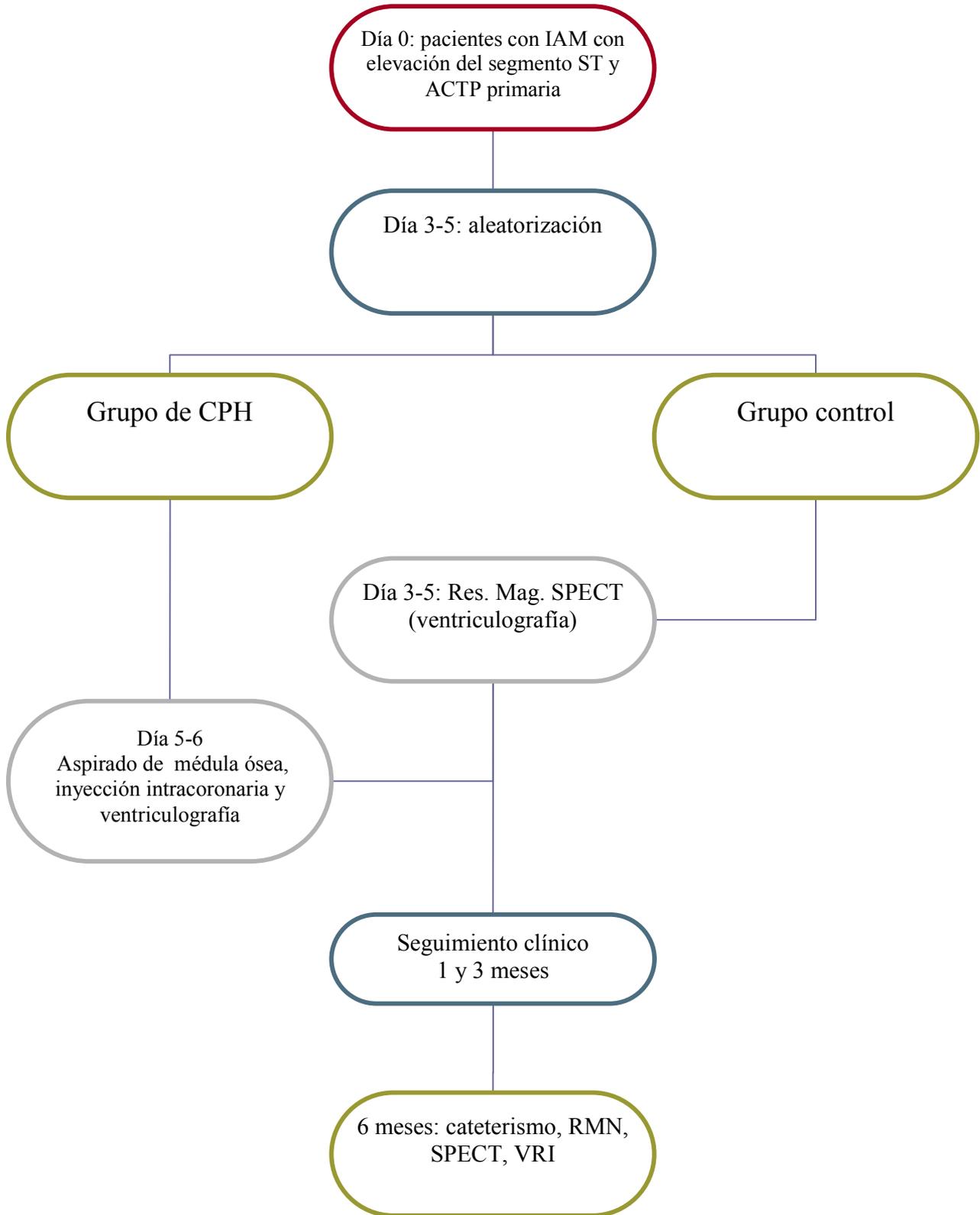
### **Protocolo SPECT (Single Positron Emission Computed Tomography)**

