



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

CARACTERIZACIÓN DE SUBPOBLACIONES CELULARES DE MÉDULA  
ÓSEA EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON  
CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS CIANÓGENAS Y ACIANÓGENAS

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
ESPECIALISTA EN:

PEDIATRÍA

P R E S E N T A

DRA. MONSERRAT BORJA MIRANDA  
DIRECTOR DE TESIS: DR. SERGIO RUIZ GONZÁLEZ



Ciudad de México, Febrero 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

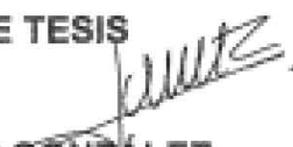
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

**HOJA DE FIRMAS**

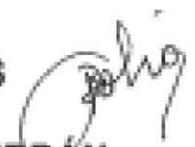
**DRA. REBECA GÓMEZ CHICO VELASCO  
DIRECTORA DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADÉMICO**

**DIRECTOR DE TESIS**

  
**DR. SERGIO RUIZ GONZALEZ**

**MÉDICO ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA  
CARDIOVASCULAR  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

**ASESORES DE TESIS**

  
**DR ALEJANDRO BOLIO CERDÁN**

**JEFE DE DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA CARDIOVASCULAR  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

  
**DR. JOSÉ LUIS ACEVES CHIMAL**

**MEDICO ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE CIRUGIA  
CARDIOASCULAR  
CMN 20 DE NOVIEMBRE, ISSSTE**

## DEDICATORIAS

*A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación y vida , por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.*

*A mi hermano Andrés por estar siempre presente y brindarme su apoyo y amor sin límites.*

*A Armando, por compartir los desvelos, las guardias, los días difíciles y enseñarme a encontrar algo positivo en cada uno de ellos.*

*A mis asesores por creer en mí y apoyarme en la realización de esta tesis*

*A los servicios y todo el personal de Cardiología, Hemodinámica y Cirugía Cardiovascular del HIMFG.*

*Al Dr. José Luis Aceves, por guiar mis pasos durante mi formación académica y personal, como médico general y como pediatra, por apoyarme y alentarme para superarme día con día , por compartir sus conocimientos conmigo y enseñarme que si se puede ser médico e investigador.*

*Llegar aquí ha sido posible y gracias a ellos.*

## INDICE

Resumen.....	5
Introducción.....	6
Antecedentes.....	7
Marco Teórico.....	9
Planteamiento del problema.....	13
Pregunta de Investigación.....	14
Justificación.....	15
Objetivos.....	15
Hipótesis.....	16
Metodología.....	16
Consideraciones éticas.....	18
Plan de análisis de datos.....	19
Descripción de variables.....	19
Resultados.....	20
Discusión.....	21
Conclusión.....	23
Limitaciones del estudio.....	23
Cronograma.....	23
Anexos.....	24
Bibliografía.....	26

## RESUMEN

### CARACTERIZACIÓN DE SUBPOBLACIONES CELULARES DE MÉDULA ÓSEA EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS CIANÓGENAS Y ACIANÓGENAS.

Las cardiopatías congénitas cianógenas y acianógenas cursan con un proceso inflamatorio endotelial vascular y tisular que podría estar estimulando la liberación de células troncales de médula ósea mediante la activación del eje inflamatorio SDF1/CXCR4. Considerando la posibilidad futura del uso de estas células en la terapia regenerativa en este tipo de cardiopatías, caracterizamos las subpoblaciones celulares movilizadas a la circulación sanguínea periférica.

**Objetivo:** Determinar cantidad, tipo y estatus en el ciclo celular de subpoblaciones celulares de médula ósea presentes en sangre periférica de pacientes pediátricos con cardiopatías congénitas cianógenas y acianógenas.

**Metodología:** Se realizó un estudio Transversal, Observacional, Descriptivo, Analítico, Prolectivo en población pediátrica con cardiopatía congénita cianógena y acianógena atendida en el servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Se tomaron muestras de sangre venosa (2ml) y se preservó a 4° C hasta la realización de citometría de flujo, donde se cuantificaron las subpoblaciones celulares de médula ósea CD34/CXCR4+, CD133/CXCR4+, CD117/CXCR4+, CD 48/CXCR4+ y CD184 (SDF-1). Se determinaron los niveles de Interleucinas 6, 8 y FNT $\alpha$  mediante Quimioluminiscencia automatizada. Utilizamos el programa estadístico SPSSv22.0 para Windows y determinamos significancia estadística con un valor de  $p < 0.05$ .

**Resultados** Analizamos 49 pacientes con cardiopatía congénita cianógena ( $n = 19$ ) y no cianógena ( $n = 30$ ). Los marcadores inflamatorios y la cuantificación de subpoblaciones celulares de médula ósea mostraron diferencias significativas entre los pacientes con cardiopatía congénita cianógena y no cianógena ( $P = 0.03$  a  $0.001$ ). No se observaron diferencias en las proporciones de células en proliferación dentro del ciclo celular entre los grupos ( $p = 0.21$ ). El análisis bivariado mostró una correlación significativa de los niveles de marcadores inflamatorios con la cuantificación de subpoblaciones celulares de médula ósea. La IL 8 y el SDF-1 $\alpha$  mostraron una correlación alta y significativa con las subpoblaciones CD34/CXCR4, CD133/CXCR4+, CD117/CXCR4+ y CD48/CXCR4+ ( $r = 0.75$  a  $0.90$ ,  $p = 0.01$  a  $0.03$ ). En el grupo de pacientes con cardiopatía congénita acianógena los marcadores inflamatorios IL8 y SDF-1 $\alpha$  mostraron una correlación fuerte y significativa con las subpoblaciones celulares de médula ósea CD34/CXCR4, CD133/CXCR4+, CD117/CXCR4+ y CD48/CXCR4+ ( $r = 0.62$  a  $0.74$ ,  $p = 0.01$  a  $0.04$ )

**Conclusión:** En pacientes con cardiopatía congénita cianógena y acianógena, los niveles de marcadores inflamatorios y las subpoblaciones celulares de médula ósea son significativamente diferentes con una fuerte correlación de los marcadores inflamatorios IL8 y SDF-1 $\alpha$  con células con capacidad regenerativa CD34/CXCR4, CD133/CXCR4, CD117/CXCR4 y CD48/CXCR4.

**Palabras clave:** Células troncales, cardiopatía congénita, eje inflamatorio SDF-1 $\alpha$ /CXCR4

## INTRODUCCIÓN

Las cardiopatías congénitas se caracterizan por alteraciones estructurales del corazón o de los grandes vasos, que se producen por un desarrollo defectuoso del embrión durante la gestación. De acuerdo a la fisiopatología del corto circuito en la circulación, las cardiopatías congénitas se dividen en acianógenas (CIA, CIV, PCA) y cianógenas (TF, TGV, AP, CAVP).<sup>1,2</sup>

La fisiopatología subyacente en estas cardiopatías, además de la hemodinámica, consiste en la presencia de un estado pro e inflamatorio permanente que propicia el desarrollo de hipertensión pulmonar y falla cardíaca que se traducen clínicamente en disnea de esfuerzo, hipoxemia crónica y trastornos del crecimiento y desarrollo.<sup>3,4</sup>

La hipoxemia e inflamación crónica desencadenan procesos de lesión endovascular y apoptosis celular en diferentes tejidos, entre ellos el miocardio, activándose el eje inflamatorio SDF-1 alfa/CXCR4, en el cual se estimula a la médula ósea para la liberación de células troncales que expresan un marcador adicional conocido como CXCR4 (Ligando natural del mediador inflamatorio SDF-1alfa), mientras que a su vez, en el sitio de lesión miocárdica este SDF1 alfa facilita la adhesión de las células troncales liberadas de la médula ósea para propiciar la regeneración del tejido lesionado.<sup>10</sup>

Aceves y col. Observaron que el eje inflamatorio SDF-1alfa/ CXCR4 se incrementa en pacientes adultos con infarto agudo del miocardio, movilizándose cantidades significativa de células troncales de médula ósea con marcadores celulares CD34, CD117, CD133, CD48, CD90 y CD105 hacia la sangre periférica, con un 50% de células activas dentro del ciclo de división celular, asumiendo que esta movilización posiblemente obedece a una respuesta de regeneración miocárdica y vasculogénesis.<sup>18</sup>

En pacientes pediátricos con cardiopatía congénita existe un proceso inflamatorio crónico secundario a lesión del endotelio vascular, miocárdico y tisular por hiperflujo sanguíneo pulmonar e hipoxemia crónica, por lo que es esperada la movilización de células troncales de la médula ósea hacia la circulación periférica como respuesta a los mediadores inflamatorios, sin embargo, esta es un área de la cardiología pediátrica que ha sido poco explorada y que consideramos podría tener potencial terapéutico en el futuro, por lo que realizamos el presente estudio como una exploración inicial para caracterizar las subpoblaciones celulares de médula ósea movilizadas a la circulación periférica como respuesta al proceso inflamatorio crónico presente en pacientes con cardiopatía congénita, para que posteriormente la información obtenida sirva de base para investigaciones específicas relacionadas con procedimientos diagnósticos y terapéuticos.

