

11205



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN MÉDICA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
UMAE HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA

TRASPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS CD34⁺
EN CARDIOMIOPATÍA DILATADA DE ETIOLOGÍA
NO ISQUÉMICA. ESTUDIO PILOTO

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN CARDIOLOGÍA

PRESENTA:

DR. JOSÉ ÁNGEL CIGARROA LÓPEZ

TUTORES:

DR. MARTÍN HORACIO GARRIDO GARDUÑO
DR. JOSÉ ANTONIO MAGAÑA SERRANO

GRUPO DE INVESTIGACIÓN:

DR. RUBÉN ARGÜERO SÁNCHEZ
DR. RODOLFO CASTAÑO GUERRA
DR. JESÚS ZAIN CAMPOS LARIOS
DR. HUGO ESTRADA ALCÁNTARA
DRA. MARÍA DE JESÚS NAMBO LUCIO
DR. GUILLERMO CAREAGA REYNA



MÉXICO, DISTRITO FEDERAL; OCTUBRE DEL 2005.

0350772



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.



Dr. Rubén Argüero Sánchez
Director General

Hospital de Cardiología Centro Médico Nacional Siglo XXI



Dr. Juan Carlos Necoechea Alva

Director de Educación e Investigación

Hospital de Cardiología Centro Médico Nacional Siglo XXI



HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA

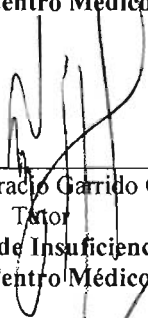
C. M. N. SIGLO XXI

DIVISIÓN CLÍNICA DE EDUCACIÓN
E INVESTIGACIÓN EN MEDICINA



Dr. Rodolfo Castaño Guerra

Titular del curso de Cardiología Clínica. Director Médico
Hospital de Cardiología Centro Médico Nacional Siglo XXI



Dr. Martín Horacio Garrido Garduño

Tutor

Jefe de la Clínica de Insuficiencia Cardíaca

Hospital de Cardiología Centro Médico Nacional Siglo XXI

SUBDIVISIÓN DE ESPECIALIZACIÓN
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U.N.A.M.

Dr. José Antonio Magaña Serrano

Tutor

Médico Adscrito a la Clínica de Insuficiencia Cardíaca
Hospital de Cardiología Centro Médico Nacional Siglo XXI

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser el guía de mi camino.

A mis padres, José Luis y Rosa, quienes me demostraron que siempre se puede vencer ante cualquier adversidad.

A mis hermanos, Edgar, Miriam, Daniel, quienes junto a mis padres, José Luis y Rosa, me hacen darme cuenta del sentido de la vida: la familia.

A mis amigos, quienes siempre me han brindado su apoyo, comprensión, alegría, en especial a Iván, Erick, Paco, Luis, Benito, Yolo, Esme.

A mis Maestros, quienes supieron orientarnos en el difícil campo de la Cardiología. En especial a Dr. Martín Garrido y Dr. José Antonio Magaña, por su invaluable ayuda para la realización de éste trabajo.

A todos, mi agradecimiento, pero en especial a los pacientes, quienes representan la fuente inagotable del conocimiento y la razón para continuar en ésta noble profesión.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e Impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Jose Angel Cigarroa Lopez

FECHA: 21-10-05

SIRMA: [Firma]

TITULO

Trasplante autólogo de células madre (CD34⁺)
en cardiomiopatía dilatada de etiología no
isquémica. Estudio piloto.

AUTOR DE TESIS

Dr. José Angel Cigarroa López

TUTORES

Dr. Martín Horacio Garrido Garduño

Dr. José Antonio Magaña Serrano

GRUPO DE INVESTIGACION

Dr. Rubén Argüero Sánchez

Dr. Rodolfo Castaño Guerra

Dra. María de Jesús Nambo Lucio

Dr. Guillermo Careaga Reyna

Dr. Jesús Zaín Campos Larios

Dr. Hugo Estrada Alcántara

ÍNDICE

I.- Agradecimientos.....	1
II.- Resumen.....	1
III.- Introducción.....	3
IV.- Justificación.....	13
V.- Planteamiento del problema.....	14
VI.- Hipótesis.....	14
VII.- Objetivos.....	15
VIII.- Material y Métodos.....	16
IX.- Variables.....	17
XI.- Procedimientos.....	22
XII.- Análisis estadístico.....	27
XIII.- Tamaño de la muestra.....	27
XIV.- Costos.....	28
XV.- Resultados.....	29
XVI.- Discusión.....	41
XVII.- Conclusiones.....	48
XVIII.- Hoja de consentimiento informado	50
XIX.- Bibliografía.....	51

RESUMEN

La insuficiencia cardíaca (IC) es la principal causa de hospitalizaciones en personas mayores de 65 años y se ha considerado la epidemia del último siglo, estimándose que 50 de los 1000 millones de personas que viven en los 47 países que conforman la Sociedad Europea de Cardiología presentan problemas con la IC¹. En los Estados Unidos es un problema de salud pública mayor. Cerca de 5 millones de pacientes en éste país, tienen IC y 500000 nuevos casos son diagnosticados por año. Requiere de 900000 hospitalizaciones por año y ocurren 300000 muertes en el mismo periodo de tiempo. La mortalidad se ha considerado incluso que es del 76.5% y del 87.6% de los pacientes hospitalizados al cabo de 5 y 10 años respectivamente^{2, 3}, incluso se considera que la mortalidad por IC es superior cuando se compara con el cáncer de colon o próstata en el hombre y al del ovario en la mujer⁴. En México se ha estimado que existen 750,000 personas con IC que anualmente se presentan 75,000 casos nuevos. Según el Instituto de salud Pública de México, en el año 2000, las enfermedades del corazón, representaron la primera causa de muerte en los hombres y la segunda en las mujeres, aunque no se especifica, la estimación real por IC. La prevalencia de la IC sigue aumentando gracias al incremento en las expectativas de vida de la población general.

En estadios finales de la IC por CMD, el único tratamiento eficaz hasta el momento es el trasplante cardíaco, sin embargo, existen avances recientes, con el uso de células troncales intramiocárdicas, con alentadores resultados, principalmente en

pacientes de etiología isquémica, condicionando mejoría en la expectativa de vida, en función de mejoría de la perfusión y de la contractilidad.

Por lo anterior se ha considerado iniciar éste estudio diseñado para someter a pacientes con IC terminal, por CMD, mediante la inyección intramiocárdica de células madre. La finalidad será comparar a estos pacientes antes y después del tratamiento, al cuantificar la magnitud del cambio en los parámetros de función contráctil por ecocardiografía y de perfusión cuya evaluación se realizará mediante medicina nuclear.

INTRODUCCIÓN

Las cardiomiopatías constituyen un grupo de enfermedades caracterizadas por afectación del músculo cardíaco. Estas cardiomiopatías son actualmente causa de morbilidad importante. La clasificación actual es la reconocida por la OMS y corresponden a Miocardiopatía dilatada, Hipertrofica, Restrictiva y otras formas que corresponden a miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho y la no clasificada (incluyendo fibroelastosis, disfunción sistólica con dilatación mínima y la afectación mitocondrial).

La cardiomiopatía dilatada (CMD) es un síndrome caracterizado por dilatación y disfunción sistólica del ventrículo izquierdo o de ambos, de origen familiar, genético, viral o autoinmune, tóxica, idiopática o asociada a factores conocidos de enfermedad cardiovascular o específica. Constituye una importante causa de morbilidad, condicionada por insuficiencia cardíaca o arritmias^{1, 2, 3, 4, 5}. La incidencia de la CMD es reportada de 5 a 8 casos por 100000 habitantes/año y existe tendencia a incrementarse.

La CMD es 3 veces más frecuente en pacientes de raza negra y en hombres, condicionando una peor supervivencia cuando se comparan con pacientes de raza blanca y mujeres^{6, 7}. Se considera que la CMD es responsable de una cuarta parte de la insuficiencia cardíaca (en una serie de niños australianos se ha considerado que representa el 58.6%)⁸, en los Estados Unidos, la mayoría es causada por secuelas de enfermedad coronaria o enfermedad hipertensiva. En América Latina, 16 millones de personas son portadoras de la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana), con mayor prevalencia en Brasil y Argentina, con localización a nivel cardíaco en un 28%

de los casos, evolucionando en miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca. En el Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, se ha documentado la incidencia de CMD por enfermedad de Chagas, en un 7.8% (prueba convencional) y del 8.2% por PCR (reacción en cadena de la polimerasa), sabiendo que al momento actual es considerada en más del 90% como post-viral y que anteriormente se le denominaba idiopática.

Debido a la alta prevalencia de la cardiopatía isquémica como causa de disfunción sistólica en la población general, es común agrupar a los pacientes con CMD en 2 grupos de acuerdo con la presencia o no de enfermedad coronaria obstructiva, como CMD de causa isquémica y no isquémica. En la práctica clínica, se diagnostica como CMD a los pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva por disfunción sistólica⁴. El diagnóstico de CMD se hace por exclusión. El ecocardiograma es el método no invasivo más utilizado. Típicamente se observa hipocinesia global con pobre engrosamiento parietal, pero pueden haber trastornos segmentarios de la contractilidad y ello asociarse a mejor pronóstico, así como si la dilatación se limita sólo al ventrículo izquierdo^{5,6}.

El estudio microscópico histológico revela áreas extensas de fibrosis intersticial y perivascular, particularmente involucrando el subendocardio del ventrículo izquierdo. Áreas pequeñas de necrosis e infiltrado celular son vistos ocasionalmente, pero no es lo típico. Hay una variación marcada en el tamaño del miocito, algunas células cardíacas están hipertrofiadas y otras atrofiadas. Ha sido decepcionante la falla para identificar cualquier marcador, histológico, inmunológico, histoquímico, morfológico y estructural que pudiese establecer la etiología, definiéndose como idiopática^{5,8}. Se le supone un

origen multifactorial, el que se incluye la posibilidad de origen autoinmunitario. Se han identificado autoanticuerpos y autoantígenos en la CMD, en la membrana plasmática, en el citoesqueleto y de estructuras internas (mitocondriales, entre otros)^{7, 8, 9, 10}. Existen tratamientos distintos para este tipo origen como son el anti-inflamatorio-modulador, por elevadas concentraciones de citocinas y Factor de Necrosis tumoral- α (FNT- α), el tratamiento inmunosupresor, a base de inmunoglobulina intravenosas, mediante aféresis, plasmaféresis e inmuoabsorción. Dichos tratamientos no han mostrado eficacia sustancial en fases avanzadas de la enfermedad concluyéndose hasta el momento actual, como única alternativa, el trasplante cardiaco^{11, 12, 13, 14, 15}.

La insuficiencia cardiaca (IC) es la principal causa de hospitalizaciones en personas mayores de 65 años y se ha considerado la epidemia del último siglo, estimándose que 50 de los 1000 millones de personas que viven en los 47 países que conforman la Sociedad Europea de Cardiología presentan problemas con la IC³. En los Estados Unidos es un problema de salud pública mayor. Cerca de 5 millones de pacientes en éste país, tienen IC y 500000 son diagnosticados por año. Requiere de 900,000 hospitalizaciones por año y ocurren 300,000 muertes en el mismo periodo^{1, 7}. En la clínica de Insuficiencia cardiaca del Hospital de Cardiología del Centro Médico nacional Siglo XXI, se ha documentado una mortalidad a 6 años del 53% para pacientes con CMD y del 36% para pacientes con daño miocárdico severo por cardiopatía isquémica, presentando una incidencia de 3 casos nuevos por mes para CMD y de 2 para cardiopatía isquémica¹⁶. Algunos estudios incluso, señalan peor sobrevida en pacientes con insuficiencia cardiaca de etiología no isquémica.