Las adquisiciones con SPECT en reposo y en esfuerzo serán realizadas con una gamma cámara Siemens Orbiter 2000 que tiene un procesador ICON A/P y el programa Gated-SPECT cuantitativo Cedars-Sinai. Se utiliza un colimador multipropósito de baja energía con agujeros paralelos para obtener 32 proyecciones a 30 seg/proyección sobre un arco semicircular de 180° usando un 15 % de ventana cerrada sobre el pico de 140KeV. Todas las imágenes tienen medidas de control de calidad. Se utiliza un protocolo de un día de sestamibi tecnecio-99m. las imágenes de SPECT se obtendrán 45 a 60 minutos después de la administración de 10-15 mCi en reposo y 20-30 mCi después del esfuerzo (relación 1:2) en la posición de decúbito supino. La posición recubito prono se utilizara solamente cuando se observe contaminación o artefactos inferiores. Las imágenes G-SPECT serán obtenidas 30-40 minutos después del esfuerzo en la posición de decúbito supino.

### **Ventriculografía isotópica en equilibrio.**

Para la realización de la ventriculografía en equilibrio se utiliza la técnica de marcado in vitro de eritrocitos con  $^{99m}\text{Tc}$  (ultra Tag- $^{99}\text{Tc}$  Mallinckrodt) en una dosis de 30 mCi; la adquisición de las imágenes se inicia inmediatamente después de ser administrados los eritrocitos marcados. Se adquieren tres proyecciones estáticas (oblicua a 45°, anterior y lateral izquierdas) de ocho minutos cada una, se coloca al paciente en posición supina bajo el detector de radiación gamma con colimador paralelo para baja energía (140 KeV). Se utiliza una gamma cámara General Electric ELGEMS-Millennium MPS.

## Flujograma del trasplante de CPH.



## Capítulo V: Resultados y Discusión

Los resultados que a continuación se muestran corresponden a la estandarización del proceso del trasplante de CPH. Se reportan los datos de tres pacientes implicados en el estudio clínico. Estos se presentan en el respectivo orden conforme el protocolo lo estipula.

I. Los tres pacientes cumplieron con los requisitos de selección. Los pacientes son del sexo masculino, con un rango de edad de entre 48 y 57 años, con diagnóstico de infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST, inicio de síntomas menores a las 24 h, los cuales fueron reperfundidos exitosamente con ACTP primaria. Fueron evaluados médicamente y dictaminados como aptos para incluirse en el estudio clínico.

II. La extracción de médula ósea se realizó en una sala de hemodinamia del INCICH. Los volúmenes obtenidos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Volúmenes totales extraídos de médula ósea y hora de recolección.

Paciente	Volumen de médula ósea	Hora de toma de muestra
1	89.75 mL	8:00 am
2	88.8 mL	8:00 am
3	112.3 mL	7:45 am

En la tabla 2, se indican los datos de la primera biometría hemática (BH inicial) que se realizó. Adicionalmente, con el fin de cuantificar la subpoblación de progenitores hematopoyéticos existentes en el producto de infusión, se lleva a cabo un análisis inmunofenotípico. Se utiliza técnica de inmunofluorescencia directa en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson Biosciences, BDB) para detectar el marcador de superficie CD34<sup>+</sup>.

Así de esta manera se obtienen los valores celulares de cada muestra, antes de ser procesadas y seleccionadas las CPH.

Tabla 2. Valores de biometría hemática inicial y cuenta de células CD34<sup>+</sup> de la muestra de médula ósea.