## **ANTECEDENTES**

Las cardiopatías congénitas se caracterizan por alteraciones estructurales del corazón o de los grandes vasos, las cuales se producen por un desarrollo defectuoso durante la embriogénesis. Se estima que del 2-4% de los recién nacidos vivos presentan malformaciones congénitas, de los cuales entre 4 y 12 por cada 1000 nacidos vivos son portadores de alguna cardiopatía.<sup>1</sup>

De acuerdo a la fisiopatología del corto circuito en la circulación sanguínea, las cardiopatías congénitas se dividen en acianógenas y cianógenas. Las primeras son representadas principalmente por la Comunicación Inter-atrial (CIA), Comunicación Inter-Ventricular (CIV) y Persistencia del Conducto Arterioso (PCA); Las segundas por Tetralogía de Fallot (TF), Trasposición de Grandes Vasos (TGV), Atresia Pulmonar (AP) y Conexión Anómala de Venas Pulmonares (CAVP).<sup>2</sup>

En las Cardiopatías Congénitas Acianógenas la sangre oxigenada sufre un cortocircuito desde las cavidades cardíacas izquierdas hacia las derechas, propiciando sobrecarga de volumen sanguíneo en la circulación pulmonar, propiciando hiper-reactividad de la vasculatura pulmonar y a largo plazo Hipertensión Pulmonar, que se caracteriza fundamentalmente por una proliferación fibro-muscular de la íntima que condicionan obstrucción de la luz vascular, inflamación y lesión de las células endoteliales e hipertrofia de las células del músculo liso vascular. A largo plazo, la Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP) incrementa la post-carga, dilatación ventricular y finalmente Falla Cardíaca Derecha (FCD).<sup>2,3</sup>

En las Cardiopatías Congénitas Cianógenas existe una disminución significativa del flujo sanguíneo en el circuito pulmonar con reducción de la oxigenación sanguínea, produciéndose en consecuencia hipoxemia e hipoxia tisular, condicionando un incremento en la proporción de hemoglobina reducida, la cual se manifiesta clínicamente con cianosis periférica. La hipoxemia e hipoxia del tejido miocárdico produce disminución de la fuerza contráctil del corazón, muerte celular y finalmente falla cardíaca izquierda.<sup>2,3</sup>

## **INFLAMACIÓN Y LESIÓN CELULAR**

En las cardiopatías congénitas acianógenas y cianógenas con insuficiencia cardíaca e hipertensión pulmonar, en conjunto con una inadecuada oxigenación de células y tejidos, se desarrollan fenómenos de isquemia-reperfusión con la consiguiente generación de radicales libres de oxígeno por consumo de Óxido Nítrico (ON) en presencia de altas concentraciones de anión superóxido y aumento de radical peroxinitrito. Los radicales libres producidos por este fenómeno de perfusión son particularmente tóxicos, debido a su reacción con los ácidos grasos no saturados de las membranas y a la formación de

---

hidroperoxidasas lipídicas que provocan reacción en cadena de daño celular con destrucción de la membrana, edema del endotelio vascular y de la mitocondria, inactivando la síntesis de proteínas necesarias para la homeostasis celular.<sup>4</sup>

Las interleucinas, son proteínas que funcionan como mediadores en la comunicación celular, colaboran en la regulación del crecimiento, diferenciación e incluso movilización celular, aunque sus acciones principales se pueden observar en procesos inmunológicos e inflamatorios, estas proteínas viajan a la célula blanco uniéndose a ésta por medio de receptores moleculares de superficie, desencadenando una cascada de señales que produce cambios en la función celular.<sup>5-8</sup>

Entre las principales funciones de las interleucinas inflamatorias se encuentran las siguientes: Inducción de anticuerpos, hematopoyesis, trombocitopoyesis y síntesis de proteínas reactantes de fase aguda. Estas interleucinas se elevan significativamente durante el proceso de lesión vascular y de isquemia-reperfusión del miocardio, mostrando en modelos experimentales, que juegan un papel importante como inotrópicos negativo en la ruta dependiente de óxido nítrico.<sup>9</sup>

Ayelet A y col informan sobre la presencia de un marcador de lesión tisular conocido como Factor derivado de células Troncales (Siglas en Ingles Stem Derived Factor 1 SDF1), el cual se eleva durante la fase aguda de lesión miocárdica, especialmente en presencia de necrosis celular.<sup>10</sup> Este marcador de lesión tisular y endotelial tiene dos funciones esenciales: Primero actúa como estimulador a distancia de la Médula Ósea para la liberación de células troncales inmaduras a la circulación sanguínea, especialmente aquellas células del estroma medular que expresan un marcador de superficie CXCR4. En el sitio de lesión tisular y endotelial, este mismo marcador SDF1 actúa como ligando de las células troncales movilizadas a la circulación que expresan CXCR4. Simultáneamente, este marcador SDF1 también promueve la migración de mononucleares y macrófagos hacia el sitio de lesión para propiciar la eliminación de material necrosado e iniciar posteriormente la reconstitución del tejido con fibrosis a través de los fibroblastos.<sup>10</sup>

## **CÉLULAS TRONCALES**

Nathan<sup>11</sup> informa que en personas sanas, siempre hay en sangre periférica una pequeña cantidad de células mononucleares que expresan marcador de superficie CD34 (0.7%), las cuales al ser cultivadas en diferentes tipos de cultivo proliferan y se diferencian en diferentes líneas celulares. Fridestein<sup>12</sup> y col informaron en los años 60s que las células del estroma de la médula ósea forman colonias de características morfológicas similares a los fibroblastos y que al cultivarlas en diferentes medios de cultivo, expresan el marcador de superficie CD34, las cuales al agregar medio de cultivo característico de un órgano específico se logra su diferenciación hacia el tipo de célula del órgano en cuestión. A partir de 1980, diferentes investigadores observaron que las células del estroma de médula ósea se encuentran en sangre periférica, hipotetizando que estas se encuentran en la circulación

en forma inactiva hasta su activación en algún sitio del organismo en el cual se presenta lesión tisular, iniciando así su diferenciación celular y consecuente regeneración del tejido dañado.