A pesar de los avances en el tratamiento farmacológico de la MCD, cuando ésta llega a sus estadios finales el único tratamiento eficaz es el trasplante cardíaco. Este se indicará en aquellos grupos de pacientes con menor probabilidad de supervivencia a corto plazo, dado el escaso número de donantes, el elevado riesgo operatorio y la morbilidad posquirúrgica. En pacientes con grado funcional IV y choque cardiogénico, la supervivencia sin trasplante es prácticamente nula, por lo que en estos casos la indicación es clara y prioritaria. Otra indicación clara del trasplante cardíaco, la constituyen los pacientes en grado funcional III-IV que presentan arritmias ventriculares e hipotensión arterial. En ellos la supervivencia con trasplante alcanza el 75% al año, lo que contrasta con el 20-30% de supervivencia sin trasplante^{1, 10,17}. Los pacientes con disfunción ventricular y que cursan asintomáticos presentan una supervivencia con tratamiento farmacológico que ronda el 90% al año, por lo que la indicación de trasplante en estos casos se descarta.

A pesar de los avances médicos y quirúrgicos, como el tratamiento para retención salina con diuréticos, el manejo hemodinámico de la pre y poscarga con los vasodilatadores y la fase de tratamiento para disminuir la hiperactividad neurohumoral y simpática, que han observado mejoría en la Insuficiencia cardíaca, no representan el tratamiento definitivo. En el estudio AVID, el implante de desfibrilador automático (IDA), ha demostrado mejoría en la sobrevida, cuando se aplicaba a pacientes sobrevivientes de arritmias ventriculares frente a tratamiento con amiodarona o sotalol¹⁸. Sin embargo, no se ha demostrado aún que el IDA mejore la supervivencia a largo plazo. La asistencia cardiocirculatoria instrumental (LVAD) ha permitido mantener vivos a receptores en condiciones críticas como “puente” hasta el trasplante,

pero por la escasez de donantes se ha sugerido como alternativa permanente. La cardiomioplastia y la cirugía de Batista no han arrojado resultados satisfactorios y sólo en ésta última la mortalidad inmediata es variable¹⁹. El implante de marcapasos DDD de enlace bicameral en pacientes con CMD idiopática en fase terminal puede inducir una mejoría clínica, sin embargo, su uso puede aplicarse solo a un reducido número de pacientes. La insuficiencia cardiaca, sobre todo de origen isquémico, es la patología que más frecuentemente condiciona la vida de estos pacientes. La fisiopatología de esta enfermedad es multifactorial, aunque la pérdida de células cardíacas (que no se pueden regenerar), es el principal factor que juega^{20, 21}. La búsqueda de nuevos métodos de tratamiento y cada vez, recursos más agresivos, ha iniciado los estudios experimentales y clínicos en la medicina de regeneración miocárdica, así como su reparación.

El injerto de células troncales en un miocardio dañado es un acercamiento prometedor para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca. Y con la finalidad de evitar transmisión de priones, virus y otros patógenos, las células son obtenidas del mismo paciente. Este procedimiento se ha utilizado previamente, a partir de la médula ósea, en enfermedades hematológicas, neurológicas, Diabetes, entre otras^{22, 23,24}. Tomando en cuenta que se han utilizado varios tipos de células progenitoras adultas (todas ellas autólogas). Las primeras células de relevancia clínica propuestas fueron los cardiomiocitos, que para uso clínico fueron aislados de biopsias de músculo esquelético, cultivados in vitro por unos días o semanas y posteriormente inyectados de forma directa en la pared ventricular.

Menashé, entre otros, han mostrado la eficacia del trasplante intramiocárdico de miocardiocitos fetales y mioblastos esqueléticos autólogos en el modelo animal con

falla cardíaca isquémica. Realizaron un estudio de enfermos que se sometieron a cirugía de revascularización, en donde además se les inyectaron mioblastos esqueléticos, con mejoría significativa de la función cardíaca, aunque algunos pacientes presentaron arritmias de tipo ventriculares que incluso requirieron de implantación de desfibriladores ventriculares. Los mioblastos (también conocidos como células satélites), que normalmente descansan en un estado de latencia en la membrana basal de las fibras musculares maduras, tienen propiedades que pueden ser usadas con fines clínicos: origen autólogo, facilidad para la proliferación en cultivo in-vitro, exclusiva diferenciación en células musculares y alta resistencia a la isquemia^{12, 21,25,26}. Debido a que la mayor parte de los estudios se han hecho de forma asociada a cirugía de revascularización, es difícil determinar si el trasplante de mioblastos contribuye de forma directa a mejorar la función. Los estudios clínicos que han estudiado la reparación miocárdica, realizados por Strauer y cols, Fernández-Avilés y cols, así como los estudios TOPCARE-AMI y BOOST, han puesto de manifiesto que existe mejoría en la perfusión, contractilidad, disminución significativa del volumen sistólico final, así como mejorando la contractilidad regional y global, reportando mejoría del 7 al 9% de la FEVI) e incrementando la perfusión y viabilidad además del flujo de reserva coronario, constatando la seguridad del procedimiento utilizando células progenitoras circulantes y de médula ósea, con un gran rango en el número de células aplicadas que van desde 16×10^6 hasta valores de 2460×10^6 ; siendo importante distinguir que estas investigaciones se han realizado en el contexto del infarto agudo del miocardio (IAM), presentándose cambios significativos en la remodelación cardíaca a través de neovascularización y reducción de la apoptosis del cardiomiocito^{27, 28, 29,30,31}. Es

importante mencionar que todos los estudios reportan resultados entre 4 y 6 meses. Notablemente en el estudio BOOOST la función global del VI mejoró significativamente en el grupo tratado con células intramiocárdicas, que en el grupo control³¹. Además en el TOPCARE-AMI se usó la resonancia magnética para medir de forma óptima la función y la masa ventricular, demostrando que la mejoría y ausencia de hipertrofia reactiva se preservan después de 1 año, lo cual sugiere beneficio sostenido sobre el remodelado cardíaco³⁰. Es de llamar la atención que a pesar de la diferencia tan grande del número de células infundidas en cada estudio, la mejoría reportada fue casi similar en cada uno de ellos²⁸.

Diversos estudios han utilizado cardiomiocitos, células madres embrionarias, cardíacas, mioblastos esqueléticos o células madre derivadas de médula ósea, éstas últimas han demostrado, al menos in vitro, diferenciarse en células musculares cardíacas o endoteliales y contribuir a la función contráctil, y a la angiogeneénesis y vasculogénesis^{28, 29, 32}. La médula ósea es un complejo microambiente formado por distintos tipos de células maduras, células comprometidas y células madre o troncales. Si bien, la obtención de precursores hematopoyéticos a partir de médula ósea conlleva a bajo riesgo, existe la alternativa de obtención de células madre de sangre periférica por hemoféresis, estimulando su producción mediante la administración de factor estimulante de colonias de granulocitos (FEC-G), pudiéndose con ello obtener cantidades suficientes con el uso de separadores celulares. El objetivo es la extracción de células madre hematopoyéticas con marcadores asociados como son la expresión del antígeno CD34⁺ y AC133^{20, 22, 23,33}. Las células progenitoras derivadas de sangre periférica, han sido utilizadas para neovascularización en enfermedad arterial periférica

y reparación cardíaca. Estas células circulantes (células progenitoras endoteliales o CPE) son derivadas de médula ósea e históricamente el objetivo terapéutico es la angiogénesis, de todos los estudios en los que se han utilizado. Para uso clínico las CPE son aisladas de linfocitos mononucleares de sangre periférica, seleccionados y cultivados en medios endoteliales específicos por 3 días previos a la inyección intramiocárdica^{27, 34}

El uso de factor estimulante de colonias de granulocitos (FEC-G) está bien establecido en pacientes y/o donadores de medula ósea o progenitores hematopoyéticos periféricos con gran seguridad, casi nulos efectos secundarios, produciendo leucocitosis y por lo tanto mejorar la obtención en el número de células madre (CD34⁺). Existen reportes en la literatura del uso de FEC-G en pacientes post-infarto para estimulación de células mononucleadas (stem-cell CD34⁺) para tratamiento con auto-trasplante en infusión intramiocárdica demostrando su utilidad^{28, 35, 36, 37}.

Estas células madre se han considerado que contribuyen a la regeneración del miocardio, gracias a su capacidad de favorecer la angioneogenesis y vasculogénesis, y posiblemente, a la capacidad de estas células de diferenciarse en cardiomiocitos. En los pacientes con infarto agudo del miocardio, el trasplante de células progenitoras mejora de forma significativa el remodelado del ventrículo izquierdo post-infarto a través de mejorar la neovascularización y reducir la apoptosis cardíaca, independientemente de la transdiferenciación.

Un concepto que recientemente ha generado excitación en unos y desconfianza en otros investigadores es el concepto de la plasticidad de las células madre. Las células madre son capaces de autorenovarse por transformación de células progenitoras y

diferenciarse en su progenie especializada. Tradicionalmente las células madre del tejido residente adulto se creía que se diferenciaba en su linaje tisular límite, La plasticidad implica que la célula madre puede transdiferenciarse en tipos celulares maduros fuera de su linaje original en respuesta al microambiente. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas, al ser transplantadas en miocardio murino, puede transdiferenciarse en cardiomiocitos y vasos sanguíneos, y con ello mejore su función y la sobrevivida. Irónicamente aunque la terapia celular está siendo introducida en la práctica clínica, la fusión de las células madre transplantadas con el cardiomiocito residente se ha ofrecido como una alternativa de explicación de su transdiferenciación. Sin embargo, los mecanismos que expliquen la terapia celular parece ser más compleja que lo previamente mencionado. Se ha propuesto que las células liberan ligandos angiogénicos, cardiomiocitos protectores de muerte celular por apoptosis y quizás reclutamiento de las células madre residentes^{38, 39, 40}.

La acción potencial de los factores paracrinos de la terapia celular podría sugerir que incluye efectos inmunomoduladores, como se ha mostrado por las células madre mesenquimales y otras señales que modulan la cicatrización y el remodelado. Adicionalmente los efectos paracrinos disminuyen la muerte celular directamente, tanto en el infarto agudo como en la falla cardiaca crónica, independientemente de su causa²⁷. Una explicación de éste principio es el descubrimiento de la timosina β 4, una proteína que promueve la migración celular, sobrevivida y reparación, a través de la vía de Akt⁴¹.