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
<b>LEU</b>	<b>22.2 x 10<sup>3</sup> / mm<sup>3</sup></b>	<b>14.0 x 10<sup>3</sup> / mm<sup>3</sup></b>	<b>31.0 x 10<sup>3</sup> / mm<sup>3</sup></b>
<b>ERI</b>	<b>2.56 x 10<sup>3</sup> / mm<sup>3</sup></b>	<b>3.86 x 10<sup>3</sup> / mm<sup>3</sup></b>	<b>4.47 x 10<sup>3</sup> / mm<sup>3</sup></b>
<b>HB</b>	9.3 g/ dL	11.7 g/ dL	14.7 g/ dL
<b>HTC</b>	24.4 %	33.6 %	40.9 %
<b>PLT</b>	53 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>	40 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>	90 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>
<b>PTC</b>	0.045 %	0.027 %	0.077 %
<b>VCM</b>	95 μm <sup>3</sup>	87 μm <sup>3</sup>	91 μm <sup>3</sup>
<b>HCM</b>	36.2 pg	30.5 pg	32.9 pg
<b>CCMH</b>	38.1 g/dL	35.0 g/dL	36.0 g/dL
<b>IDE</b>	12.3 %	12.2 %	12.6 %
<b>VPM</b>	8.5 μm <sup>3</sup>	6.7 μm <sup>3</sup>	8.6 μm <sup>3</sup>
<b>IDP</b>	6.8 %	9.9 %	13.0 %
<b>LIN</b>	27.4 % ; 6.0 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>	21.9 % ; 3.0 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>	15.6 % ; 4.8 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>
<b>MON</b>	8.0 % ; 1.7 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>	6.9 % ; 0.9 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>	5.3 % ; 1.6 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>
<b>GRA</b>	64.6 % ; 14.5 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>	71.2 % ; 10.1 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>	79.1 % ; 24.6 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>
<b>CD34+</b>	<b>7.2 x 10<sup>6</sup></b>	<b>5.31x 10<sup>6</sup></b>	<b>3.8x 10<sup>6</sup></b>

En la tabla 3, se indican los valores de la BH final post-procesamiento, el depletamiento de glóbulos rojos y plaquetas. Así también los valores de células CD34<sup>+</sup>.

Tabla 3. Valores de biometría hemática final y cuenta de células CD34<sup>+</sup> de las CPH post-procesamiento.

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
<b>LEU</b>	<b>8.5 x 10<sup>3</sup> / mm<sup>3</sup></b>	<b>4.1 x 10<sup>3</sup> / mm<sup>3</sup></b>	<b>12.5 x 10<sup>3</sup> / mm<sup>3</sup></b>
<b>ERI</b>	<b>0.06 x 10<sup>3</sup> / mm<sup>3</sup></b>	<b>0.04 x 10<sup>3</sup> / mm<sup>3</sup></b>	<b>0.14 x 10<sup>3</sup> / mm<sup>3</sup></b>
<b>HB</b>	0 g/ dL	0 g/ dL	0 g/ dL
<b>HTC</b>	0.5%	0.3 %	1.2 %
<b>PLT</b>	31 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>	17 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>	62 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>
<b>PTC</b>	0.022 %	0.015 %	0.050 %
<b>VCM</b>	0 μm <sup>3</sup>	0 μm <sup>3</sup>	85.0 μm <sup>3</sup>
<b>HCM</b>	0 pg	0 pg	0 pg
<b>CCMH</b>	0 g/dL	0 g/dL	0 g/dL
<b>IDE</b>	0 %	0 %	16.2 %
<b>VPM</b>	7.2 μm <sup>3</sup>	8.5 μm <sup>3</sup>	8.0 μm <sup>3</sup>
<b>IDP</b>	5.3 %	4.5 %	8.1 %
<b>LIN</b>	31.6 % ; 2.6 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>	53.5 % ; 2.2 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>	21.1 % ; 2.6 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>
<b>MON</b>	7.5 % ; 0.6 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>	8.9 % ; 0.3 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>	5.5 % ; 0.6 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>
<b>GRA</b>	60.9 % ; 5.3 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>	37.6 % ; 1.6 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>	73.4 % ; 9.3 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>
<b>CD34+</b>	<b>8.79 x 10<sup>6</sup></b>	<b>7.25x 10<sup>6</sup></b>	<b>4.0x 10<sup>6</sup></b>

Con los datos de leucocitos finales, se procede a calcular el porcentaje de recuperación de las células nucleadas totales (CNT) obtenidas después del proceso de separación celular ya que estas son las que serán infundidas en el paciente. Los resultados se presentan enseguida en la tabla 4. La fórmula para calcularlos es:

$$\% \text{ de Recuperación de CNT} = [(Leu \text{ fin}) (50 \text{ mL}) / (Leu \text{ ini}) (\text{vol de MO})] \times 100$$

NOTA: para la citometría final, el volumen siempre será 50 mL.

Tabla 4. Valores de las células nucleadas totales finales

Paciente	% de recuperación, CNT
1	21.2 %
2	16.49%
3	17.95%

Se considera un rendimiento aceptable si el valor es superior a 15% de recuperación de CNT.