Actualmente, diferentes autores informan que las células de médula ósea tienen características genéticas con gran potencial de regeneración, iniciando la conocida ingeniería celular o ingeniería regenerativa, reconociendo que estas células podrían circular permanentemente en sangre periférica como un monitoreo constante del organismo de posibles agresiones a los órganos de la economía corporal.<sup>13-17</sup>

Aceves et al, observó en pacientes con lesión miocárdica aguda una elevación significativa de células troncales de médula ósea reconocidas en diferentes estudios experimentales como relacionadas con la regeneración de tejidos lesionados, destacando células troncales con marcador celular CD133, CD34, CD117, de las cuales la mitad de las células movilizadas a sangre periférica también expresaron CXCR4, ligando natural del marcador inflamatorio SDF-1, y el 40% de ellas activas en proliferación celular.<sup>18</sup>

### **CÉLULAS TRONCALES EN CARDIOPATÍA CONGÉNITA**

El uso de células troncales de médula ósea ha sido poco explorado en pacientes pediátricos con enfermedades cardiacas, no obstante, basándose en la experiencia obtenida en la mejoría de la función ventricular con pacientes adultos, existe la posibilidad de que células troncales identificadas con potencial regenerativo y angiogénico puedan ser utilizadas en terapia celular en población pediátrica con cardiopatía congénita. En este sentido, se han publicado algunos estudios con población limitada donde se ha observado que la infusión intracoronaria de células CD133 y CD34 mejora la función ventricular en pacientes pediátricos con cardiomiopatía dilatada e hipoplasia del ventrículo izquierdo.<sup>19-22</sup>

### **MARCO TEÓRICO**

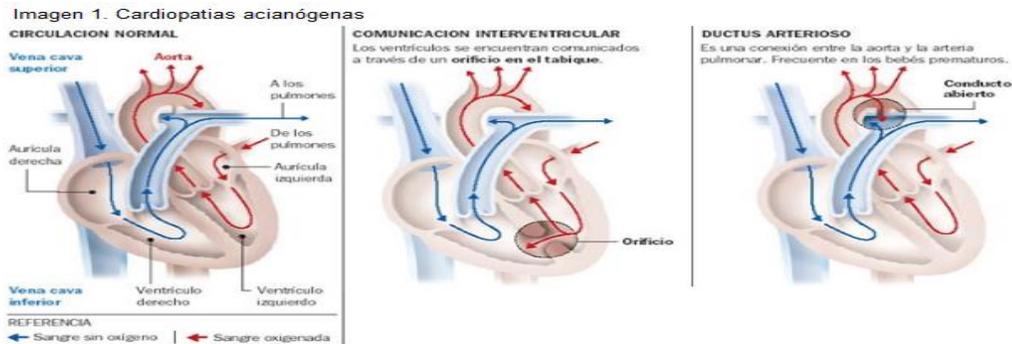
Las cardiopatías congénitas se caracterizan por alteraciones estructurales del corazón o de los grandes vasos, que se producen por un desarrollo defectuoso del embrión durante la gestación. Se estima que del 2-4% de los recién nacidos que presentan malformaciones congénitas, entre 4 a 12 por cada 1000 nacidos vivos son portadores de alguna cardiopatía.<sup>2</sup>

De acuerdo a la fisiopatología del corto circuito en la circulación, las cardiopatías congénitas se dividen en acianógenas y cianógenas. Las primeras son representadas principalmente por la Comunicación Inter-atrial (CIA), Comunicación Inter-Ventricular (CIV) y Persistencia del Conducto Arterioso (PCA); Las segundas por Tetralogía de Fallot (TF), Trasposición de Grandes Vasos (TGV), Atresia Pulmonar (AP) y Conexión Anómala de Venas Pulmonares (CAVP).<sup>2</sup>

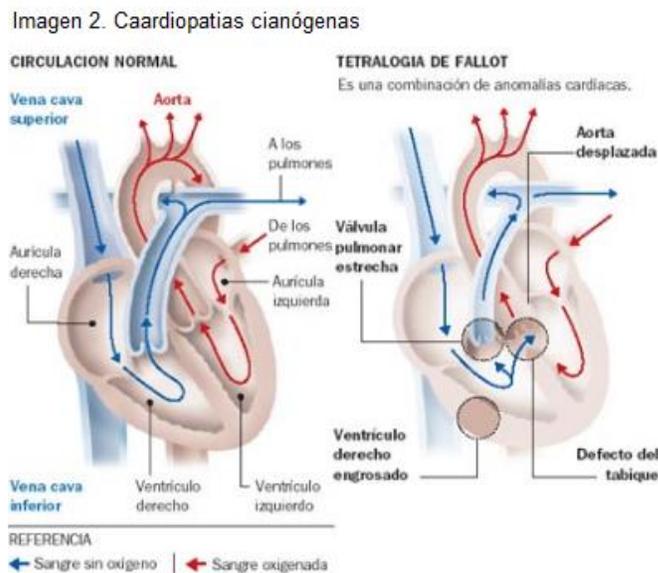
En las Cardiopatías Congénitas Acianógenas la sangre oxigenada sufre un cortocircuito desde las cavidades cardiacas izquierdas hacia las derechas, pero sin que se mezcle con

sangre no oxigenada en la circulación sistémica. Este cortocircuito de izquierda a derecha produce un incremento del volumen sanguíneo en el circuito pulmonar propiciando hiperreactividad de la vasculatura pulmonar y en consecuencia enfermedad pulmonar conocida como Hipertensión Pulmonar, que se caracteriza fundamentalmente por una proliferación fibro-muscular de la íntima que condicionan obstrucción de la luz vascular, inflamación y lesión de las células endoteliales e hipertrofia de las células del músculo liso vascular.

A largo plazo, la Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP) secundaria al incremento del flujo sanguíneo en el circuito pulmonar propicia dilatación del ventrículo derecho y Falla Cardíaca Derecha (FCD).<sup>2,3</sup>



En las Cardiopatías Congénitas Cianógenas existe una disminución significativa del flujo sanguíneo en el circuito pulmonar con reducción de la oxigenación sanguínea, produciéndose en consecuencia hipoxemia e hipoxia tisular. A corto plazo y mediano plazo, la hipoxia crónica del tejido miocárdico produce disminución de la fuerza contráctil del corazón, muerte celular y falla cardíaca.<sup>2,3</sup>



## **CUADRO CLÍNICO, ABORDAJE, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTOS**

El cuadro clínico de las cardiopatías acianógenas y cianógenas es diferente. En las primeras, existe una comunicación anatómica anormal que propicia un incremento de flujo sanguíneo procedente de la circulación sistémica a la circulación pulmonar produciendo a mediano reactividad de las resistencias vasculares pulmonares con elevación de la presión vascular pulmonar. A largo plazo en la vasculatura pulmonar se produce hiperplasia de la íntima con disminución importante y paulatina de la luz de los vasos arteriales, ingresando a la circulación pulmonar en un círculo vicioso donde el paso del flujo sanguíneo hacia las unidades alveolo capilar se reduce y en consecuencia la hematosis. Simultáneamente el aumento en la presión progresiva en las arterias pulmonares se traduce por vía retrograda hacia el ventrículo derecho que a largo plazo se dilata y disminuye su función contráctil.

En base a la fisiopatología mencionada y a la severidad del corto circuito del flujo sanguíneo sistémico-pulmonar o de izquierda a derecha, el cuadro clínico es el siguiente: Cuando la comunicación es pequeña, no suele producir síntomas, si es de dimensiones moderadas o grandes la fisiopatología avanza rápidamente manifestándose clínicamente con disnea de esfuerzo, hepatalgia y hepatomegalia por congestión sanguínea, ingurgitación yugular, soplo meso-sistólico de grado variable y fijo en mesocardio (CIA o CIV) o continuo en región inter-escapulo vertebral izquierdo (PCA) y alteraciones del crecimiento y desarrollo.

El diagnóstico usualmente se confirma con estudio de ecocardiografía, en modalidad 2D y 2D, en el cual se visualiza el defecto septal entre las aurículas o entre los ventrículos, así como la presencia conducto arterioso permeable y el grado de afección de las resistencias pulmonares con cateterismo cardiaco derecho. El tratamiento consiste en el cierre de los defectos septales y del conducto arterioso por vía quirúrgica o endovascular, de acuerdo a las dimensiones del defecto septal auricular y del conducto. En el caso del defecto septal interventricular mayor de 1 cm con repercusión clínica y hemodinámica importante el procedimiento quirúrgico es el de elección.

En las cardiopatías cianógenas, esencialmente existe una disminución del flujo sanguíneo en la circulación pulmonar, reduciéndose importantemente la cantidad de sangre que tiene que ser oxigenada en los pulmones. La reducción o ausencia de las estructuras anatómicas que conducen la sangre del ventrículo derecho a los pulmones (Válvula pulmonar, arteria pulmonar y vía de salida del ventrículo derecho) además de condicionar una reducción de la hematosis a nivel pulmonar, también se produce congestión y aumento de la presión del ventrículo derecho que a largo plazo propicia disminución de la fuerza contráctil (Falla cardiaca derecha).