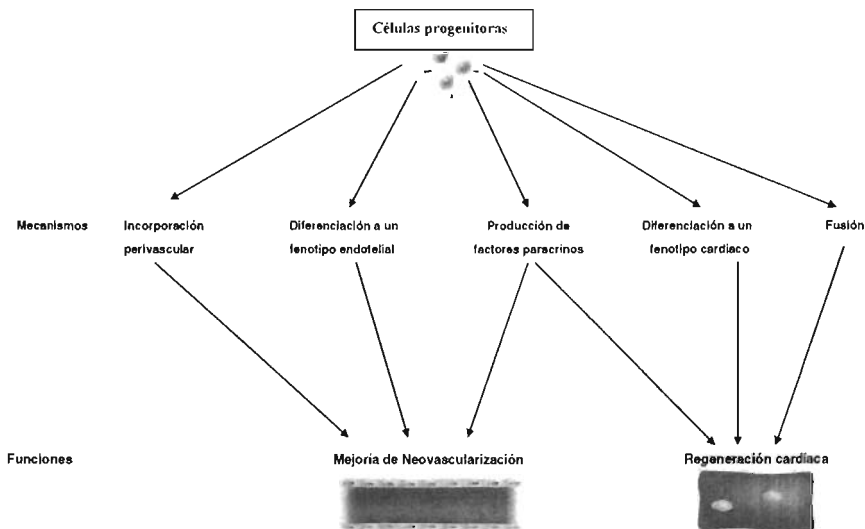


Figura 1. Mecanismos de acción. Las CP pueden mejorar y recuperar la función del miocardio infartado o insuficiente por varios mecanismos potenciales, incluyendo mejora directa o indirecta de la neovascularización. Los factores paracrinos liberados por células progenitoras pueden inhibir la apoptosis, afectando el remodelado o mejorando la reparación endógena. La diferenciación en cardiomiocitos puede contribuir a la regeneración cardíaca.

Los avances actuales permiten continuar con las investigaciones sobre le terapia celular regenerativa, sin embargo, en el corto plazo es posible reconocer más elementos que constituyan el perfil de cada individuo en quien la respuesta esperada sea satisfactoria y desarrolle los efectos terapéuticos apropiados.

JUSTIFICACIÓN

La insuficiencia cardíaca es denominada la epidemia del siglo XXI debido a su alta prevalencia en la población mayor, con elevada morbi-mortalidad y un alto costo económico y social. A pesar de los avances en el tratamiento farmacológico de la CMD, cuando ésta llega a sus estadios finales el único tratamiento eficaz es el trasplante cardíaco. El trasplante cardíaco se indicará en aquellos grupos de pacientes con menor probabilidad de supervivencia a corto plazo, dado el escaso número de donantes, el elevado riesgo operatorio y la morbilidad posquirúrgica. En pacientes con grado funcional IV y choque cardiogénico, la supervivencia sin trasplante es prácticamente nula, por lo que en estos casos la indicación es clara y prioritaria. Considerando que la mortalidad para los pacientes con CMD en espera de trasplante a 6 años se ha documentado en 53%. Sin embargo, debido a la escasez de donantes, consideramos necesaria la modalidad terapéutica de implante de células madres autólogas CD34⁺, en pacientes con cardiomiopatía dilatada que se encuentren en clase funcional II/III de la NYHA, en condiciones estables en tratamiento farmacológico óptimo, de la clínica de insuficiencia cardíaca del Hospital de cardiología de éste CMN Siglo XXI, una vez que ya se ha probado su eficacia, seguridad, y factibilidad en estudios realizados in vitro, en animales e incluso en humanos, llegando a producir angiogénesis, reprogramación celular, estabilizar la matriz extracelular y mejorar la contractilidad miocárdica, con la mejoría clínica que ello represente para el paciente.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿El implante autólogo de células tallo mononucleares CD34⁺ dentro del tejido miocárdico en cardiomiopatía dilatada no isquémica, es capaz de mejorar la función contráctil, el patrón de perfusión coronaria y la clase funcional?

HIPOTESIS

H1: La obtención de células progenitoras hematopoyéticas (Células CD34⁺), en pacientes con Insuficiencia cardíaca, secundaria a cardiomiopatía dilatada es segura y eficaz.

H2: En pacientes portadores de cardiomiopatía dilatada que han desarrollado daño miocárdico, el implante autólogo intramiocárdico de células CD34⁺, es capaz de mejorar la capacidad contráctil del ventrículo izquierdo.

H3: En pacientes con cardiomiopatía dilatada, el implante autólogo intramiocárdico de células CD34⁺ es capaz de reducir la isquemia miocárdica por mejoría en el patrón de perfusión.

H4: En pacientes portadores de cardiomiopatía dilatada que han desarrollado daño miocárdico, el implante autólogo intramiocárdico de células CD34⁺ mejora la clase funcional.

OBJETIVOS

- 1.- Evaluar la seguridad de la obtención de progenitores hematopoyéticos periféricos con una máquina separadora de células, previa movilización de factores estimulantes de colonias granulocíticas en pacientes con insuficiencia cardiaca.
- 2.- Comparar la capacidad contráctil de pacientes con daño miocárdico antes y después del implante autólogo de células CD34⁺.
- 3.- Comparar el patrón perfusorio de pacientes, con insuficiencia cardiaca en fase terminal, secundaria a cardiomiopatía dilatada sin posibilidades terapéuticas farmacológicas, intervencionista y en espera de trasplante cardiaco.
- 4.- Demostrar en pacientes portadores de cardiomiopatía dilatada que han desarrollado daño miocárdico, que el implante autólogo intramiocárdico de células CD34⁺ mejora la Clase Funcional

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio longitudinal, prospectivo, l sólo grupo con control antes-después.

Se seleccionarán a pacientes de la Clínica de Insuficiencia Cardíaca, en clase funcional II o III, en tratamiento farmacológico óptimo, en quienes se someterán a prueba de caminata de 6 minutos, con ecocardiografía transtorácica, que presenten FEVI > 20%, además de la realización de perfusión miocárdica por medicina nuclear evaluándose por grados de acuerdo a la nomenclatura internacional de la Asociación Americana del Corazón.

Todos los pacientes serán sometidos a Sesión Médica Quirúrgica, de la Clínica de Insuficiencia Cardíaca en conjunto con cirugía Cardiotóraca, y con la autorización y consentimiento informado de cada paciente.

UNIVERSO

Pacientes de la Clínica de Insuficiencia Cardíaca del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional “Siglo XXI” con diagnóstico de cardiomiopatía dilatada idiopática.

VARIABLES

DEFINICIÓN DE VARIABLES

Variable Independiente (Intervención):

La realización del procedimiento de implante celular autólogo.

Variable Dependiente:

a) Grado de perfusión miocárdica:

Definición conceptual: Los estudios de perfusión miocárdica bajo estrés ergométrico o farmacológico, determinan por el conteo de cálculos radioactivos, el grado de captación del radiofármaco. La diferencia de los diferentes momentos, permite establecer una comparación cuantitativa, en diferentes etapas. En caso de existir empeoramiento de la perfusión en el post-esfuerzo, se emite la existencia de isquemia miocárdica, misma que puede ser calificada o cuantificada, dependiendo del método empleado y sensibilidad del equipo empleado.

Definición operacional: Estudio perfusorio, técnica e interpretación. Se evaluará mediante medicina nuclear de acuerdo a la división de 17 segmentos, de acuerdo al Comité de Imágenes Cardíacas del Consejo de Cardiología Clínica de la Asociación Americana del Corazón, (SAMN), identificando alteraciones la perfusión, graduándose en isquemia de grado leve, moderado y severo. Se calificará el estado perfusorio del miocárdico para cada segmento como normal o isquémico. En caso de ser isquémico, se gradará en isquemia leve, moderada y severa. Al realizarse el estudio perfusorio en SPECT, se cuantificará la isquemia por la mejoría entre estrés y post-estrés. Se analizará

el índice de isquemia por segmentos correspondiendo a la cara anterior los segmentos 1,7 y 13; para el septum los segmentos 2,3,8,9 y 14; para la cara inferior 4, 10 y 15; para la cara lateral segmentos 5,6,11,12,16 y para el ápex el segmento 17. La suma total de cada uno de ellos corresponderá a la carga de isquemia por cara involucrada.

Escala de medición: Nominal cuantitativa.

b) Contractilidad:

Definición conceptual: Evaluada en la forma habitual de función miocárdica, de acuerdo a determinación de fracción de expulsión del ventrículo izquierdo (FEVI).

Definición operacional: Ecocardiograma, función ventricular por medicina nuclear, técnica e interpretación. Se evaluará la contractilidad, la cual se gradará en porcentaje.

(Hay que señalar que se usan los mismos segmentos que para el ECO)

Escala de medición: Cuantitativa discreta

c) Clase Funcional

Definición conceptual: La clase funcional, es la capacidad de realización de actividades que tiene el paciente portador de insuficiencia cardíaca por cardiomiopatía dilatada.

Habitualmente refiere el grado de actividad física, realizada con el momento en que se presenta el síntoma. Cuando el síntoma estudiado es la disnea, traduce el momento y grado de actividad en que el consumo de oxígeno supera al aporte del mismo, condicionado limitación de la actividad física.

Definición operacional: Evidenciada por prueba ergométrica de 6 minutos, así como el tiempo de ejercicio necesario para alcanzarla.

Se realizará cuestionario de Minnesota para insuficiencia cardiaca antes y después del procedimiento.

Escala de medición: Ordinal

Cualitativa (I, II, III y IV) para la clase funcional y cuantitativa continua para el tiempo.

d) Seguridad

Definición conceptual: Se refiere a las complicaciones secundarias al procedimiento, durante la recolección de muestras, durante la cirugía y aplicación de células madre y en el posquirúrgico.

Definición operacional: morbi-mortalidad quirúrgica

Escala de medición: Nominales

Variables de confusión:

Tiempo de Evolución de la CMD.

Comorbilidades (DM, HAS, IRC, etc.)

Parámetros de función diastólica

Parámetros geométricos del ventrículo izquierdo.

Tiempo quirúrgico.

Número de entregas (aplicaciones intramiocárdicas de células madres).

Presencia de arritmias previas al procedimiento.

Medicación previa.

Criterios de inclusión:

Pacientes hombres y mujeres, entre 30 y 70 años de edad.

Con insuficiencia cardiaca terminal secundaria a cardiomiopatía dilatada de etiología no isquémica diagnosticada por clínica, estudios complementarios de gabinete (ecocardiograma) en el cual se demuestre FEVI > 20%. Por medicina nuclear, en la cual se identifiquen alteraciones en la perfusión para ubicar los sitios de aplicación de las células CD34+, inclusive a realizarse cateterismo.

Con trastornos de la movilidad global o segmentaria, al ecocardiograma y al patrón contráctil de la ventriculografía por medicina nuclear.

Con isquemia miocárdica evidenciada por estudios perfusorios de medicina nuclear.

En tratamiento convencional para cardiomiopatía dilatada.

Que acepten participar en el estudio.

Criterios de no inclusión:

Negativa a participar en el estudio.

Cardiopatía de otra etiología y/o sin insuficiencia cardiaca.

Pacientes con arritmias graves de difícil control.

Pacientes con valvulopatía agregada de otra etiología.

Aquellos pacientes que en plazo menor a 6 meses hayan recibido algún otro tipo de tratamiento, que no sea el farmacológico.

Descontrol importante de enfermedades sistémicas asociadas, como Hipertensión Arterial Sistémica o Diabetes Mellitus.

Otras enfermedades con trastornos electrolíticos no controlables.

Insuficiencia renal severa, con niveles de creatinina sérica mayores a 2.5mg/dl.