Adicionalmente, se realizan cultivos Hematopoyéticos (clonogénicos). En la tabla 5, se reportan los datos obtenidos del número y tipo de las unidades formadoras de colonias (UFC), también se reporta la eficiencia clonogénica (E-clone) de cada muestra.

Tabla 5. Reporte de cultivos hematopoyéticos.

\* Los límites inferiores permisibles no deben ser menor al 6 % de E-CLONE

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
<b>UFC T / <math>\mu\text{L}</math></b>	35.6	9.05	-
<b>UFC-GM / <math>\mu\text{L}</math></b>	27.9	4.74	-
<b>BFU-E / <math>\mu\text{L}</math></b>	0	0	-
<b>UFC-MIX / <math>\mu\text{L}</math></b>	7.75	4.31	-
<b>E- CLONE</b>	20 %	8.2 %	-
<b>UFC T x <math>10^6</math></b>	63.3	0.452	-
<b>Dictamen de la prueba *</b>	ACEPTADA	ACEPTADA	-

Donde: UFC-T, unidad formadora de colonias; UFC-GM, unidad formadora de colonias de granulocitos-macrófagos; BFU-E, unidad formadora de brotes eritroides; E-clone, eficiencia clonogénica.

III. Concluidas las determinaciones finales, el paquete de CPH de médula ósea es regresado al INCICH para la inyección intracoronaria en el paciente. En la tabla 6, se dan los valores de las dosis infundidas a cada paciente.

Tabla6. Dosis infundidas en los pacientes.

	Dosis
<b>Paciente 1</b>	1.0 x10 <sup>6</sup> células en 15 mL
<b>Paciente 2</b>	2.0 x10 <sup>6</sup> células en 20 mL
<b>Paciente 3</b>	1.6 x10 <sup>6</sup> células en 20 mL

### Seguimiento del primer paciente.

#### Evaluación clínica pre-infusión.

VI. a) La evaluación basal se efectúa previamente a la inyección de las CPH. La información siguiente corresponde al resumen clínico perteneciente al primer paciente en haber completado el protocolo de seguimiento.

Hombre de 54 años de edad.

Síndrome coronario agudo con elevación de segmento ST, infarto de miocardio anterior extenso, angioplastia coronaria transluminal percutánea facilitada, tiempo puerta-balón de 65 minutos, con tiempos de isquemia total de 185 minutos, colocación de Stent Driver a Descendente anterior con flujo final TIMI 2, TMP 2.

Se mantuvo asintomático cardiovascular sin angina o equivalentes anginosos.

Frec. Cardíaca. 78 Imp., Frec. Respiratoria. 18 rpm., T.A. s sistólica 90 mmHg, T.A. diastólica 60 mmHg, Temperatura 37°

El paciente se encontraba conciente y orientado en las tres esferas, tolera el decúbito supino, adecuada coloración de tegumentos, mucosas bien hidratadas, cuello cilíndrico con ingurgitación yugular grado 1, campos pulmonares sin tiraje intercostal, ligeros estertores crepitante finos bibasales, de predominio derecho, ápex palpable en 5º EII a 1 cm de LMCI, con ruidos cardiacos regulares, no ausculto soplos, sin frotos.

Abdomen globoso a expensas de panículo adiposo con peristaltismo presente sin datos de irritación peritoneal con extremidades, pulsos periféricos conservados, sin edema, necrológicamente integro.

Resultados de laboratorio: Hb: 10.7, Hto: 31, Leuc: 8800, Neut: 72.7, Pla: 333 000, TP: 11.8, TTP: 39.7, Gluc: 95, BUN: 9, Sodio: 13, Potasio: 4.2, MB: 0.91, Tpl: 1.49.

ECG: Ritmo sinusal, FC: 80 LPM, AQRS:  $-90^\circ$ , P: 60 ms, PR: 120, QRS: 80, complejos Qs de V1 a V5 con elevación del punto J de 1mm.

Rx: Se sugiere cardiomegalia, signos de hipertensión venocapilar pulmonar, ángulos costodiafragmáticos tienden a desaparecer, aunque no hay línea de Damaso clara. En región parahiliar parece existir zona radiopaca que sugiere tendencia a consolidar.

