



---

# **Universidad de Valladolid**

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA, DERMATOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA

**TESIS DOCTORAL:**

**ESTUDIO ALEATORIZADO DE LA TERAPIA CELULAR**

**EN EL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO:**

**ANÁLISIS DE LOS EFECTOS PROLIFERATIVOS DE LA TERAPIA**

**CELULAR SOBRE LA PROLIFERACIÓN INTIMAL Y LA**

**ATEROSCLEROSIS CORONARIA**

Presentada por Dña. Iria Andrea González García para optar al grado  
de doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dr. D. J. A. San Román Calvar, Jefe del servicio de cardiología del  
Hospital Clínico Universitario de Valladolid

Dr. R. J. Arnold, Responsable del área de imagen cardiaca del Hospital  
Clínico Universitario de Valladolid



**D. Jose Alberto San Román Calvar**, Doctor en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid y **D. Roman Josef Arnold**, Doctor en Medicina por la Universidad Julius-Maximilian de Würzburg/Alemania.

**Certifican:**

Que el trabajo realizado bajo nuestra dirección por Dña. Iria Andrea González García titulado "Estudio aleatorizado de la terapia celular en el infarto agudo de miocardio: análisis de los efectos proliferativos de la terapia celular sobre la proliferación intimal y la aterosclerosis coronaria", reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina.

Y para que así conste a todos los efectos oportunos, firmamos la siguiente certificación en Valladolid, 3 de Junio de 2013.

Fdo. Dr. Jose Alberto San Román Calvar

Dr. Roman Josef Arnold



## Agradecimientos

A José Alberto San Román, porque, gracias a su exigencia, a su capacidad para ver sencillo lo difícil y a su sinceridad, este trabajo ha sido posible.

A Roman Arnold, por su cercanía y por ser quien ideó el tema de esta tesis.

A Itziar Gómez, por su generosidad sin límites y por su cariño.

A mis padres, por estar ahí siempre, por su bondad, por no dudar nunca de mí.

A mi hermana, por hacerme reír, y a mi sobrina.

A todos mis compañeros de residencia del Hospital Clínico de Valladolid, porque me llevé de esta ciudad millones de recuerdos maravillosos y porque en cada visita me llevo aún más.



# INDICE GENERAL

<b>Índice de abreviaturas.....</b>	<b>13</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>17</b>
<b><i>INTRODUCCIÓN .....</i></b>	<b>19</b>
<b>El Endotelio.....</b>	<b>21</b>
I.    EL ENDOTELIO SANO.....	21
a.    La estructura de la arteria sana.....	21
b.    La función endotelial.....	24
II.   EL ENDOTELIO ENFERMO .....	28
a.    El inicio de la aterosclerosis .....	28
b.    Evolución de la placa de ateroma .....	32
c.    Complicación de la aterosclerosis .....	38
d.    El paciente vulnerable.....	42
III.  EL ENDOTELIO LESIONADO .....	43
a.    El intervencionismo coronario percutáneo (ICP) .....	43
b.    El endotelio dañado por stent convencional.....	44
c.    El endotelio dañado por stent liberador de fármaco (SLF) .....	48
IV.  EL ENDOTELIO REPARADO.....	54
<b>La terapia celular .....</b>	<b>61</b>
I.    INTRODUCCIÓN A LA TERAPIA CELULAR .....	61

a.	Importancia de la terapia celular .....	61
b.	La historia de la terapia celular: desde el órgano post-mitótico hasta hoy .....	62
c.	Conceptos básicos en terapia celular .....	63
d.	Las células madre residentes .....	66
II.	LOS FACTORES DE CRECIMIENTO .....	68
III.	LAS CÉLULAS .....	71
a.	Las células embrionarias .....	71
b.	Las células madre pluripotentes inducidas .....	72
c.	Las células derivadas de la médula ósea .....	73
d.	Las células madre periféricas: los mioblastos esqueléticos .....	76
e.	Las células madre periféricas del tejido adiposo.....	78
IV.	LA ADMINISTRACIÓN .....	81
a.	El momento de administración de las células .....	81
b.	El modo de administración.....	82
V.	LA IMAGEN .....	84
a.	Seguimiento de las células implantadas .....	84
b.	Métodos para evaluar los efectos de la terapia celular .....	88
VI.	EL CONTEXTO CLÍNICO.....	90
a.	Post-infarto agudo de miocardio .....	90
b.	Cardiopatía isquémica crónica .....	95
c.	Otras miocardiopatías .....	100
VII.	LOS RIESGOS .....	101
a.	Diferenciación inapropiada .....	101
b.	Eventos cardiovasculares mayores adversos .....	102