En base a la fisiopatología mencionada, al grado de reducción del flujo sanguíneo en los pulmones y la falla cardiaca derecha se presenta el siguiente cuadro clínico: Cianosis peribucal en reposo o en esfuerzo físico, disnea de esfuerzo, soplo cardiaco en mesocardio o en foco pulmonar de intensidad variable, en pacientes con enfermedad crónica dedos en palillo de tambor por hipoxemia crónica y trastornos del crecimiento y desarrollo.

El diagnóstico se confirma usualmente con estudio ecocardiográfico en modalidad 2D y 3D y el grado de trastorno anatómico se confirma con cateterismo cardiaco. El tratamiento en todos los casos es de tipo quirúrgico y en algunos casos que requieren procedimientos paliativos se recurre al uso de intervencionismo cardiaco endovascular.

## **INFLAMACIÓN Y LESIÓN CELULAR**

En las cardiopatías congénitas acianógenas y cianógenas con insuficiencia cardíaca e hipertensión pulmonar, en conjunto con una inadecuada oxigenación de células y tejidos, se desarrollan fenómenos de isquemia-reperfusión con la consiguiente generación de radicales libres por consumo de Óxido Nítrico (ON) en presencia de altas concentraciones de anión superóxido y aumento de radical peroxinitrito. Los radicales libres producidos por este fenómeno de perfusión son particularmente tóxicos, debido a su reacción con los ácidos grasos no saturados de las membranas y a la formación de hidroperoxidasas lipídicas que provocan reacción en cadena de daño celular con destrucción de la membrana, edema del endotelio vascular y de la mitocondria e inactivación de la síntesis de proteínas necesarias para el funcionamiento celular.<sup>4</sup>

Las interleucinas, son proteínas que funcionan como mediadores en la comunicación celular, colaboran en la regulación del crecimiento, diferenciación e incluso movilización celular, aunque sus acciones principales se pueden observar en procesos inmunológicos e inflamatorios, estas proteínas viajan a la célula blanco uniéndose a ésta por medio de receptores moleculares de superficie, desencadenando una cascada de señales que produce cambios en la función celular.<sup>5-8</sup>

Entre las funciones de la IL-6, principalmente están: La inducción de anticuerpos, hematopoyesis, trombocitopoyesis y síntesis de proteínas reactantes de fase aguda, de la misma manera que con TNF $\alpha$  se ha probado que existe una elevación significativa de esta interleucina durante un proceso de lesión vascular y a un fenómeno de isquemia-reperfusión del miocardio, observándose su elevación en falla cardíaca crónica y miocarditis, donde también se ha cuantificado una relación directa entre los niveles de IL-6 y la severidad de la patología, mostrando en modelos experimentales, que esta interleucina juega un papel muy importante como inotrópico negativo, mediado por una ruta dependiente de óxido nítrico.<sup>9</sup>

El Factor Transformador de Granulocitos beta (TGF-B), se encarga de estimular la quimiotaxis de macrófagos y la proliferación de fibroblastos, destacando su liberación por cardio-miocitos después de un evento de isquemia-reperfusión, hipoxia miocárdica crónica y sobre carga ventricular izquierda, siendo trascendental su presencia en el proceso de transformación fenotípica de fibroblastos a miofibroblastos.<sup>9</sup>

Ayelet A y col informan sobre la presencia de un marcador de lesión tisular conocido como Factor derivado de células Troncales (Siglas en Ingles Stem Derived Factor 1 SDF1), el cual se eleva durante la fase aguda de lesión miocárdica, especialmente en presencia de necrosis

celular.<sup>10</sup> Este marcador de lesión tisular y endotelial tiene dos funciones esenciales: Primero actúa como estimulador a distancia de la Médula Ósea para la liberación de células troncales inmaduras a la circulación sanguínea, especialmente aquellas células del estroma medular que expresan un marcador de superficie CXCR4. En el sitio de lesión tisular y endotelial, este mismo marcador SDF1 actúa como ligando de las células troncales movilizadas a la circulación que expresan CXCR4. (Ver esquema) Simultáneamente, este marcador SDF1 también promueve la migración de mononucleares y macrófagos hacia el sitio de lesión para propiciar la eliminación de material necrosado e iniciar posteriormente la reconstitución del tejido con fibrosis a través de los fibroblastos.<sup>10</sup>

## **CELULAS TRONCALES**

Las células troncales, son aquellas células que conservan la capacidad de dividirse indefinidamente y diferenciarse en distintos tipos de células especializadas. Estas células se clasifican según su origen en: Totipotenciales (tienen la capacidad de formar tanto el embrión como el trofoblasto de la placenta). Pluripotenciales (Son las células de la masa celular interna y pueden diferenciarse en las tres líneas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo). Multipotenciales (Son células capaces de producir un rango limitado de linajes de células diferenciadas de acuerdo a su localización; por ejemplo, las células troncales del sistema nervioso central tienen el potencial de generar tres tipos celulares: neuronas, oligodendrocitos y astrocitos).

La diferenciación celular es un proceso de maduración celular gradual con duración variable, mediante el cual las células de un linaje celular concreto sufren modificaciones, para adquirir la morfología y las funciones de un tipo celular específico y diferente al resto de otros tipos celulares del organismo, este proceso es regulado genéticamente y esta precedido de cambios moleculares que propician la expresión de proteínas clave con funciones específicas para dar inicio a dicha diferenciación.

Existe evidencia donde se describe que las células troncales no sólo actúan mediante la diferenciación y proliferación para la regeneración tisular, sino también mediante la producción de factores de crecimiento y citocinas angiogénicas que estimulan la neovascularización, previniendo así la apoptosis celular y reclutando células troncales locales, conocidas como “Side Cells”.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las fisiopatologías de las cardiopatías congénitas cianógena y acinógena, coincide en la presencia de un proceso inflamatorio que se desencadena por la lesión del endotelio vascular y lesión del tejido miocárdico, incrementándose en sangre periférica los niveles de marcadores inflamatorios como interleucinas 6 y 8, Factor de Necrosis Tumoral alfa y posiblemente del Factor Liberador de Células Troncales (Por siglas en Ingles SDF-1 o Stem Delivery Factor).

Ayelet A<sup>10</sup> y col. mencionan que el marcador inflamatorio SDF1 tiene una función en 2 vertientes. Por un lado los niveles del SDF1 se elevan en la circulación sanguínea cuando existe lesión celular del tejido miocárdico o endotelial, estimulando a distancia a la médula ósea, liberando selectivamente del estroma medular hacia la sangre periférica, células troncales que expresan el marcador celular CXCR4. Las células troncales CXCR4+ migran hacia el sitio de lesión en donde se encuentra el marcador inflamatorio SDF1 propiciado así la adhesión de estas células troncales al tejido lesionado, asumiendo varios investigadores que posiblemente este eje inflamatorio sea una respuesta del organismo para regenerar el tejido lesionado.