ECG transtorácico: Hipertrofia concéntrica del ventrículo izquierdo, acinesia del tercio apical de la pared anterior del ápex y del tercio apical de la pared inferior, acinesia del tercio apical de la pared lateral y del tercio apical del septum. Resto de las paredes con hipocinesia ligera.

Función sistólica disminuida con FEVI de 35% por método de Simpson modificado, trastorno de la relajación del VI tipo 1.

### **Evaluación clínica post-infusión.**

b) El seguimiento del paciente a los seis meses del trasplante se resume a continuación, este fue dado por el departamento de hemodinámica del INCAR, Ignacio Chávez.

Previa asepsia y antisepsia de la región inguinal derecha, se procedió a puncionar la arteria femoral derecha con técnica de Seldinger modificada sin complicación alguna, se colocó un introductor 6 Fr y se procedió a realizar angiografía coronaria selectiva con los siguientes catéteres: JR y JL 6 Fr.

Con los siguientes hallazgos:

#### Coronaria izquierda

Tronco. Se observó lesión corta excéntrica en el segmento distal del 24% por angiografía cuantitativa.

Descendente Anterior. Stent permeable con hiperplasia en el segmento proximal y ostial del 30%, resto del stent con hiperplasia difusa del 20%. En el segmento distal de la descendente anterior se observó lesión corta excéntrica del 30%, flujo distal TIMI2.

Circunfleja. No dominante, sin lesiones angiografías significativas, flujo distal TIMI 3

#### Coronaria derecha

Dominante, se observó lesión corta del 30% a nivel de la cruz del corazón, flujo distal TIMI 3.

Presión telediastólica del ventrículo izquierdo: 30 mmHg. Sin evidencia de gradiente en el trazo de retiro transaórtico. Se utilizaron 2500 U de heparina, 50 mL de medio de contraste no iónico.

## Discusión

Los resultados de la obtención, procesamiento e infusión de las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) derivadas de médula ósea del mismo paciente, que ha sufrido infarto agudo de miocardio, sugieren que la técnica es segura y factible. No se presentó ninguna complicación en alguna de las etapas del procedimiento. En la tabla 1, se reportan los volúmenes netos colectados de médula ósea, los volúmenes están dentro del rango establecido de 80 a 120 mL, los cuales son necesarios para obtener un buen rendimiento en las CNT.

Terminada la extracción, se envió la bolsa con médula ósea al Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea para la separación de las CPH. En las tablas 2 y 3 se muestran los datos de la biometría hemática inicial y final, respectivamente. Al comparar ambas tablas, se nota una disminución de los valores celulares, glóbulos rojos y granulocitos, debido a que el proceso es selectivo y se da una depleción de estos. En cuanto a los valores de células CD 34<sup>+</sup>, que es uno de los principales parámetros a considerar, se observa que los valores posteriores al proceso son mayores respecto a los iniciales ya que son las células requeridas y son las que están siendo concentradas.

En la tabla 4, se reportan los porcentajes de recuperación de las células nucleadas totales, los cuáles se encuentran por arriba de 15%, por lo que se consideran aceptables. Este parámetro indica el rendimiento obtenido luego del proceso.

Los ensayos de cultivos de CPH, conocidos como Cultivos Clonogénicos, indicados en la tabla 5, son usados para detectar la capacidad de proliferación y diferenciación, *in vitro*, de las CPH en distintos y sucesivos estadios. Este método es útil para calcular el contenido de progenitores de médula ósea antes o después de una serie de manipulaciones, particularmente procesos empleados como parte del trasplante <sup>(90)</sup>. Además este parámetro se considera un control de calidad interno. Para las muestras 1 y 2 la E-clone, que es el parámetro más importante de este rubro, está por arriba del límite inferior (6%) requerido para considerarse efectiva. En el caso de la muestra 3, no se reportan datos ya que se presentaron problemas con los medios de cultivo y no hubo

crecimiento alguno, aunque esto no quiere decir que la muestra haya sido rechazada, simplemente los valores no están reportados.