c.	Anidamiento fuera del miocardio .....	104
d.	Efectos sobre aterosclerosis.....	104
e.	Efectos en la endotelización y la reestenosis .....	107
<b>HIPÓTESIS.....</b>		<b>109</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>		<b>113</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>		<b>117</b>
<b>Introducción .....</b>		<b>119</b>
<b>Protocolo del estudio .....</b>		<b>120</b>
I.	Población del estudio .....	120
a.	Criterios de inclusión .....	120
b.	Criterios de exclusión .....	121
c.	Grupos de tratamiento.....	123
II.	Protocolo de imagen .....	124
a.	Durante el ingreso hospitalario.....	124
b.	Al mes de la randomización .....	125
c.	A los 9 meses de la aleatorización.....	125
III.	Protocolo angiográfico y de revascularización .....	126
a.	Cateterismo prealeatorización.....	126
b.	Cateterismos posteriores .....	130
IV.	Protocolo de extracción medular e implante celular .....	131
a.	Material específico para el implante celular .....	131
b.	Procedimiento de implante.....	132

V.	Protocolo de administración del factor estimulador .....	134
a.	¿Qué es el filgrastim? .....	134
b.	Reacciones adversas significativas descritas .....	136
c.	Contraindicaciones .....	137
d.	Advertencias y precauciones .....	137
e.	Efectos tóxicos / Sobredosificación .....	138
VI.	Protocolo de seguimiento clínico .....	138
a.	Momento de recogida .....	138
b.	Variables recogidas .....	138
VII.	Protocolo de análisis angiográfico .....	139
a.	Unidad de Imagen Cardíaca del ICICOR .....	139
b.	Formación de un experto en análisis angiográfico .....	140
c.	Análisis angiográfico cuantitativo .....	142
VIII.	Análisis estadístico .....	151
	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>153</b>
	<b>Características clínicas basales de los pacientes .....</b>	<b>155</b>
I.	Descriptivo general .....	155
II.	Comparación de las variables no angiográficas .....	160
	<b>Variables cuantitativas del stent .....</b>	<b>162</b>
I.	Situación basal de la arteria responsable .....	162
II.	Situación de la arteria responsable tras la revascularización .....	163
a.	Análisis de subsegmentos en el implante .....	164
b.	Acute gain o ganancia aguda .....	168

III.	Situación de la arteria responsable a los 9 meses .....	169
a.	Análisis de subsegmentos a los 9 meses .....	170
b.	Pérdida de luz tardía .....	173
<b>Variables cuantitativas de la progresión de la enfermedad .....</b>		<b>175</b>
I.	En la arteria responsable y tratada con stent.....	176
a.	Situación al implante del segmento distal de la ARI .....	176
b.	Situación a los 9 meses del segmento distal de la ARI .....	177
c.	Pérdida de diámetro luminal y de referencia.....	177
II.	En una arteria principal diferente a la tratada (contralateral) .....	179
a.	Situación basal del segmento contralateral .....	179
b.	Situación a los 9 meses del segmento contralateral .....	180
c.	Pérdida de diámetro luminal y de referencia.....	181
III.	Subanálisis del efecto del factor estimulador de colonias .....	182
<b>DISCUSIÓN.....</b>		<b>183</b>
<b>Exposición del fundamento del estudio .....</b>		<b>185</b>
I.	El prometedor futuro de la terapia celular y el temido “fenómeno de Jano” .....	185
II.	El análisis cuantitativo angiográfico .....	187
III.	La pérdida de luz tardía .....	189
IV.	Desarrollo del modelo de análisis angiográfico.....	190
V.	Características de nuestro estudio .....	195
<b>Nuestros resultados en contexto .....</b>		<b>195</b>
I.	Estudios con factor estimulador de colonias.....	196
a.	Pérdida de luz tardía en vasos tratados con stent .....	197