Procesos inflamatorios agudos o neoplasias.

Criterios de exclusión:

Pacientes en quienes técnicamente no pueda realizarse el implante celular.

Pacientes con clase funcional IV o en estado de choque cardiogénico.

Descripción de procedimiento:

Distribución de los pacientes:

Los pacientes que cumplan con criterios de inclusión y firmen la carta de consentimiento informado, serán sometidos a todos los estudios y programados para el procedimiento quirúrgico.

Se agruparán los pacientes con cardiomiopatía dilatada terminal de origen no isquémico, cuya única alternativa será la terapéutica celular.

Todos los pacientes serán evaluados mediante ecocardiograma transtorácico y estudios de perfusión miocárdica con medicina nuclear. (SPECT).

Condiciones del paciente:

- 1.- Deberá llevar una vía venosa central
- 2.- Impregnación completa con amiodarona.
- 3.- Manejo habitual de la insuficiencia cardíaca, a base de diuréticos, betabloqueadores, IECA, glucósidos cardíacos, agentes vasodilatadores, bloqueadores de la aldosterona, anticoagulación, etc.
- 4.- Determinación de clase funcional, evaluada por prueba ergométrica (Naughton o caminata de 6 minutos):

5.- Estudios con no más de 1 mes de antigüedad:

- a) ventriculografía con radionúclidos
- b) cateterismo con coronariografía
- c) Talio de esfuerzo con reinyección
- d) Monitoreo Holter de 24 horas
- e) Ecocardiografía

Obtención y preparación de las células troncales:

Las células madre serán obtenidas de sangre periférica por citoaféresis. Los pacientes serán evaluados por el servicio de Hematología para determinar la vía de obtención de células madre: venas del antebrazo o a través de catéter central. Si es necesario instalar un catéter central, se utilizará el de Hickman (13.5Fr) especial para aféresis, que será colocado en quirófano con la técnica habitual.

Se estimularán los leucocitos con Factor Estimulante de Colonias Granulocitarias (FEC-G) a dosis de 10u/Kg de peso, por vía subcutánea durante 4 días, hasta obtener una leucocitosis de 15000/mm³.

Se tomarán muestras de sangre para exámenes de laboratorio basal: biometría hemática completa (BHC), química sanguínea (QS), electrolitos séricos (ES), pruebas de funcionamiento hepático (PFH), tiempo de protrombina (TP), tiempo parcial de tromboplastina (TPT). Tiempo de trombina (TT), creatín-cinasa (CPK), y nuevamente

antes de la cosecha (recolección de células posterior a la movilización con FEC-G) esperando obtener leucocitosis superiores a 15000/mm³.

Posteriormente se efectuará la recolección de células progenitoras periféricas (células mononucleadas CD34⁺) por medio de máquina separadora de células (Baxter CS 3000) en equipo cerrado, para obtener número de células en promedio 3-5X10⁹/L (número equivalente para trasplante autólogo de células progenitoras en padecimientos hematológicos) en un volumen no mayor a 80cc.

El procedimiento se realizará en el Hospital de Oncología, en el área de aféresis. Durante el procedimiento de recolección de células por medio de la máquina separadora de células (Baxter CS 3000) los pacientes estarán bajo monitorización durante el tiempo necesario para la recolección, teniendo el soporte necesario para cualquier eventualidad, (hipocalcemia, hipotensión, angor, arritmias, etc.), y la recolección se realizará en forma programada y supervisada por el grupo clínico en sesiones diarias de 3 horas, hasta obtener la cantidad de células requerida.

Posterior a la recolección, el catéter de Hickman será retirado (reiteramos que en pacientes con accesos venosos en buenas condiciones en ambos brazos, no requerirá de catéter de Hickman).

Se realizará conteo de células CD34⁺ en cada recolección.

Las células recolectadas se almacenarán con dimetilsulfóxido en refrigeración a -4 a 7°C, hasta su utilización.

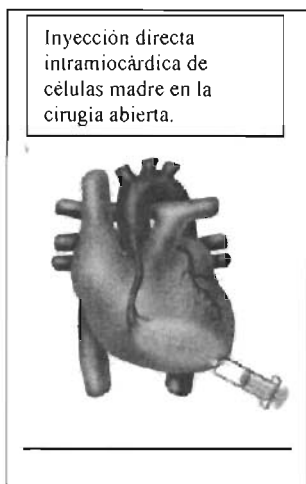
Aplicación de células troncales:

Selección del sitio de implantación.

Será determinado en sesión médico-quirúrgica por el equipo completo, previo al procedimiento. Se seleccionarán aquellas zonas que muestren isquemia en los estudios perfusorios, o en zonas isquémicas hipocinéticas que tienen evidencia de tejido viable.

Bajo anestesia general y previa monitorización convencional para cirugía cardíaca (trazo

electrocardiográfico continuo, línea arterial, catéter venoso central y catéter vesical), se procede a realizar asepsia y antisepsia y se delimita área operatoria con campos estériles. El abordaje se realizará por esternotomía media, pericardiotomía y exposición del corazón. Se realizará la inyección intramiocárdica de células madre en las zonas afectadas por isquemia, seleccionadas con base en los resultados de la evaluación preoperatoria. Se ubicarán las aplicaciones en cara posterior, lateral, anterior, septal y apical, en base a la experiencia internacional. Se realizará cuidadosa hemostasia y el cierre de la pared torácica se hará en forma habitual, esternón con puntos separados de alambre calibre 5, tejidos blandos con material absorbible calibre 2-0 y piel con monofilamento de polipropileno 2-0.



Técnica del implante de las células:

El implante se realizará por medio de la inyección intramiocárdica, bajo visión directa. Se cargarán jeringas estériles de 1cc (insulina), graduadas en unidades de 0.2ml. Se aplicarán 20 ± 2 por paciente, 5-6 ml por zona afectada, a fin de cubrir el área de forma completa. En cada implante, se aplicará 1ml y se realizarán 20 ± 2 implantes por zona afectada, a fin de cubrir el área determinada con distancia mínima entre aplicaciones de 5mm y de 7mm como máxima.

Seguimiento:

Los pacientes pasarán en postoperatorio inmediato bajo vigilancia intensiva en la Unidad de terapia Posquirúrgica (TPQ), donde se harán medidas continuas de presión arterial media, presión venosa central, diuresis, sangrado, equilibrio ácido-base, modificaciones en el ritmo, frecuencia o características del trazo electrocardiográfico, requerimiento de medicamentos inotrópicos o antiarrítmicos. Una vez, el paciente estabilizado, será retirado el apoyo mecánico ventilatorio.

Terapia posoperatoria:

Será responsabilidad del grupo clínico y deberá incluir:

- 1.- Monitoreo electrocardiográfico continuo, hasta egreso a piso.
- 2.- Laboratorio de rutina para la terapia posoperatoria, con especial cuidado en mantener los electrolitos séricos en niveles adecuados.
- 3.- Radiografía de tórax al ingreso a TPQ, y al egreso. Puede realizarse durante la estancia, en caso necesario.
- 4.- Cuidado de sondas mediastinales o pleurales hasta su retiro.

Seguimiento:

- 1.- Se mantendrá tratamiento con amiodarona en todos los pacientes por un mínimo de 3 meses.
- 2.- Manejo habitual de la insuficiencia cardiaca. Usote IECA, betabloqueadores, diuréticos, anticoagulación, glucósidos cardiacos, etc.
- 3.- Estudios a realizar al egreso del paciente:
 - a) Ecocardiograma
 - b) Monitoreo Holter de 24 horas
 - c) Teleradiografía de tórax
- 4.- A los 3 meses se deberá realizar:
 - a) Ecocardiograma
 - b) monitoreo Holter de 24 horas.
- 5.- A los 6 meses se realizará:
 - a) Ecocardiograma
 - b) Talio de esfuerzo con reinyección
 - c) Ventriculografía con radionúclidos
 - d) Monitoreo Holter de 24 horas.
 - e) Determinación de clase funcional evaluada por prueba de Naughton o caminata de 6 minutos.

La intención de éstos estudios será detectar presencia de arritmias, modificación en la fracción de expulsión del ventrículo izquierdo o derecho, modificación en la contracción miocárdica por segmentos y variaciones en la perfusión miocárdica, posteriores a la inyección de células madre.

Análisis estadístico:

Las variables continuas serán expresadas como media \pm desviación típica y las variables categóricas, como valor absoluto y porcentaje. La comparación de las variables continuas se ha realizado mediante el test de la t de Student para datos apareados; en las variables no normales se ha utilizado el test de Wilcoxon para datos apareados. El valor de p para considerar significativas las diferencias, será $p < 0.005$.

Tamaño de la muestra:

Se trata de un estudio piloto, calculado a realizar un corte para análisis de resultados a los primeros 6 pacientes.

RECURSOS NECESARIOS:

Material necesario para la citoaféresis:

Catéter tipo Hickman, calibre 13 Fr

Factor estimulante de colonias granulocíticas (FEC-G)

Separador de células CS 3000.

Equipo cerrado de aféresis para CS 3000

Bionectores, conectores.

Citómetro de flujo para determinación de CD34⁺

Monitor.

COSTO DEL ESTUDIO POR PACIENTE:

Procesamiento del injerto celular (hemoféresis, catéter de Hickman, factor estimulante de granulocitos)	\$ 12,500.00
Prueba perfusoria de Talio con reinyección (2)	\$ 12,000.00
Función ventricular por medicina nuclear (2)	\$ 8,000.00
Ecocardiograma (3)	\$ 2,400.00
Costo procedimiento de implante celular	\$ 15,000.00
Estudios: EKG y monitoreo Holter (10 y 3)	\$ 5,000.00
Consulta evaluatoria y seguimiento mensual (7)	\$ 3,500.00
Estudios de laboratorio (terapia y seguimiento)	\$ 4,500.00
TOTAL	\$ 62,900.00

Estos costos son estimados con base en el promedio de 3 diferentes hospitales de nivel privado.

RESULTADOS:

Se incluyeron en el estudio 6 pacientes, 5 hombres y una mujer, con edad media de 54.5 años (rango de 48-66 años), todos con diagnóstico de cardiomiopatía dilatada no isquémica, en clase funcional II/III de la NYHA. 4 de los pacientes con HTAS, 2 con dislipidemia y 2 con tabaquismo. Todos los pacientes presentaban bloqueo completo de rama izquierda.

Implante celular

El implante de la fracción mononuclear de sangre periférica, en su mayoría células CD34⁺, se realizó por vía intramiocárdica bajo visión directa. Se administraron $52 \times 10^6 \pm 34 \times 10^6$ células mononucleadas.

Evolución clínica

Las mediciones de marcadores miocárdicos (CPK, CPK-MB, DHL, AST) tras el implante celular fueron normales. Durante el procedimiento quirúrgico, se presentaron extrasístoles ventriculares frecuentes, prolongación del QRS (mayor de 0.04s) y taquicardia ventricular no sostenida. La evolución clínica posterior de los pacientes fue satisfactoria. Con una estancia media en la terapia posquirúrgica de 2 días y hospitalaria total de 7 días. A todos ellos se les dio seguimiento durante 7.3 meses (rango de 3 a 14 meses), en donde no se apreciaron complicaciones posteriores al procedimiento En los

meses de seguimiento no se observó ningún evento cardiaco, así como tampoco se ha presentado la necesidad de internamiento en alguno de ellos, por descompensación (Fig. 2). Se presentó un internamiento en el postoperatorio inmediato secundario a neumonía de adquisición intrahospitalaria, que requirió de tratamiento antimicrobiano específico, y lográndose egresar a los 8 días aproximadamente. No hubo fallecimientos y a todos ellos se les pudo realizar los estudios de seguimiento.