Para las dos primeras muestras, son notorias las diferencias en los valores entre una y otra. Los valores del paciente 1 son mayores a los del paciente 2, esto debido a la variabilidad biológica de cada persona, dando que cada colonia de algún tipo celular se comporte de distinta manera en cada paciente.

En la tabla 6, se muestran las dosis de la fracción mononuclear de la médula ósea infundidas. El ajuste en las concentraciones se hace en base a lo que el medico responsable decide. Se reportó que la inyección de CPH se dio satisfactoriamente, no habiéndose presentado alguna complicación en los pacientes.

Se brinda la información del seguimiento del trasplante perteneciente al paciente 1. En la evaluación previa, los datos dados por los médicos del INCICH describen la condición del paciente, es por esta, que se solicitó al CNTS la separación de la CPH derivadas de médula ósea para su posterior inyección intracoronaria autóloga.

La evolución clínica posterior al trasplante del paciente fue satisfactoria. En los seis meses de seguimiento no se observo ningún evento cardiaco

El infarto de miocardio provoca muerte celular y posteriormente cicatrices sin funcionalidad alguna. El objetivo primordial de la cardiomioplastia, es restaurar la estructura cardiaca y recuperar la función por medio de la regeneración de cardiomiocitos funcionalmente competentes. En pacientes con infarto agudo de miocardio, los efectos del trasplante autólogo de células madre de medula ósea han sido puestos a prueba en varios estudios. La mayoría de ellos han demostrado un aumento en la función miocárdica, aunque con resultados cuestionables.

## Capítulo VI: Conclusiones

Se llevó a cabo la metodología completa del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez en colaboración con El Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea. Realizándose cada uno de los puntos a seguir del protocolo y obteniéndose resultados claros y concisos. Las metodologías empleadas, que en conjunto forman al protocolo del trasplante, están basadas en estudios clínicos e investigaciones revisadas y aprobadas internacionalmente. También así, el protocolo de separación de células mononucleadas a partir de médula ósea utilizando un gradiente de densidad (Ficoll®) en el sistema Sepax® de Biosafe, está validado y su uso es común en otros países. Concluyendo que la técnica es viable y tangible.

La terapia con células madre derivadas de médula ósea autóloga en pacientes que han sufrido un infarto agudo de miocardio podría dar lugar a un remodelado favorable y así combatir la insuficiencia cardíaca y otras enfermedades cardiovasculares con esta novedosa técnica.

## Capítulo VII: Bibliografía

1. Velázquez O, et al. Morbilidad y mortalidad de la enfermedad isquémica del corazón y cerebrovascular en México. 2005 archivos de cardiología Vol. 77 Número 1/Enero-Marzo 2007:31-39
2. Espinosa R, Pavia A. Infarto agudo del miocardio. Tratamiento inicial. Acta medica grupo Ángeles. México 2003
3. Fernández F, De la Fuente L. Capacidad regenerativa de las células de médula ósea autólogas después de un infarto agudo de miocardio. Rev Esp Cardiol. 2005;58(Supl 2):27-31
4. Saha M, et al. Cardiac stem cell therapy: present and future. Journal compilation 2006 Blackwell Publishing Ltd
5. Sutton J, Sharpe N. Left ventricular remodeling alter myocardial infarction. Pathophysiology and therapy. Circulation 200;101:2981-2988.
6. Kang H, et al. Stem cell therapy for myocardial infarction. CMAJ, AUG. 31, 2004; 171
7. Ganong F. Fisiología medica. 19ª edición. 2004, El manual moderno, México, D.F. ISBN: 970-729-068-4