Aceves<sup>18</sup> et al, caracterizaron a las células troncales de médula ósea movilizadas a la circulación sanguínea periférica en pacientes adultos con infarto agudo al miocardio, observando en la fase aguda la activación del eje infamatorio SDF1/CXCR4, con una fuerte y significativa correlación de los niveles elevados de interleucinas inflamatorias con las cantidades de células troncales CD34/CXCR4+, CD133/CXCR4+, CD117/CXCR4+ y CD48/CXCR4+, asumiendo en forma similar a otros investigadores que este fenómeno podría ser una respuesta defensiva del organismo ante una lesión orgánica.<sup>10, 11</sup>

Asumiendo que las cardiopatías congénitas cianógenas y acianógenas cursan con un proceso inflamatorio que podría estimular la liberación de células troncales de médula ósea y que estas células podrían ser utilizadas en la terapia celular en este tipo de cardiopatías, consideramos como primer paso caracterizar las subpoblaciones celulares en pacientes con esta enfermedad cardiaca.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

En el entendido, que las cardiopatías congénitas cianógenas y acianógenas cursan con un proceso inflamatorio que podría estar estimulando la liberación de células troncales de médula ósea, especialmente células CXCR4+ involucradas en el eje inflamatorio SDF1/CXCR4 y que existe la posibilidad futura del uso de células troncales de médula ósea CXCR4+ como terapia regenerativa en este tipo de cardiopatías, planteamos la siguiente pregunta de investigación como primer paso para la identificación de las subpoblaciones celulares con potencial terapéutico:

**¿Cuáles son las características (Tipos, cantidades y estatus en el ciclo celular) de las subpoblaciones celulares de médula ósea presentes en sangre periférica de pacientes pediátricos con cardiopatías congénitas cianógenas y acianógenas?**

## **JUSTIFICACIÓN**

Se estima que del 2-4% de los recién nacidos que presentan malformaciones congénitas, entre 4 a 12 por cada 1000 nacidos vivos son portadores de alguna cardiopatía. Las cardiopatías congénitas cianógenas y acianógenas se caracterizan por Hipertensión Pulmonar secundaria a hiperflujo sanguíneo, lesión endotelial vascular y lesión miocárdica por hipoxia crónica y fenómeno de reperfusión, desencadenando la presencia de estrés oxidativo, liberación de radicales libre de oxígeno y muerte celular.<sup>1, 4-9</sup>

En población adulta y en modelos experimentales, la terapia celular con células troncales de médula ósea ha mostrado buenos resultados en la regeneración tisular, identificando células con marcadores específicos relacionados con la regeneración vascular y de tejido miocárdico (CD34, CD133, CD117, CD48). Este tipo de terapia ha sido muy poco explorada en población pediátrica, sin embargo, algunas investigaciones con limitada escasa población de estudio han mostrado la posibilidad de que la terapia con estas células puede tener efecto positivo en pacientes con cardiopatías congénitas.

En las cardiopatías congénitas cianógenas y acianógenas se presenta un proceso inflamatorio secundario a daño endotelial y tisular que podría estar activando el eje inflamatorio SDF1/CXCR4 estimulando consecuentemente la liberación de células troncales de médula ósea hacia la circulación sanguínea periférica. Considerando el futuro potencial que podría tener la terapia celular en población pediátrica con cardiopatía congénita, realizamos el presente estudio para conocer las características de las subpoblaciones celulares de médula ósea movilizadas a sangre periférica, esperando que la información obtenida sirva de base para identificar a las células con mayor potencial para futuros estudios con terapia celular en población pediátrica con este tipo de enfermedad cardiológica.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar cantidad, tipo de subpoblaciones celulares de medula ósea presentes en sangre periférica de pacientes pediátricos con cardiopatías congénitas cianógenas y acianógenas.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

En muestras de sangre periférica de pacientes con cardiopatía congénita cianógena y acianógena:

- Conocer la cantidad de subpoblaciones celulares CD34, CD133, CD117, CD48.

- Conocer la proporción de células troncales de médula ósea con marcador celular CXCR4
- Conocer los niveles de marcadores inflamatorios SDF1, interleucinas 6, 8 y FNT $\alpha$
- Determinar las diferencias en las características de las subpoblaciones celulares de médula ósea entre pacientes con cardiopatía congénita cianógena y acianógena.
- Determinar la correlación de las células troncales de médula ósea movilizadas a sangre periférica con los niveles de marcadores inflamatorios.

## **HIPOTESIS**

Aunque el protocolo propuesto es únicamente descriptivo y no requiere planteamiento de hipótesis, considerando que puede existir correlación de las cantidades y subpoblaciones celulares con los niveles de marcadores inflamatorios en cada tipo de cardiopatía congénita y en el entendido que existen diferencias fisiopatológicas en el desarrollo entre cardiopatías congénitas de tipo cianógenas y acianógenas, planteamos las siguientes hipótesis.

En muestras de sangre periférica de pacientes con cardiopatía congénita cianógena y acianógena:

- La cantidad, tipos y estatus en el ciclo celular de las subpoblaciones celulares de médula ósea presentes en sangre periférica así como los marcadores inflamatorios SDF-1, Interleucinas 6, 8 y FNT $\alpha$  son significativamente diferentes.
- La correlación entre las células troncales de médula ósea presentes en sangre periférica con los niveles de marcadores inflamatorios es elevada (>80%) y significativa.

## **METODOLOGÍA**

### **DISEÑO**

Se realizó un estudio Transversal, Observacional, Descriptivo, Analítico, Prolectivo.

### **POBLACION BLANCO**

Población pediátrica con cardiopatía congénita cianógena y acianógena atendida en el servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

### **CRITERIOS DE SELECCIÓN**

#### **INCLUSION**

- Pacientes hombres y mujeres portadores de cardiopatía congénita
- Pacientes mayores de 1 mes y menores de 15 años

- Pacientes que firmaron consentimiento y asentimiento informado

### **EXCLUSIÓN**

- Pacientes portadores de trisomía 21 y antecedente de cirugía menor de 30 días
- Pacientes con proceso infeccioso activo

### **ELIMINACIÓN**

- Pacientes con deseo de retirar su consentimiento o asentimiento informado

### **MÉTODO DE MUESTREO**

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia de acuerdo a la presencia de cardiopatía congénita cianógena y acianógena.

### **METODO**

Posterior a la autorización de la investigación por el comité de Investigación, Ética y Bioseguridad de la institución se identificaron a los pacientes que cumplieron con los criterios de selección en el servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital Infantil de México Federico Gómez, explicándoles a sus padres o representantes legales, las características del estudio, invitándolos a participar solicitando firma de consentimiento y asentimiento informado en mayores de 6 años de edad.

Independientemente de la participación de los pacientes en esta investigación, todos recibieron el protocolo de estudio estandarizado en el servicio de Cardiología Pediátrica y Cirugía Cardiovascular para establecer el diagnóstico del tipo de cardiopatía congénita, que consiste en la realización de historia clínica completa, exámenes de laboratorio (Biometría hemática, química sanguínea, pruebas de función hepática, tiempos de coagulación, enzima CK-MB y troponina I), ecocardiografía bidimensional convencional, electrocardiograma, telerradiografía de tórax y cateterismo cardiaco. Se excluyeron a los pacientes con proceso infeccioso activo determinado por el servicio de Infectología pediátrica de la institución.

Se obtuvo una muestra de sangre venosa mediante punción con aguja hipodérmica calibre 24Fr en la vena cefálica o basilica de cualquiera de los miembros torácicos de los pacientes. En lactantes menores de 10 kg la muestra sanguínea no excedió del 10% del peso corporal y pacientes de mayor peso la muestra fue de 2 ml. Las muestras se mantuvieron en tubo con anticoagulante EDTA a 4° C y fueron procesada en el Laboratorio Clínico del Hospital Infantil de México Federico Gómez Los residuos biológicos fueron destruidos de acuerdo a la normatividad de recolección y destino final de RPBI y CRETIS establecido en el HIMFG por el área de RPBI de la institución.

### **Cuantificación de subpoblaciones celulares**

Con citómetro de flujo Becton Dickinson 4 canales se identificó el inmunofenotipo de subpoblaciones celulares de médula ósea mediante anticuerpos específicos humanos anti CD34, CD133, CD117, CD48, CD184 (SDF-1) y CXCR4 (Beckman Coulter, Embioscience, DAKO, Serotec).

### **Determinación de marcadores inflamatorios**

Mediante ensayo inmunométrico enzimático secuencial en fase sólida, (Quimioluminiscencia automatizada), con analizador SIEMENS IMMULITE 1000, se midieron los niveles de interleucinas (IL-6, IL-8), Factor de Necrosis Tumoral alfa (FNT $\alpha$ ) y SDF-1

### **Determinación de estatus en el ciclo celular**

Mediante citometría de flujo con equipo Becton Dickinson 4 canales con anticuerpo anti-humano Ki67 se identificaron el estatus dentro del ciclo celular (**Fases G1, S, G2 y M**) en que se encontraron las subpoblaciones celulares presentes sangre periférica.