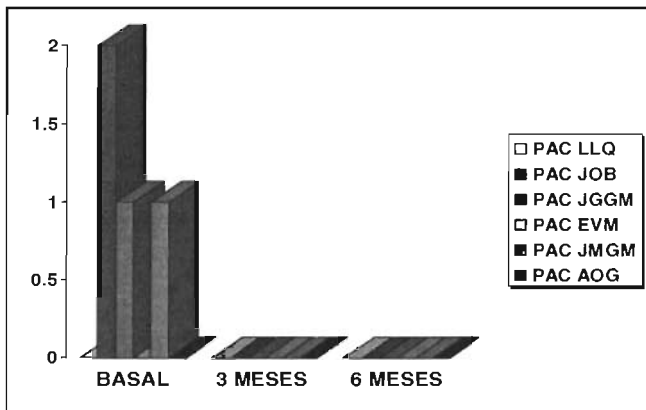


Figura 2. Internamientos previos al procedimiento y posterior al procedimiento.

Ecocardiograma

Este estudio demostró los siguientes parámetros basales del ventrículo izquierdo: diámetro telediastólico (DD) de 62.83 ± 7.167 mm, diámetro telesistólico (DS) de 53 ± 6.132 mm, volumen telesistólico (VSF) de 145 ± 50.87 ml, fracción de expulsión (FEVI) de 26.33 ± 4.22 %. A los 3 meses no hubo diferencias, aunque si se observó, tendencia a la disminución en todos los parámetros, al igual que la FEVI ($p = NS$).

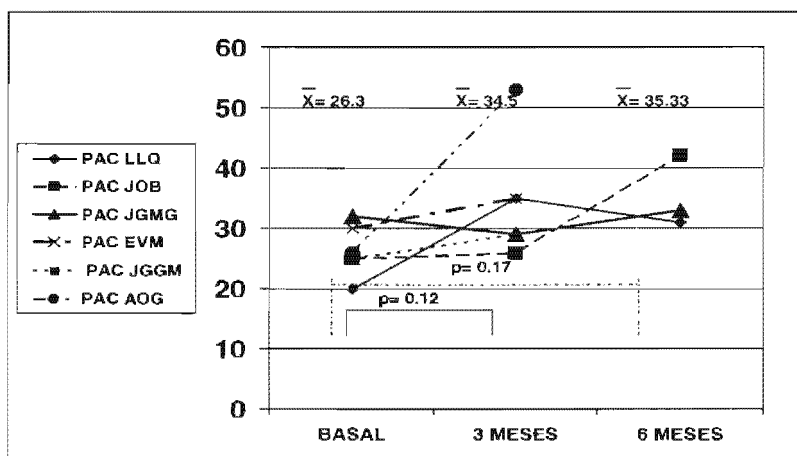


Figura 3.- Evolución de la Fracción de expulsión del Ventrículo Izquierdo en el grupo de 6 pacientes seguidos a 3 meses y 6 meses.

En el seguimiento realizado a 6 meses en 3 pacientes no se observó cambio significativo en el DD (6.67 ± 8.08 mm a 69 ± 2.26 mm), tampoco en el DS (56.67 ± 4.61 a 59.33 ± 6.42 mm); en el VSF (Fig. 7) se observó una disminución de 142.33 ± 52.01 a 139 ± 72.33 % ($p = 0.80$). En la FEVI se observa aumento de 25.67 ± 6.02 % a

35.33±5.85% (p= 0.174). Uno de nuestros pacientes, en quien la dilatación del ventrículo izquierdo, era menor, presentó los datos más relevantes en cuanto a la disminución de los diámetros, volúmenes y fracción de expulsión (Fig. 3, 4, 5 , 6 y 7).

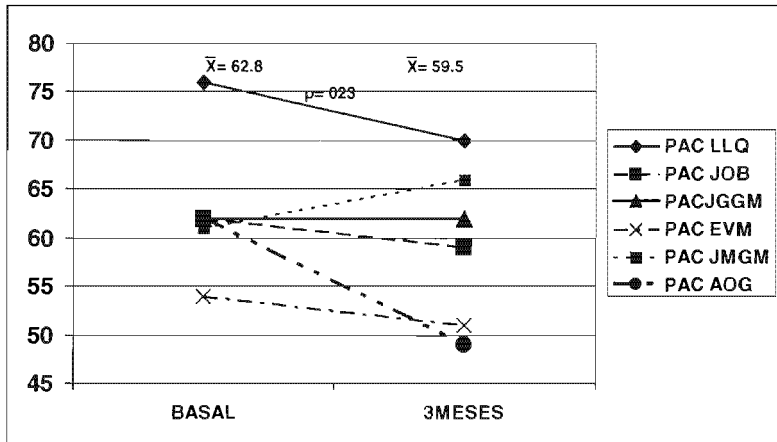


Figura 4.- Diámetro Diastólico Final del Ventrículo izquierdo a 3 meses

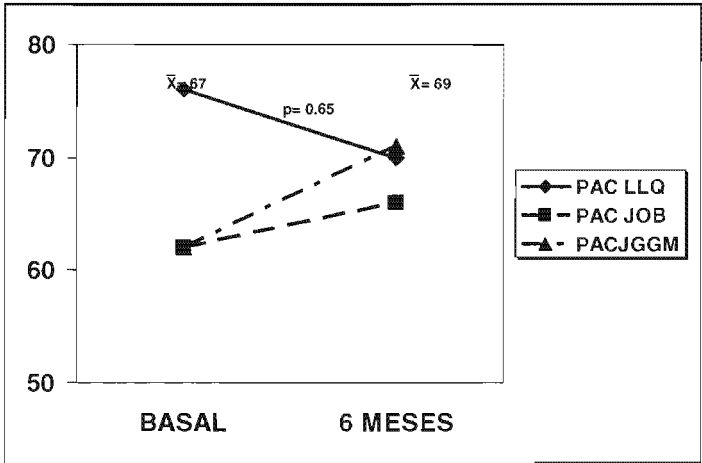
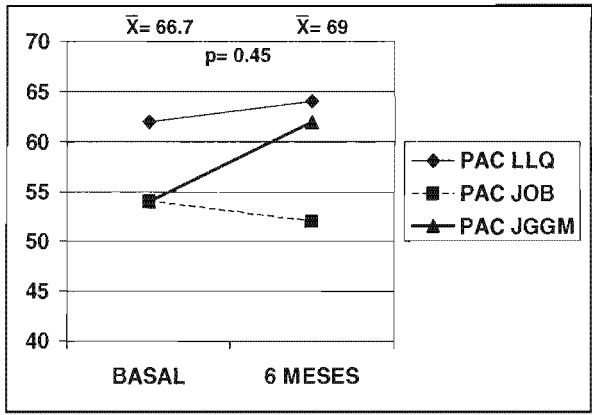


Figura 5.- Diámetro Diastólico Final del Ventrículo izquierdo a 6 meses.



DSVI (mm)

Figura 6 - Diámetro sistólico final del ventrículo izquierdo a 3 meses de seguimiento.

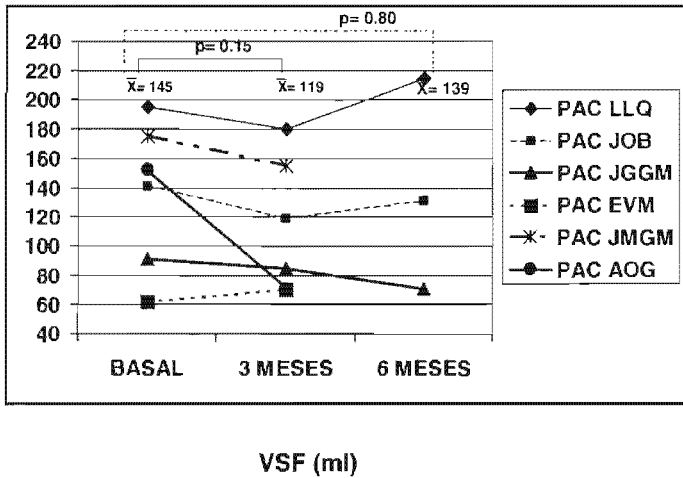


Figura 7.- Volumen Sistólico Final del Ventriculo Izquierdo a 3 y 6 meses

Isquemia

Se registró la carga isquémica total (CIT) basal correspondiendo a una media de 24.40 ± 17.85 (Fig. 8) y por segmentos; Anterior 5.40 ± 4.93 , Septal 9.20 ± 8.40 , Inferior 6.60 ± 4.09 , lateral 0.60 ± 1.34 y apical 2.60 ± 1.51 . La FEVI basal fue de $24.83 \pm 4.07\%$. (Fig. 9)

A los 3 meses del seguimiento se observó una disminución de la CIT y de los índices por regiones ($p=NS$). Sin embargo, la FEVI aumentó a $30 \pm 2.82\%$ ($p= 0.336$). En 2 pacientes se realizó el seguimiento a 6 meses con la misma tendencia hacia la disminución del grado de isquemia ($p= 0.61$). La FEVI incrementó de 22.5 ± 3.53 a $33 \pm 2.82\%$ ($p= 0.03$), siendo estadísticamente significativa (Fig. 10)

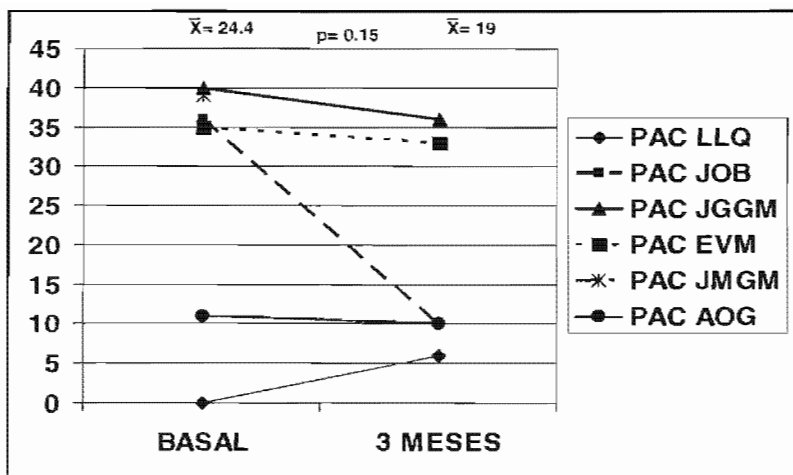
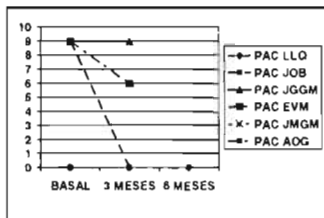
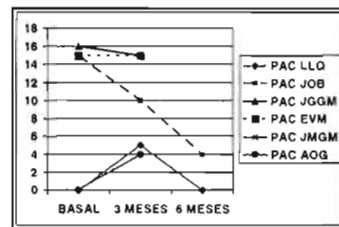


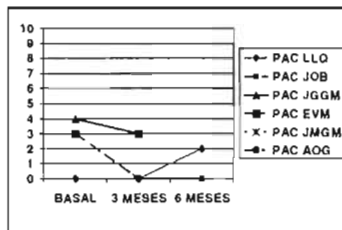
Figura 8.- Carga Isquémica Total (CIT) en pacientes con Cardiomiopatía Dilatada sometidos a Implante Celular a 3 meses.