8. Guyton A. Tratado de fisiología medica. 11<sup>º</sup> edición. Elsevier España 2006.
9. Mautner B. Cardiología, Basada en la evidencia y la experiencia de la fundación Favolara. Editorial Grupo Guia, 2003. Buenos Aires , Argentina.
10. Robert A. O'Rourke, Valentin Fuster. Hurst, El corazón. Manual de Cardiología. 10<sup>º</sup> Edición McGrawHill.
11. Braunwald E. Tratado de cardiología. 5ta. Edición. McGraw-Hill Interamericana.
12. Braunwald E, Bristow MR. Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circulation* 2000;102:IV14–23. [PubMed: 11080127]
13. Jain M, et al. Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation* 2001;103:1920–7. [PubMed: 11294813]
14. Scorsin M, et al. Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;119:1169–75. [PubMed: 10838534]
15. Kocher AA, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001;7:430–6. [PubMed: 11283669]
16. Orlic D. Adult BM stem cells regenerate mouse myocardium. *Cytotherapy* 2002;4:521–5. [PubMed: 12568987]
17. Orlic D. Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003;996:152–7. [PubMed: 12799293]
18. Liao R, et al. The Bone Marrow - Cardiac Axis of Myocardial Regeneration. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007 ; 50(1): 18–30.
19. Beltrami AP, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114:763–76. [PubMed: 14505575]
20. Martin CM, et al. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* 2004;265:262–75. [PubMed: 14697368]
21. Pfister O, et al. CD31- but Not CD31+ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. *Circ Res* 2005;97:52–61. [PubMed: 15947249]
22. Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG, Rudnicki MA, Megey LA. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett* 2002;530:239–43. [PubMed: 12387899]

23. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996;183:1797–806. [PubMed: 8666936]
24. Asakura A, Rudnicki MA. Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation. *Exp Hematol* 2002;30:1339–45. [PubMed: 12423688]
25. Oh H, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:12313–8. [PubMed: 14530411]
26. Wada H, Matsuura K, Oyama T, Iwanaga K, Takahashi T, Goto T, Nagai T, Komuro I. Homing and differentiation of intravenously transplanted cardiac side population cells in injured myocardium. *Circulation* 2005;111:801.
27. Laugwitz KL, et al. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 2005;433:647–53. [PubMed: 15703750]
28. Quaini F, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002;346:5–15. [PubMed: 11777997]
29. Murry CE, Whitney ML, Laflamme MA, Reinecke H, Field LJ. Cellular therapies for myocardial infarct repair. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2002;67:519–26. [PubMed: 12858578]
30. Ferrari G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528–30. [PubMed: 9488650]
31. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000;290:1779–82. [PubMed: 11099419]
32. Osawa M, et al. In vivo self-renewal of c-Kit+ Sca-1+ Lin(low/-) hemopoietic stem cells. *J Immunol* 1996;156:3207–14. [PubMed: 8617942]
33. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988;241:58–62. [PubMed: 2898810]
34. Goldman JM, Horowitz MM. The international bone marrow transplant registry. *Int J Hematol* 2002;76(Suppl 1):393–7. [PubMed: 12430889]
35. Orlic D, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701–5. [PubMed: 11287958]

36. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6:230–47. [PubMed: 5654088]
37. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999;181:67–73. [PubMed: 10457354]
38. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats—similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3908–13. [PubMed: 9520466]
39. Makino S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999;103:697–705. [PubMed: 10074487]
40. Peichev M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000;95:952–8. [PubMed: 10648408]
41. Haematopoietic stem cell transplantation. *The EBMT handbook*. J. Apperley, E. Carreras. 2008
42. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol* 2002;30:973–81. [PubMed: 12225788]
43. Leone AM, et al. Endogenous G-CSF and CD34(+) cell mobilization after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2006;111:202–8. [PubMed: 16051386]
44. Wojakowski W, et al. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;110:3213–20. [PubMed: 15533859]
45. Wang Y, et al. Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Heart* 2006;92:76874. [PubMed: 16251230]
46. Askari AT, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003;362:697–703. [PubMed: 12957092]
47. Vogt C, Noe G, Rich IN. The role of the blood island during normal and 5-fluorouracil-perturbed hemopoiesis. *Blood Cells* 1991;17:105–21. [PubMed: 2018848] discussion 121-5