### **REGISTRO DE VARIABLES**

Del expediente clínico se registraron las siguientes variables: Edad, sexo, peso, talla, superficie corporal, tipo de cardiopatía congénita, , Fracción de Expulsión del Ventrículo Izquierdo (FEVI), cantidades y estatus en el ciclo celular de subpoblaciones celulares de médula ósea presentes en sangre periférica, niveles de marcadores inflamatorios (Interleucinas 6, , FNT $\alpha$ , SDF-1).

### **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

El estudio se ajustó a los lineamientos establecidos en la declaración de Helsinki revisada en Tokio en el año 2000, a los establecidos por el Hospital Infantil de México Federico Gómez y por la Ley General de Salud en materia de investigación clínica título segundo, capítulo I, artículo 17 categoría II, puesto que el estudio propuesto representa bajo riesgo para los pacientes puesto que únicamente se obtendrá una muestra de sangre mediante punción de la vena cefálica o basílica de alguno de los miembros torácicos.

A los padres o representantes legales de los pacientes se solicitó firma de consentimiento informado de acuerdo a lo dispuesto en la Ley General de Salud título segundo, capítulo I, artículos 20, 21, 22 y 23 en materia de los aspectos éticos en la investigación en seres humanos.

Para conservar el anonimato de los pacientes y conservar la privacidad y confidencialidad de los datos, se registró la información utilizando como referencia el número de folio del expediente clínico. Así mismo, las muestras sanguíneas fueron eliminadas inmediatamente después de su procesamiento. Todos los estudios invasivos y no invasivos necesarios para establecer el diagnóstico de la cardiopatía congénita formaron parte del estudio integral para establecer el diagnóstico de la enfermedad cardiaca del paciente, los cuales fueron realizados independientemente de su participación en la presente investigación.

## ANÁLISIS DE LOS DATOS

Utilizamos el programa estadístico SPSS v21.0 para Windows. El análisis descriptivo se realizó con medidas de tendencia central y de dispersión previa evaluación con la prueba K de Smirnov. Para la comparación entre grupos (Cardiopatía congénita cianógena y acianógena) utilizamos prueba t de Student. Para el análisis de correlación utilizamos prueba de Correlación de Pearson. Consideraremos significancia estadística con un valor de  $p < 0.05$ .

## DEFINICIÓN CONCEPTUAL Y OPERACIONAL DE VARIABLES

### INDEPENDIENTES

**Cardiopatía Congénita Cianógena:** Malformación cardiaca adquirida durante el desarrollo fetal que propicia hipoxemia tisular y elevación de hemoglobina reducida manifestada clínicamente con cianosis. Las cardiopatías más frecuentes son: Tetralogía de Fallot, Transposición de los Grandes Vasos (TGV), Estenosis Pulmonar (AP) y Conexión Anómala de Venas Pulmonares (CAVP). Variable nominal, presente/ausente.

**Cardiopatía Congénita Acianógena:** Malformación cardiaca adquirida durante el desarrollo fetal que se caracteriza por el paso de sangre de la circulación izquierda hacia la circulación derecha del corazón con incremento del volumen sanguíneo en la circulación pulmonar. Las cardiopatías más frecuentes son: Comunicación Interauricular (CIA), Comunicación interventricular (CIV) y Persistencia del Conducto Arterioso (PCA). Variable nominal, presente/ausente.

### DEPENDIENTES

**Subpoblaciones Celulares de Médula Ósea:** Células inmaduras que conservan su capacidad de replicación y diferenciación a diferentes tipos de tejidos. Las subpoblaciones conocidas identificadas por marcadores celulares específicos en diferentes estudios relacionadas con procesos de regeneración de tejidos y angiogénesis son: CD34, CD117, CD133, CD48. Variable cuantitativa de acuerdo a la celularidad observada, expresada en números absolutos y en porcentaje.

**Estatus en proliferación celular:** Estado en que se encuentran las células dentro del ciclo de división celular. Mediante la determinación por citometría de flujo del anticuerpo Ki67 se identifica el estado en proliferación de la célula (Fase G1, S, G2 y M). Variable cuantitativa de acuerdo a la celularidad observada, expresada en números absolutos y en porcentaje.

**Marcadores inflamatorios:** Proteínas que intervienen en el desarrollo de la inflamación: IL-6, la IL-8 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). Se determina mediante quimioluminiscencia. Variable cuantitativa expresada en pg/ml

**Factor Liberador de Células Troncales (Por siglas en ingles Stem Delivery Factor o SDF1):** Citocina que se encuentra presente en sitios de lesión tisular, se conocen dos isoformas SDF1 $\alpha$  y SDF1 $\beta$ . La alfa se encuentra en el cerebro y la beta en corazón y células endoteliales vasculares, aunque en presencia de lesión miocárdica o vascular se incrementa la presencia de SDF1 $\alpha$ . Variable cuantitativa expresada en pg/ml

## COVARIABLES

**Edad:** Tiempo transcurrido desde el nacimiento de una persona. Variable cuantitativa expresada en meses.

**Sexo:** Característica morfológica que identifica al masculino del femenino. Variable nominal masculino/femenino.

**Peso:** Cantidad de materia o masa contenida en el cuerpo de una persona. Variable cuantitativa expresada en gramos.

**Talla:** Distancia que existe entre los pies y el vértice de la cabeza de una persona. Variable cuantitativa expresada en centímetros.

**Superficie Corporal:** Área que considera la superficie del cuerpo humano en función de la talla y el peso del individuo. Variable cuantitativa expresada en números absolutos.

## RESULTADOS

Analizamos 49 pacientes con cardiopatía congénita cianógena (n = 19) y no cianógena (n = 30). La atresia Pulmonar fue la cardiopatía más frecuente (30%) entre las complejas; la Persistencia de Conducto Arterioso (37%) y la Comunicación Inter Atrial (14%) en las no cianógenas. (Ver anexo Tabla 1 y 2) Los marcadores inflamatorios (IL6, IL8, FNT $\alpha$  y SDF-1 $\alpha$ ) y la cuantificación de subpoblaciones celulares de médula ósea (CD34/CXCR4+, CD133/CXCR4+, CD117/CXCR4+ y CD48/CXCR4+) mostraron diferencias significativas entre los pacientes con cardiopatía congénita cianógena y acianógena (P = 0.03 a 0.001). No se observaron diferencias en las proporciones de células en proliferación dentro del ciclo celular entre los grupos (p = 0.21). ( Ver anexo Tabla 3)

El análisis bivariado mostró una correlación significativa de los niveles de marcadores inflamatorios con la cuantificación de subpoblaciones celulares de médula ósea presentes en sangre periférica. En el grupo de pacientes con cardiopatía congénita cianógena la IL6 mostró una correlación fuerte y significativa con las subpoblaciones CD133/CXCR4+ (r = 0.61, p = 0.03); la IL 8 y el SDF-1 $\alpha$  mostraron una correlación muy fuerte y significativa con las subpoblaciones CD34/CXCR4, CD133/CXCR4+, CD117/CXCR4+ y CD48/CXCR4+ (r = 0.75

a 0.90,  $p = 0.01$  a 0.03). En el grupo de pacientes con cardiopatía congénita acianogena los marcadores inflamatorios IL8 ySDF-1 $\alpha$  mostraron una correlación fuerte y significativa con las subpoblaciones celulares de médula ósea CD34/CXCR4, CD133/CXCR4+, CD117/CXCR4+ y CD48/CXCR4+ ( $r = 0.62$  a 0.74,  $p = 0.01$  a 0.04); la correlación fue baja pero significativa con IL6 ( $r = 0.17$  a 0.42,  $p = 0.02$  a 0.12), IL 8 ( $r = 0.50$  a 0.60,  $p = 0.02$  a 0.04), TNF $\alpha$  ( $r = 0.20$  a 0.42,  $p = 0.02$  a 0.04). Tabla 4

## DISCUSIÓN

La terapia celular con células troncales en población pediátrica con cardiopatías congénitas, es un tema poco explorado. En este estudio, observamos proporciones importantes de células troncales de médula ósea movilizadas a sangre periférica en pacientes pediátricos con cardiopatía congénita, sugiriendo que existe una respuesta del organismo a la agresión propia de la fisiopatología de la cardiopatía. En este sentido, se despierta un interés lógico que invita a investigar sobre subpoblaciones celulares de médula ósea con marcadores específicos para ser utilizados en terapia celular para patologías particulares.