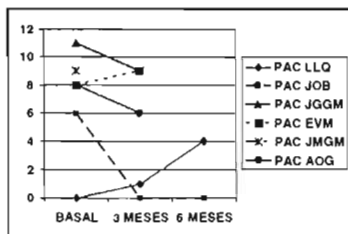
REGION ANTERIOR



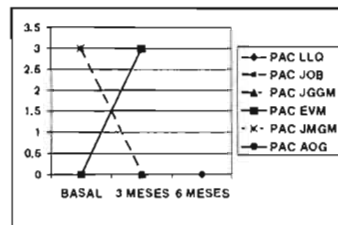
REGION SEPTAL



REGION APICAL



REGION INFERIOR



REGION LATERAL

Figura 9. Representa las tendencias por carga isquémica total, en el grupo de pacientes

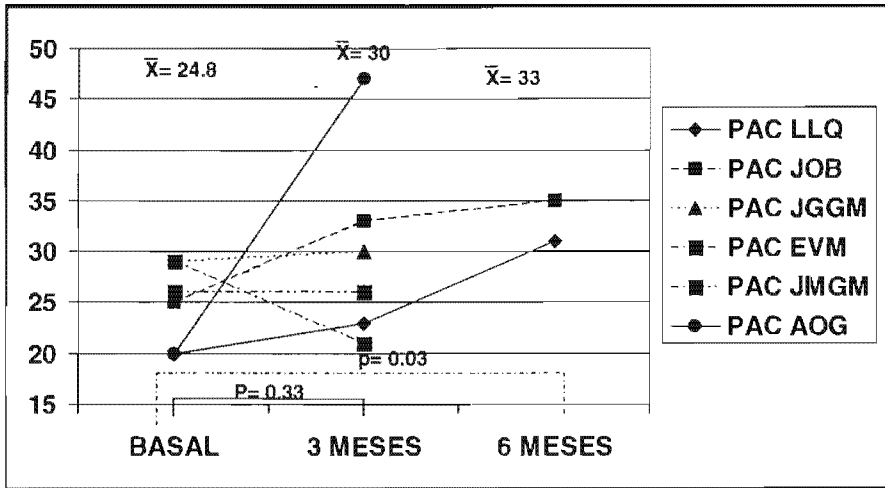


Figura 10.- Evolución de la FEV1 por medicina nuclear a 3 y 6 meses.

Clase funcional

La prueba de caminata de 6 minutos basal demostró un consumo de 2.5 mets, frecuencia cardiaca (FC) inicial de 74 ± 12.9 latidos por minuto (lpm), FC máxima de 103.6 ± 13.20 lpm y FC en recuperación de 69 ± 6.85 lpm, con una distancia realizada de 416.20 ± 20.54 mts. Nuestros pacientes antes del procedimiento, 33% cursaban con clase funcional III de NYHA, y el 66% en clase funcional II (Fig.11).

En el seguimiento a 3 meses se obtiene una FC inicial de 68.5 ± 9 lpm, menor a basal con $p= 0.37.14$ lpm (Fig. 12), FC máxima de 92.75 ± 19.63 lpm ($p= 0.16$), con un mismo consumo de mets (2.5), distancia de 454 ± 20.54 mts, en donde se demuestra un incremento ($p= 0.58$). Mantienen misma clase funcional, respecto a la basal. En el seguimiento a 6 meses de 2 pacientes se obtiene un incremento en la distancia de 416.20 ± 20.54 a 454 ± 25.1 mts, alcanzando una $p= 0.004$ (Fig. 13)

Respecto a la escala de Minnesota para evaluar la calidad de vida en la insuficiencia cardíaca realizada antes del procedimiento de trasplante, arrojó una puntuación de 48.33 ± 18.60 , correlacionándola con la CF III de la NYHA.

En el puntaje de la escala de Minnesota, obtenido a 3 meses posterior al procedimiento, los ubica en 15.50 ± 18.78 y con ello se correlaciona con la CF I de la NYHA (Fig. 14), encontrándose significancia estadística ($p < 0.0001$)

En el seguimiento que se realiza a cada uno de ellos, hasta el momento actual, permanecen sin internamientos, sin descompensaciones, con recuperación clínica, en la autoestima, en la capacidad de mantener actividades de forma independiente. Hasta el momento no se han presentado defunciones durante éste periodo.

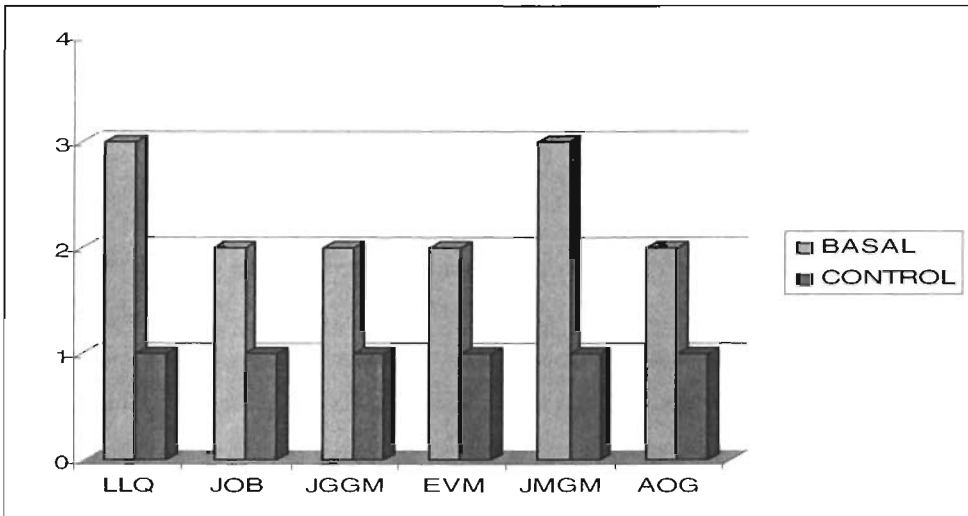


Figura 11.- Clase Funcional NYHA antes del procedimiento y a 3 meses

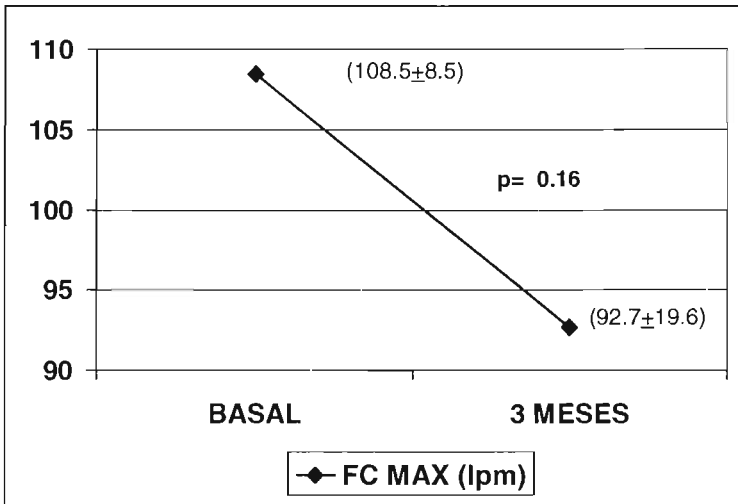


Figura 12.- Representa la disminución a 3 meses de la FC máxima del grupo de pacientes (p= NS).

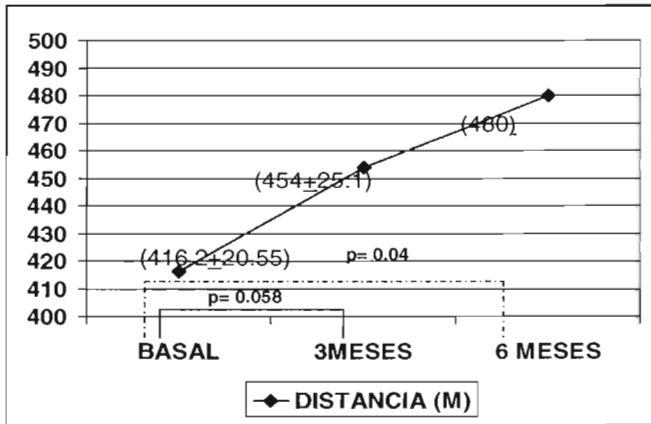


Figura 13.- Caminata de 6 Minutos al inicio y en el seguimiento a 3 y 6 meses en pacientes sometidos a implante de células autólogas. A 6 meses se observa $p=0.04$.

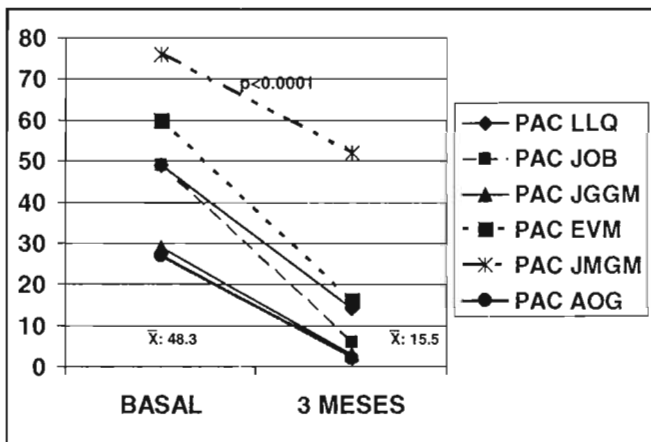


Figura 14.- Clase Funcional Evaluada por Cuestionario de Minnesota antes del procedimiento y a 3 meses de seguimiento.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados preliminares sugieren que el implante de células madre, autólogo, mediante la aplicación intramiocárdica de células CD34, es un procedimiento seguro y factible en pacientes con cardiomiopatía dilatada de etiología no isquémica. No hubo ninguna complicación durante el procedimiento quirúrgico mayor (sólo arritmias no sostenidas, condicionadas por la manipulación e inyección del material autólogo), ni durante la estancia hospitalaria de etiología cardíaca. Se requirió de un internamiento por neumonía, sin complicaciones. Este valor agregado al procedimiento, representa una considerable mejoría repercutiendo en la adecuada evolución clínica de cada paciente.