48. Heeschen C, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003;102:1340–6. [PubMed: 12702503]
49. Ulich TR, et al. Hematologic effects of stem cell factor in vivo and in vitro in rodents. *Blood* 1991;78:645–50. [PubMed: 1713510]
50. Anderson DM, et al. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell* 1990;63:235–43. [PubMed: 1698558]
51. Petit I, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and upregulating CXCR4. *Nat Immunol* 2002;3:687–94. [PubMed: 12068293]
52. Ip JE, Wu Y, Huang J, et al. Mesenchymal stem cells use integrin beta1 not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment. *Mol Biol Cell* 2007;18:2873–2882.
53. Abbott JD, Huang Y, Liu D, et al. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* 2004;110:3300–330
54. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003;362:697–703.
55. Haider H, Ashraf M. Bone marrow stem cell transplantation for cardiac repair. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288: H2557–2567.
56. Wang Y, Haider H, Ahmad N, et al. Evidence for ischemia induced host-derived bone marrow cell mobilization into cardiac allografts. *J Mol Cell Card* 2006;41:478.
57. Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, et al. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood* 2005;106:3020–3027.
58. Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, et al. Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment. *Exp Hematol* 2002;30:440–449.
59. Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodeling. *Nature* 2002;415:240–243.
60. Wang Y, Haider HK, Ahmad N, et al. Combining pharmacological mobilization with intramyocardial delivery of bone marrow cells over-expressing VEGF is more effective for cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol* 2006;40:736–745.
61. Nathan M Novotny, et al. Stem Cell Therapy in Myocardial Repair and Remodeling. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2008.04.013.

62. Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999;100:11247–256.
63. Schwarz ER, Patterson M, Kloner RA. [Cardiomyocyte transplantation—a cell replacement for repair of myocardial infarction?]. *Z Kardiol* 1998;87:1–7.
64. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001;344:1750–1757.
65. Hirzel HO, Nelson GR, Sonnenblick EH, Kirk ES. Redistribution of collateral blood flow from necrotic to surviving myocardium following coronary occlusion in the dog. *Circ Res* 1976;39:214–222.
66. Anversa P, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B. Myocyte growth and cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:91–105.
67. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, et al. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003;361:47–49.
68. Badorff C, Brandes RP, Popp R, et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 2003;107: 1024–1032.
69. Shi D, Reinecke H, Murry CE, Torok-Storb B. Myogenic fusion of human bone marrow stromal cells, but not hematopoietic cells. *Blood* 2004;104:290–294.
70. Terada N, Hamazaki T, Okamoto M, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002;416:542–545.
71. Pak HN, Qayyum M, Kim DT, et al. Mesenchymal stem cell injection induces cardiac nerve sprouting and increased tenascin expression in a swine model of myocardial infarction. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003;14:841–848.
72. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003;425:968–973.
73. Ebel H, Jungblut M, Zhang Y, et al. Cellular cardiomyoplasty: improvement of left ventricular function correlates with the release of cardioactive cytokines. *Stem Cells* 2007;25:236–244.
74. Feygin J, Mansoor A, Eckman P, et al. Functional and bioenergetic modulations in the infarct border zone following autologous mesenchymal stem cell transplantation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H1772–1780.

75. Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, et al. Adenosine reduces cardiac TNF- $\alpha$  production and human myocardial injury following ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 1998;76: 117–123.
76. Rowland RT, Cleveland JC Jr, Meng X, et al. Potential gene therapy strategies in the treatment of cardiovascular disease. *Ann Thorac Surg* 1995;60:721–728.
77. Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. [Stem cells after myocardial infarction]. *Herz* 2006;31:127–136.
78. Hamilton JB, Mestler GE. Mortality and survival: comparison of eunuchs with intact men and women in a mentally retarded population. *J Gerontol* 1969;24:395–411.
79. Strauer BE, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;106:1913–8. [PubMed: 12370212]
80. Fernandez –Avilés F, San Román JA, García Frade J, et al. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ res* 2004;95:742-748
81. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106:3009–3017.
82. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364:141–148.
83. Erbs S, Linke A, Schachinger V, et al. Restoration of microvascular function in the infarct-related artery by intracoronary transplantation of bone marrow progenitor cells in patients with acute myocardial infarction: the Doppler Substudy of the Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI) trial. *Circulation* 2007;116:366–374.
84. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355:1199–1209.
85. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* 2006;27: 2775–2783.
86. Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, et al. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood* 2005.

87. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, et al. 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;363:751–756.
88. Fernandez F, et al., Regeneración miocárdica mediante la implantación intracoronaria de células madre en el infarto agudo de miocardio, *Rev Esp Cardiol* 2004;57(3):201-8



... escrito en las estrellas.