En la fisiopatología de la cardiopatía congénita existen múltiples agresiones celulares asociadas a hipoxia tisular, estado de acidosis sanguínea, cambios de presión intravascular, osmolaridad sanguínea. Estas condiciones desencadenan reacciones inflamatorias mediadas por marcadores bioquímicos de inflamación que activan a células inflamatorias, propiciando un estado inflamatorio permanente. Estas circunstancias fueron confirmadas por los hallazgos de este estudio, donde se observó un incremento importante de los niveles de interleucinas inflamatorias, las cuales han mostrado tener una actividad secundaria sobre la médula ósea favoreciendo la liberación de células troncales con potencial regenerativo a nivel endotelial (CD133) y tisular (CD34, CD117), las cuales han mostrado capacidad regenerativa cardiovascular en diversos estudios experimentales.

Ayelet<sup>8</sup> describe las 2 vías de actividad del marcador inflamatorio SDF-1 $\alpha$ , en la médula ósea favoreciendo la liberación de células troncales con expresión adicional del marcador CXCR4 hacia la sangre periférica y simultáneamente en el sitio de lesión cardiovascular favorece el establecimiento de estas células con capacidad regenerativa, convirtiéndose en el ligando natural del marcador celular CXCR4, identificándose en modelos experimentales de patologías cardiovasculares y cardiopulmonares la existencia del eje inflamatorio SDF-1 $\alpha$ /CXCR4. Nuestros hallazgos apoyan la existencia de este eje inflamatorio, observando una muy fuerte y significativa correlación de las células troncales con capacidad regenerativa (CD34, CD133, CD117 y CD48) con marcador celular adicional CXCR4. Tabla 4

Considerando que la fisiopatología entre las cardiopatías congénitas cianógenas y acianógenas difiere en el grado de agresión de hipoxia tisular y vascular, es lógico pensar que posiblemente el eje inflamatorio SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 tenga una intensidad diferente.

Nosotros observamos en pacientes con estas dos tipos de cardiopatías congénitas diferencias significativas en los niveles de marcadores inflamatorios (IL6, IL8, FNT $\alpha$  y SDF-1 $\alpha$ ) y en las proporciones de células troncales de médula ósea movilizadas a la circulación sanguínea (CD34/CXCR4+, CD133/CXCR4+, CD117/CXCR4+ y CD48/CXCR4+)

La diferente intensidad del eje inflamatorio SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 observado por Aceves y col entre pacientes adultos con infarto agudo al miocardio y angina de pecho, igualmente fue observado en nuestro estudio, entre pacientes con cardiopatía congénita cianógena y acianógena, indicando la relevancia de evitar el progreso de la agresión vascular, endotelial y tisular del aparato cardiovascular y cardiopulmonar mediante intervención médica oportuna.

En pacientes con cardiopata cianógena se observan dos condiciones que podrían contribuir a la activación del eje SDF1-CXCR4; el síndrome hipoxémico crónico, debido a la desaturación crónica de oxígeno en sangre arterial que es causada por un corto circuito de derecha a izquierda, y la disfunción endotelial descrita como falta de respuesta vasodilatadora secundaria al agotamiento de la capacidad de las células endoteliales para la producción de óxido nítrico debido a la hiperviscosidad sanguínea característica de estos pacientes. Este fenómeno inflamatorio también ha sido descrito en pacientes sometidos a ECMO y en pacientes con antecedente de vasculitis sistémica primaria.<sup>27</sup>

No obstante, parece ser que en padecimientos inflamatorios donde se produce un agotamiento de la médula ósea, el eje inflamatorio no tiene el mismo efecto en la movilización de células troncales con capacidad regenerativa. Este fenómeno ha sido observado en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico, Enfermedad de Kawasaki con enfermedad renal crónica terminal.<sup>29</sup>

En suma, los hallazgos de este estudio muestran que la agresión de los eventos involucrados en la fisiopatología de las cardiopatías congénitas, desencadena un proceso inflamatorio que promueve la respuesta del organismo para corregir o regenerar la lesión cardiovascular, mediante la movilización a la circulación sanguínea de células troncales de médula ósea con capacidad regenerativa. Mostrando además que es necesario realizar investigación específica en la modulación o control del fenómeno inflamatorio presente en pacientes con esta enfermedad cardíaca. Por otro lado, nuestros hallazgos muestran la existencia de una amplia posibilidad del uso de células troncales de médula ósea con marcadores celulares específicos, en la terapia celular para pacientes con cardiopatía congénita, ya sea para el control de las lesiones asociadas al evento inflamatorio o bien para mejorar la función de órganos específicos con deterioro secundario a los eventos de hipoxia tisular e hipoxemia.

## **CONCLUSIÓN**

En pacientes con cardiopatía congénita:

- Existe una fuerte correlación de los marcadores inflamatorios IL8 y SDF-1 $\alpha$  con la movilización a la circulación sanguínea de células con capacidad regenerativa CD34/CXCR4, CD133/CXCR4, CD117/CXCR4 y CD48/CXCR4.
- Existen diferencias significativas en los niveles de marcadores inflamatorios y en la cantidad de subpoblaciones celulares de médula ósea movilizadas a la circulación sanguínea entre pacientes con cardiopatía cianógena y acianógena.
- La intensidad del eje inflamatorio SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 es significativamente diferente en pacientes con cardiopatía cianógena y acianógena.

## **LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

Durante la planeación del estudio se propuso la inclusión de pacientes sanos como grupo control; sin embargo debido a los criterios de exclusión y dadas las características de los pacientes que acuden a nuestra institución, no se logró la obtención de muestras de pacientes sanos; sin embargo existen reportes en la literatura médica de las cantidades de subpoblaciones celulares de médula ósea en la circulación sanguínea, por lo que los resultados del estudio fueron comparados con esta información en el tenor de controles históricos informados en la literatura médica.

## **CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES**

La investigación se realizó en un periodo de 24 meses de acuerdo como se describe a continuación, iniciando hasta obtener la aprobación por los comités de Investigación, Ética y Bioseguridad del Hospital Infantil de México Federico Gómez.( Ver Anexo )

## ANEXOS

Tabla 1.- Distribución de pacientes por tipo de cardiopatía congénita

	n	%
<u>CIANÓGENA</u>		
Atresia Pulmonar	15	30
Ventrículo Izquierdo Hipoplásico	2	5
Canal Atrio-Ventricular	1	2
Tronco Arterioso	1	2
<u>ACIANOGENA</u>		
Persistencia de Conducto Arterioso	18	37
Comunicación Inter-Atrial	7	14
Coartación de Aorta	4	8
Comunicación Inter-Ventricular	1	2

Tabla 2 Características demográficas, presión de ventrículo derecho y Fracción de Expulsión del Ventrículo Izquierdo

	CIANÓGENA	ACIANOGENA	p
Edad (meses)	51± 5	58±5	0.70
Peso (kg)	19±2	23±3	0.46
Talla (cm)	109±30	119±21	0.27
Superficie Corporal	0.7±0.03	0.8±0.03	0.62
PSVD (mmHg)	27±2	14±1.3	0.34
FEVI (%)	69±4	67±7	0.25

PSVD: Presión Sistólica del Ventrículo Derecho; FEVI: Fracción de Expulsión del Ventrículo Izquierdo; El valor de p fue calculado con prueba t de student

Tabla 3.- Marcadores inflamatorios y subpoblaciones celulares de médula ósea en pacientes con cardiopatía congénita cianógena y acianogena

	CIANÓGENA	ACIANOGENA	p
Inteleucina 6 pg/ml	4.1±1.8	2.4±0.8	0.03
Interleucina 8 pg/ml	6.4±1.3	5.8±1.9	0.04
TNF pg/ml	11.4±4	8.2±2	0.001
SDF-1α (%)	48.9±5.7	32.5±5.2	0.001
CD34/CXCR4+ (%)	34±1.9	13±2.8	0.001
CD117/CXCR4+ (%)	46.1±3.7	15.3±3.1	0.001
CD133/CXCR4+ (%)	43.8±2.9	16.2±7.2	0.001
CD48/CXCR4+ (%)	25.1±2.6	13.6±2.6	0.001
Ki67 %	87.3±2.5	84.5±3.3	0.21