Considerando que los pacientes con CMD, presentan un deterioro progresivo, es de llamar la atención que previo al procedimiento presentaban un internamiento medio de 0.7, y que posterior a el trasplante, ningún paciente lo ha requerido. Ante esto los resultados ecocardiográficos demuestran que existe mejoría en la FEVI, siendo notoria hasta los 6 meses del seguimiento, así como una tendencia a mantener los diámetros diastólico y sistólico del ventrículo izquierdo, así como del volumen sistólico final, e incluso; la disminución de los mismos, aunque en rangos no significativos, y con ello pudiera originarse un retraso en la progresión de la enfermedad, la cual como se ha mencionado por Chukshik, posee una mortalidad de hasta el 50% al año de efectuado el diagnóstico y hasta del 80% a los 2 años¹. En cuanto a la evolución de los parámetros ventriculares por ecocardiografía, nos hace albergar esperanzas, sobre la posibilidad de que un tejido cardíaco, con fibrosis intersticial y perivascolar, con mayor cantidad de colágena, con

hipertrofia de la media, proliferación muscular de la íntima, degeneración endotelial, con alteraciones en la forma y geometría del miocito, que se creía irreversiblemente dañado, pudiese recuperar su función y con ello lograr cambiar la historia natural de la enfermedad en cuanto a la dilatación, ya que por conducta normal de la misma, la progresión es continua y eso representa un deterioro del paciente, llevándolo a la muerte por insuficiencia cardíaca congestiva o arritmias. Si bien, pudiera considerarse que los efectos producidos por las células madre CD34⁺ trasplantadas, en la insuficiencia cardíaca crónica producida por cardiomiopatía dilatada, pudieran deberse a los resultados que Ohno y Nagoya presentan en donde reportan los efectos de inducción, miogénesis, angiogénesis y neovascularización, así como diferenciación de las células madre en cardiomiocitos, células de músculo liso y del endotelio vascular. Incluyendo mayor liberación de péptidos antiapoptóticos y angiogénicos como factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento del hepatocito (HGF), adrenomedulina (AM) y factor de crecimiento ligado a insulina (IGF-1); ésta última hormona mediadora de crecimiento miocárdico. La AM es un péptido vasodilatador y cardioprotector que previene la apoptosis del cardiomiocito a través de la vía fosfatidilinositol 3-cinasa/Akt dependiente, y tiene un potente efecto angiogénico. La AM inhibe la proliferación de fibroblastos a través de la vía dependiente de cAMP. Su administración inhibe el remodelado cardíaco y mejora la función cardíaca en el corazón insuficiente.

Los cambios hemodinámicos presentados en ambas series, consistieron en la disminución de la presión diastólica final de ventrículo izquierdo, y aumento en la dP/dt , además de observarse aumento en la fracción de acortamiento y disminución en los diámetros

diastólicos del ventrículo izquierdo. La reducción de la fibrosis miocárdica se hizo patente mediante la disminución de la fracción de colágeno demostrada por la menor expresión de metaloproteinasas 2 y 9, disminuyendo con ello el remodelado extracelular que juega un papel crucial en la fibrosis que involucra a los pacientes con CMD y la insuficiencia cardíaca^{27, 39, 42, 43}.

Las células madre pueden mejorar y recuperar la función del miocardio infartado o insuficiente por varios mecanismos potenciales, incluyendo mejoría directa o indirecta de la neovascularización. Los factores paracrinos liberados por células progenitoras pueden inhibir la apoptosis, afectando el remodelado o mejorando la reparación endógena. La diferenciación en cardiomiocitos puede contribuir a la regeneración cardíaca. La acción potencial de los factores paracrinos de la terapia celular podría sugerir que incluye efectos inmunomoduladores, como se ha mostrado por las células madre mesenquimales y otras señales que modulan la cicatrización y el remodelado. Adicionalmente los efectos paracrinos disminuyen la muerte celular directamente, tanto en el infarto agudo como en la falla cardíaca crónica, independientemente de su causa²⁷. Una explicación de éste principio es el descubrimiento de la timosina β_4 , una proteína que promueve la migración celular, supervivencia y reparación, a través de la vía de Akt⁴¹. Todos estos factores pudieran considerarse como los causantes directos de la mejoría en los parámetros ecocardiográficos reportados, así como el sostenimiento de los diámetros y volúmenes del ventrículo izquierdo y el incremento en la fracción de expulsión, que reportamos en nuestra serie, la cual, aunque es muy pequeña, no nos permite realizar afirmaciones rotundas, pero sus resultados sugieren que el implante de células madre CD34, aumenta la capacidad de

respuesta del miocardio y la regeneración del mismo, y por tanto, podría incrementar la capacidad de esfuerzo de los pacientes, así como también, repercutiendo en la progresión de la enfermedad y con ello cambiando su evolución con el desenlace final de bienestar e incremento en la sobrevida para nuestros pacientes.

En nuestro estudio observamos una tendencia a la mejoría en el patrón de isquemia, reportada con respecto al basal, correlacionándose con los reportes existentes de que la CMD presenta defectos de perfusión que van desde el 40 al 80%, y cuanto mayor sea éste defecto, genera un incremento en la mortalidad. Nosotros evidenciamos que existe tendencia hacia la mejoría en la reducción de isquemia a 3 y 6 meses, aunque no alcance significancia estadística, debido a que nuestra serie reportada es muy pequeña; consideramos que de incluir a más pacientes en el procedimiento, se podría objetivizar dicha recuperación y disminución del grado de isquemia. Esto se viene demostrando desde 1991 por Doi y Chikamori ^{44, 45}, quienes encontraron defectos de la perfusión e isquemia, revelando en su estudio, que a mayor grado y severidad de dicha isquemia, la mortalidad se incrementa, principalmente por arritmias, llegando a presentarse hasta en el 80% con trastornos severos de la perfusión y principalmente por taquicardia ventricular y condicionadas por alteraciones microvasculares, concluyendo que de existir defectos graves revela una sobrevida a 1, 3 y 5 años del 84%, 76% y 34% respectivamente. Por tal motivo, consideramos que si la tendencia se mantiene, como observamos en nuestro estudio reportado, incidimos directamente sobre la mortalidad y con ello logramos aumentar la sobrevida de nuestros pacientes. Esto a mención que de nuestra serie reportada, el 66% de los pacientes presentó en el estudio de perfusión trastornos severos, reportados como

isquemia severa e incluso zonas de necrosis. Los cambios generados a partir del tratamiento en nuestro paciente que presentó reducción de FEVI, diámetros y volúmenes, así como en la perfusión, nos sugiere la posibilidad de que a menor grado de progresión de la enfermedad, los resultados son más favorables, sin embargo, es una hipótesis que no podemos probar y se tendrá que responder en estudios controlados, para evaluar a los pacientes receptores del procedimiento y en quienes se esperaría mejor respuesta al tratamiento.

En cuanto a la perfusión miocárdica, diferentes estudios han sugerido que se debe a la regeneración de la microcirculación o de la función celular. Refieren que existe mejoría en la perfusión, contractilidad, disminución significativa del volumen sistólico final, así como mejoría en la contractilidad regional y global, reportando mejoría del 7 al 9% de la FEVI. Mediante gated-SPECT se ha observado que poco más de la mitad de los pacientes con infarto lateral y hasta el 28% de pacientes con infartos anteriores, presentaron un incremento >5% de la FEVI entre una primera determinación practicada antes del alta hospitalaria y al cabo de 12 meses, sin que el tratamiento farmacológico pudiese explicar esta mejoría ^{27, 28, 29, 30, 31}.

Nuestro estudio arroja una tendencia a la disminución de la isquemia por regiones, así como en la carga isquémica total. Nuestro reporte en cuanto a la fracción de expulsión por medicina nuclear, coincide con lo expresado en las series de pacientes isquémicos al incrementarse de manera optimista a los 3 meses del seguimiento, pero su comparación a los 6 meses, alcanza la significancia estadística de $p= 0.03$, representando uno de los

objetivos del presente estudio. Sin embargo, la diferencia entre los pacientes isquémicos y los nuestros, radica en que nuestra serie representa a pacientes con CMD, situándolo como el único estudio con éste tipo de pacientes, en el contexto del trasplante celular autólogo y que representa una mejoría para éste grupo de pacientes, los cuáles, al presentar mejoría en la función cardíaca y la clase funcional y disminución de la isquemia miocárdica, hacen que en conjunto, cambie de forma radical el pronóstico de vida y calidad de la misma.

Nuestros resultados en cuanto a la clase funcional demostrada por prueba de caminata de 6 minutos, además del resultado de evaluación de la calidad de vida por el cuestionario de Minnesota, arrojan datos objetivos sorprendentes, ya que dentro de los parámetros que alcanzan representación estadística, corresponden a la disminución en la frecuencia cardíaca máxima para la finalización de dicha prueba, en donde además, se observa, mejoría importante en la distancia alcanzada, lo cual hace objetivo que el paciente realiza un menor esfuerzo, para recorrer una mayor distancia y con ello la respuesta al ejercicio es mejor, así como su tolerancia. Además, estos pacientes realizan una mayor actividad física, incluso laboral, ya que 3 de nuestros pacientes (50%) se han incorporado a la vida productiva, sin limitaciones y con un rendimiento mayor a la basal que les condicionó el retiro temporal, incapacidad laboral prolongada y limitación de actividades ordinarias. Es importante recalcar que los pacientes además de haber mejorado, en cuanto a la clase funcional y la calidad de vida, disminuyeron la cantidad de fármacos y dosis de los mismos, para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, disminuyendo con ello, los efectos colaterales que representaba su ingestión crónica y sostenida.

Tomando en cuenta que en pacientes con IC avanzada, los síntomas y la calidad de vida tienen mayor importancia que la duración de la vida misma, los resultados favorables de ésta mejoría son importantes de mencionarse por la importancia que representa. Por otra parte, las puntuaciones obtenidas en el cuestionario de Minnesota por nuestros pacientes, guardan una relación importante, con respecto a otros aspectos significativos, como su situación clínica, además de su clase funcional, y el número de ingresos o internamientos por año. A esto último encontramos que los pacientes disminuyeron a cero el número de internamientos por descompensación de la insuficiencia cardíaca hasta el periodo comprendido de seguimiento de 7.5 ± 4.41 meses, y ello permite una reducción en cuanto a los costos por insuficiencia cardíaca. Consideramos que la aplicación de éste procedimiento de trasplante celular, a un número mayor de pacientes, nos llevaría a una significancia estadística importante, ya que las tendencias arrojan el beneficio esperado.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados preliminares sugieren que el trasplante celular autólogo de células madre es un procedimiento seguro y factible. Los resultados coinciden con los estudios reportados en cuanto mejoría en la perfusión, disminución de la isquemia, mejoría en la contractilidad y fracción de expulsión ventricular izquierda. Ha aumentado la clase funcional en todos ellos, evidenciado por mejoría clínica, incremento en el número de actividades realizadas y acoplamiento a un mejor estilo de vida previo al procedimiento. Es importante mencionar que en la tendencia a largo plazo, el procedimiento pudiera incrementar la sobrevida de éstos pacientes, así como retrasar su progresión. Sin embargo, tenemos la responsabilidad de seguirlos en el mediano y largo plazo para conocer su evolución y la probable presencia de complicaciones tardías, hasta ahora no conocidas, ya que éste trabajo, es el primero en su tipo en nuestro medio respecto a pacientes con insuficiencia cardíaca, en el contexto de la cardiomiopatía dilatada y con daño miocárdico severo y da pie a que se incremente el interés de parte de nuestro grupo de estudio en continuar con la terapia de trasplante celular.

Debemos ser prudentes con los resultados y reconocer que el apasionante cambio en la cirugía de regeneración celular, dirigida a la prevención o tratamiento de la disfunción ventricular apenas inicia y como se resume en todas las series hasta el momento publicadas existen más preguntas que respuestas. Todavía no se sabe con certeza si las células permanecen en la zona aplicada. En éste sentido, Paganini y cols. han demostrado que los mioblastos no sólo sobreviven en el corazón humano, sino que forman injertos viables. Los estudios realizados en el trasplante celular mejoran la función cardíaca en modelos experimentales y en humanos pero de corazones con enfermedad isquémicas, existiendo

poca información acerca del beneficio potencial en la falla cardíaca crónica, hasta la fecha. El trasplante autólogo de células madre tiene potencial como una estrategia terapéutica nueva para el tratamiento de la cardiomiopatía dilatada. Un punto de interés agregado en éste trabajo, corresponde a que es el primero que evalúa de forma objetiva, en base a la presentación clínica actual de cada paciente, respecto a la calidad de vida, de acuerdo al cuestionario de Minnesota, el cual es el instrumento más utilizado para este fin. Este punto de mejoría significativa en la calidad de vida representa las bases para mantener como programa permanente, para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca crónica secundaria a daño miocárdico severo, por cardiomiopatía dilatada, isquémica, y quizás, en el contexto de las cardiomiopatías restrictivas. Aún es pronto para definirlo, sin embargo, a pesar de que nuestro grupo es muy pequeño, si sobresalen las tendencias hacia la mejoría, y eso representa un arma más en el tratamiento de esta patología denominada, la pandemia del siglo XXI.

Finalmente quedan muchas cuestiones prácticas que solo estudios clínicos aleatorizados podrán responder: ¿se favorecería la regeneración miocárdica con la asociación a fármacos?, ¿cuál es la ventaja terapéutica en la insuficiencia cardíaca crónica?, ¿cuáles son las células madre que deben implantarse?, ¿qué número de células deben implantarse?, ¿cuál es la vía de aplicación ideal?. La terapia de regeneración miocárdica a partir de células madre, representa un cambio drástico para los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica de cualquier etiología, sin embargo, requiere de mayor investigación para poder definir que pacientes son los candidatos ideales, en quienes la respuesta sea más favorable. Por lo tanto, éste tratamiento emerge como una prometedora herramienta en la era de la terapia celular.

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México D.F. a ____ de _____ de 2005

Yo, _____, afirmo que he sido informado del proyecto de investigación "Implante autólogo de células CD34+ en cardiomiopatía dilatada" y doy mi aprobación a los Doctores: Rubén Argüero Sánchez, María de Jesús Nambo Lucio, Rodolfo Castaño Guerra, Guillermo Careaga Reyna, Martín Horacio Garrido Garduño, José Antonio Magaña Serrano y José Angel Cigarroa López, para que tomen las muestras de sangre necesarias, venosa periférica o de médula ósea, para la obtención de linfocitos mononucleares (CD 34⁺) y se procesen para posterior implantación, vía inyecciones; dentro de las paredes de mi corazón.

Estoy conciente que cualquier procedimiento, incluyendo la extracción de una muestra sanguínea, puede tener complicaciones de las que ya he sido informado, asimismo se me han explicado las modificaciones que se producen por el implante celular y los riesgos relacionados, así como que puede generar arritmias graves.

El protocolo de estudio requiere además utilizar información de mi expediente, incluyendo historia clínica y resultados de estudios recientes, por lo que también los autorizo para su utilización, sabiendo que no seré mencionado a manera personal en ningún foro, mantendré mi anonimato y tendré la posibilidad de abandonarlo en el momento que yo lo considere necesario, sin que ello altere de manera alguna mi tratamiento o derechos en el Hospital de Cardiología y en el instituto Mexicano del Seguro Social. Se me ha asegurado que este proyecto de investigación ha sido revisado por el comité local de investigación del Hospital de Cardiología y cumple con los lineamientos establecidos sobre la investigación en seres humanos de la Ley General de Salud (Art. 100 - 103) y lineamientos internacionales sobre las buenas prácticas médicas.

FIRMA

Testigo

Testigo

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Acquatella H. Miocardiopatía dilatada: Avances recientes y tratamiento actual. *Rev Esp Cardiol* 2000; 53(Supl 1): 19-27.
- 2.- MacIntyre K, Capewell S, Stewart S, Chalmers J, Boyd J, Finlayson A, et al. Evidence of improving prognosis in heart failure: trends in case fatality in 66547 patients hospitalized between 1986 and 1995. *Circulation* 2000; 102: 1126-1131.
- 3.- Cleland J, Khand A, Clarck A. The epidemic: exactly how big is it? *Eur Heart J* 2001; 22: 623-626.
- 4.- Stewart S, MacIntyre K, Hole D, Capewell S, McMurray J. More “malignant” than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail* 2001; 3: 315-322.
- 5.- San Martín M, García A, Rodríguez F y Tarot I. Autoinmunidad y miocardiopatía dilatada: situación actual. *Rev Esp Cardiol* 2002; 55(5): 514-24.
- 6.- Braunwald’s Heart Disease. Zipes, Libby, Bonow, Braundwald. Ed. Elsevier Saunders. 7a Edition. Vol 2, p: 1659-1667.
- 7.- Braunwald E, Britow M. Congestive heart failure: Fifty years of progress. *Circulation* 102; IV 14, 2000.
- 8.- Nugent A, Daubeney P, Chondros P, Carlin J, Cheung M, Wilkinson L, et al. The epidemiology of childhood cardiomyopathy in Australia. *N Engl J Med* 2003; 348: 1639-1646.
- 9.- Zimmermann O, Kochs M, Zwaka T, Kaya Z, Moritz P, Bienek-Ziolkowski M, et al. Myocardial biopsy based classification and treatment in patients with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2005; 104 : 92 – 100
- 10.- Moloney E, Egan J, Nelly P, Word A and Cooper L. Transplantation for myocarditis: a controversy revisited. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:1103-10.
- 11.- Kamisago M, Sharma S, DePalma S, Solomon S, Sharma P, McDonough B, et al. Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2000; 343: 1688-1696.
- 12.- Prósper F, Herreros J and Barba J. Perspectivas futuras de tratamiento en la insuficiencia cardíaca: del trasplante de células a la regeneración miocárdica. *Rev Esp Cardiol* 2004; 57(10): 981-988.

- 13.- Tamargo J and López-Sendón J. Bases y evidencias clínicas de los efectos de los nuevos tratamientos farmacológicos en la insuficiencia cardiaca. *Rev Esp Cardiol* 2004; 57(5): 447-464.
- 14.- Herrera E, Herrera J, Rodríguez H, Treviño A, Ibarra M and Torre G. Importancia del factor de necrosis tumoral alfa en la patogenia de la insuficiencia cardiaca. *Rev Esp Cardiol* 2002; 55(1): 61-66.
- 15.- Bosch X, Alfonso F and Bermejo J. Avances en la evaluación diagnóstica y terapéutica de la insuficiencia cardiaca. Del tratamiento tónico-depletivo al trasplante celular y la regeneración miocárdica. *Rev Esp Cardiol* 2004; 57(2): 161-162.
- 16.- Garrido M, Gaxiola A, Castaño R, Méndez G, Argüero R. Reporte de mortalidad de los últimos 6 años de pacientes en espera de trasplante y de la clínica de insuficiencia cardiaca. *Arch Inst Cardiol Mex* 1999; 69(suppl): 44.
- 17.- Mann D and Bristow M. Mechanisms and models in heart failure: The biomechanical model and beyond. *Circulation*. 2005; 111:2837-2849.
- 18.- The antiarrhythmics versus implantable defibrillators (AVID) investigators. A comparison of antiarrhythmic-drug therapy with implantable defibrillators in patients resuscitated from near-fatal ventricular arrhythmias. *N Engl J Med* 1997; 337: 1576-1583.
- 19.- Batista R, Verde J, Nery P, Bocchino L, Takeshita N, Bhayana J, et al. Partial left ventriculectomy to treatment end-stage Heart disease. *Ann Torca Surg* 1997; 634-638.
- 20.- Hassink R, Brutel A, Mummery C and Doevendans P. Transplantation of vells for cardiac repair. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 711-717.
- 21.- Menasché P. Cell transplantation in myocardium. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: S20-28.
- 22.- Ylä-Herttua S and Martin J. Cardiovascular gene therapy. *Lancet* 2000; 355: 213-222.
- 23.- Körbling M and Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair. A new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003; 349: 570-582.
- 24.- Calne R. Prospect for cell-based therapy. *Trans Proceed* 2004; 36: 3183-3187.
- 25.- Menasché P, Hagege A, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357: 279-80.
- 26.- Menasché P, Hagege A, Vilquin J, Desnos M, Abergele E; Pouzet B, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1078-1083.

- 27.- Dimmeler S, Zeiher A and Schneider M. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest* 2005. 115; 3: 572-583.
- 28.- Candell J. El implante de células madre es factible en el ámbito clínico, pero ¿será eficaz? *Rev Esp Cardiol* 2004; 57(3): 191-193.
- 29.- Avilés F, San Román J, García J, Valdés M, Sánchez A, de la Fuente L, et al. Regeneración miocárdica mediante la implantación intracoronaria de células madre en el infarto agudo del miocardio. *Rev Esp Cardiol* 2004; 57(3): 201-208.
- 30.- Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction. (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002. 106: 3009:3017.
- 31.- Wollert JC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breindebach C et al. Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction. The BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364: 141-148.
- 32.- Gerecht S, David R, Zaruba M, Franz W and Itskovitz-Eldor J. Human embryonic stem cells for cardiovascular repair. *Cardiovasc Res* 2003; 53: 313-323.
- 33.- Forrester J, Price M and Makkar R. Stem cell repair of infarcted myocardium. *Circulation* 2003 108: 1139-1145.
- 34.- Losordo D and Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation* 2004. 109; 2692-2697.
- 35.- Askari A, Unzek S, Popovic Z, Goldman C, Forudi F, Kiedrowski M, et al. Effect of strom-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003; 362: 697-703.
- 36.- Frangioni J and Hajjar R. In vivo tracking of stem cells for clinical trials in cardiovascular disease. *Circulation* 2004; 110: 3378-3384.
- 37.- Dowell J, Rubart M, Pasumarthi K, Soonpaa M and Field L. Myocyte and myogenic stem cell transplantation in the heart. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 336-350.
- 38.- Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte death, growth and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res.* 2003; 92: 139-150.
- 39.- Wollert KC, Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res* 2005; 95: 151-163.
- 40.- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705.

- 41.- Bock-Marquette I, et al. Thymosina b4 activates integrin.linked kinasa and promotes cardiac cell migration, survival and repair cardiac. *Nature* 2004; 432: 466-472.
- 42.- Ohno N, Fedak P, Weisel R, Mickle D, Fujii T and Li Ren-Ke. Transplantation of cryopreserved muscle cells in dilated cardiomyopathy: effects on left ventricular geometry and function. *J Thorac cardiovasc Surg* 2003; 126: 1537-1548.
- 43.- Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murukami S, Miyahara Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2005; 112: 1128-1135.
- 44.- Chikamori T, Doi YL, Seo H, Hawamoto A, Akagi N, Madao T, et al. Effects of dipirydamole on left ventricular systolic and diastolic function in healthy young and elderly subjects as assessed by radionuclide angiography. *Am J Cardiol* 1994; 73 (13): 1024-1029.
- 45.- Doi YL, Chikamori T, Tikata J, Yonezawe Y, Poloniecki JD, Ozawa T, et al. Prognostic value of thallium-201 perfusion defects in idiopathic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1991; 67 (2): 188-193.