TNFα: Factor de Necrosis Tumoral alfa; El valor de p fue calculado con prueba t de student

Tabla 4 Análisis de correlación de los marcadores inflamatorios con la cuantificación de subpoblaciones celulares de médula ósea en sangre periférica

Interleucina 6				
	CIANÓGENA		ACIANÓGENA	
	r	p	r	p
CD34/CXCR4+ (%)	0.39	0.01	0.35	0.02
CD117/CXCR4+ (%)	0.45	0.02	0.39	0.03
CD133/CXCR4+ (%)	0.61	0.03	0.42	0.02
CD48/CXCR4+ (%)	0.35	0.04	0.30	0.03
Ki67 (%)	0.19	0.18	0.17	0.12
Interleucina 8				
	CIANÓGENA		ACIANÓGENA	
	r	p	r	p
CD34/CXCR4+ (%)	0.75	0.01	0.50	0.02
CD117/CXCR4+ (%)	0.91	0.01	0.54	0.03
CD133/CXCR4+ (%)	0.85	0.01	0.57	0.02
CD48/CXCR4+ (%)	0.89	0.01	0.55	0.04
Ki67 (%)	0.90	0.03	0.60	0.04
Factor de Necrosis Tumoral alfa				
	CIANÓGENA		ACIANÓGENA	
	r	p	r	p
CD34/CXCR4+ (%)	0.32	0.02	0.25	0.02
CD117/CXCR4+ (%)	0.48	0.001	0.34	0.03
CD133/CXCR4+ (%)	0.39	0.005	0.42	0.03
CD48/CXCR4+ (%)	0.46	0.001	0.20	0.04
Ki67 (%)	0.36	0.01	0.29	0.04
SDF-1 $\alpha$				
	CIANÓGENA		ACIANÓGENA	
	r	p	r	p
CD34/CXCR4+ (%)	0.80	0.001	0.62	0.01
CD117/CXCR4+ (%)	0.95	0.001	0.65	0.02
CD133/CXCR4+ (%)	0.89	0.001	0.71	0.01
CD48/CXCR4+ (%)	0.95	0.001	0.67	0.03
Ki67 (%)	0.96	0.001	0.74	0.04

La correlación se calculó con prueba Pearson

## Anexo 2

Fecha de inicio	BIMESTRE											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Evaluación por comisiones	x	X										
Reclutamiento de pacientes			x	x	x	x	x	x	x	x		
Análisis de muestras sanguíneas			x	x	x	x	x	x	x	x		
Análisis de información											x	
Presentación de tesis y preparación de artículo para publicación												x

## BIBLIOGRAFÍA

1. Madrid A., Restrepo J.P. Cardiopatías congénitas. *Revista Gastrohnp*. 2013; 15: (1):56-72
2. Venegas C, Peña AY, Lozano R, et al. Mortalidad por defectos al nacimiento. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2005 62:294–304.
3. Dirección General de Información en Salud, Secretaria de Salud. Estadísticas vitales en niños y adolescentes mexicanos. Mortalidad infantil. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2004;61:515–527
4. Channon KM, Guzik TJ. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J Physiol Pharmacol*. 2002; 53(4Pt1):515-24.
5. Blake GJ, Ridker PM. Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction *J Intern Med*. 2002; 252 (4): 283-94.
6. Alvarado Navarro A. Interleucinas e inmunidad innata. *Rev Biomed* 2001; 12(4): 272-280.
7. Enca Martin-Rendon, Brunskill CJ, Hyde SJ, Stanworth AM, Watt SM. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *European Heart Journal* 2008; 29: 1807–1818.
8. Uichi Ikeda, Fujio Ohkawa. Serum interleukin 6 levels become elevated in acute myocardial infarction *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2006;24(6): 579-584
9. Rosas Martínez M., Remodelación cardíaca e inflamación. *Archivos de Cardiología De México* 2006;76( Supl. 4): 58-66
10. Ayelet Dar, Kolet Orit, Iapidot T. Homing of stem cells and tissue injury: 5-11In Leri A, Anversa P and Frishman W. *Cardiovascular Regeneration and Stem Cell Therapy*. 1o ed. Blackwell Futura 2010
11. Nathan J Zvaifler, Lilla Marinova-Mutafchieva, Gill Adams, Christopher J Edwards, Jill Moss, Jan A Burger, and Ravinder N Maini. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*. 2000; 2(6): 477–488
12. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Precursor cells of mechanocytes. *ExpHematol*. 1976;4:267–274
13. Quisenberry PJ, Calvin G, Abedi M. Adult stem cell plasticity: Lienage potential on a continuum. In En Leri A, Anversa P, Frishman WH. *Cardiovascular Regeneration and Stem Cell Therapy*. 1st ed. USA: Blackwell Futura 2007: 11-23.
14. Graf T. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood* 2002;99:3089-101
15. Matsumoto K, Moriuchi T, Koji T, Nakane PK. Molecular cloning of cDNA coding for rat proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin. *EMBO J*. 1987;6 (3): 637–42.
16. Zhang G, Gibbs E, Kelman Z, O'Donnell M, Hurwitz J. Studies on the interactions between human replication factor C and human proliferating cell nuclear antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999; 96 (5): 1869–74.
17. Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T (March 2006). "Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells". *J. Cell. Physiol*. 206 (3): 624–35

18. José Luis Aceves, Rafael Vilchis, María Antonieta Medina, Monserrat Borja, Silvia Cortes, Guillermo Díaz, Armando Castro, Alexis Gómez, José J. Parra, Martha Alvarado, Manuel López Hernández, Virna Poveda, Felipe Masso, Luis F Montaña. CXCR4+ AND SDF-1+ bone marrow cells are mobilized into the blood stream in acute myocardial infarction and acute ischemia. *World Journal of Cardiovascular Diseases*, 2014, 4, 361-367
19. Rupp S, Jux C, Böning H, et al. Intracoronary bone marrow cell application for terminal heart failure in children. *Cardiol Young* 2012; 22: 558–563.
20. Rupp S, Bauer J, Tonn T, et al. Intracoronary administration of autologous bone marrow-derived progenitor cells in a critically ill two-yr-old child with dilated cardiomyopathy. *Pediatric Transplant* 2009; 13: 620–623.
21. Rupp S, Zeiher AM, Dimmeler S, et al. A regenerative strategy for heart failure in hypoplastic left heart syndrome: intracoronary administration of autologous bone marrow-derived progenitor cells. *J Heart Lung Transplant* 2010; 29: 574–577.
22. Bergmane I, Laciš A, Lubaua I, et al. Follow-up of the patients after stem cell transplantation for pediatric dilated cardiomyopathy. *Pediatric Transplant* 2013; 17:266–270
23. Fukuda K, Fujita J, Hakuno D, Makino S. Mesenchymal stem cell-derived cardiomyogenic cells. En Leri A, Anversa P, Frishman WH. *Cardiovascular Regeneration and Stem Cell Therapy*. 1st ed. USA: Blackwell Futura 2007. p. 37-45.
24. Rupp S, Bauer J, Schranz D. Pressure overload leads to an increase of cardiac resident stem cells. *Basic Res Cardiol* 2012; 107: 252
25. Mishra. Cardiac Progenitor Cells in Congenital Heart Patients. *Circulation* 2011; 123: 364-373.
26. Kubo. Increased Progenitors in Failing Human Heart. *Circulation* 2008;118: 649-657.
27. Kort. Circulating Progenitor Cells and Childhood Cardiovascular Disease. *Pediatr Cardiol* 2016; 37: 225–231
28. Sun Y. Age-dependent mobilization of circulating endothelial progenitor cells in infants and young children undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Cytokine* 2009; 47: 206–213
29. Mohan S, Barsalou J, et al. Endothelial progenitor cell phenotype and function are impaired in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol*. 2015 May;67(8):2257-62.