b.	Pérdida de luz tardía en vasos no tratados .....	199
II.	Estudios con infusión intracoronaria de células .....	200
a.	Pérdida de luz tardía en segmentos tratados con stent.....	202
b.	Pérdida de luz en segmentos no tratados.....	203
III.	Estudios con terapia combinada .....	205
a.	Pérdida de luz tardía en segmentos tratados con stent.....	205
b.	Pérdida de luz en segmentos no tratados.....	207
	<b>Limitaciones de nuestro estudio .....</b>	<b>208</b>
	<b>Futuras propuestas .....</b>	<b>209</b>
I.	Estudios dirigidos a la reparación endotelial .....	209
II.	Estudios con otras técnicas de imagen.....	210
III.	Estandarización de análisis angiográficos.....	211
	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>213</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>217</b>
	<b>Listado de tablas .....</b>	<b>245</b>
	<b>Listado de figuras.....</b>	<b>249</b>

# Índice de abreviaturas

AAS: ácido acetil salicílico

ACC/AHA: American College of Cardiology/American Heart Association

ARA II: antagonistas del receptor de angiotensina II

ARI: arteria responsable del infarto

BMS: stent convencional (bare metal stent)

CD: conjunto de moléculas para la diferenciación o coronaria derecha

CK-MB: creatinina kinasa isoenzima específica de miocardio

CMMO: célula madre no seleccionada/mononuclear de médula ósea

CMP: célula madre de sangre periférica

CX: arteria coronaria circunfleja

DA: arteria coronaria descendente anterior

EC: enfermedad coronaria

ECG: electrocardiograma

EPC: precursores endoteliales

EPO: eritropoietina

E-selectina: selectina derivada del endotelio

ET-1: endotelina 1

FE (FEVI): fracción de eyección (del ventrículo izquierdo)

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos

G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos

GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos

Hb: hemoglobina

HDL: lipoproteínas de alto peso molecular

IAM: infarto agudo de miocardio

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1

IC: (vía de administración) intracoronaria

ICC: insuficiencia cardiaca

ICICOR: instituto de ciencias del corazón

ICP: intervencionismo coronario percutáneo

IECAs: inhibidores de la enzima convertasa de angiotensina

IL: interleuquina

IVP: arteria interventricular posterior

IVUS: ecografía intravascular

LDL: lipoproteínas de baja densidad

MCD: miocardiopatía dilatada

MIO: mioblastos

MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos 1

M-CSF: factor estimulador de colonias de macrófagos

MLD: diámetro de luz mínimo

MSC: células mesenquimales

NO: óxido nítrico

NYHA: New York Heart Association

OCT: tomografía de coherencia óptica

OM: arteria obtusa marginal

PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PET: tomografía por emisión de positrones

PL: arteria posterolateral

P-selectina: selectina derivada de las plaquetas

RECAVA: red de enfermedades cardiovasculares

RM: resonancia magnética

SDF-1: factor derivado de las células estromales 1

SLF: stent liberador de fármaco

SPECT: tomografía computarizada mediante emisión de fotón único

TCI: tronco coronario izquierdo

TCMD: tomografía computarizada multidetector

TECAM: terapia celular aplicada al miocardio

TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta

TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa

TNK: tenecteplase (fibrinolítico)

TTPA: tiempo de tromboplastina parcial activada

VCAM-1: molécula de adhesión del tejido vascular

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

VEGFR 2: receptor 2 para el factor VEGF

VLDL: lipoproteínas de muy bajo peso molecular



# Resumen

## Objetivos

El objetivo de este estudio es determinar si existe un efecto deletéreo de la terapia celular sobre la reestenosis y la progresión de la aterosclerosis tras un infarto agudo de miocardio con elevación persistente del ST (IAMEST). Se evalúan con angiografía cuantitativa los resultados de tres formas diferentes de terapia celular en un estudio aleatorizado y con grupo control.

## Metodología y resultados

Ciento veinte pacientes con IAMEST fueron aleatorizados a recibir células progenitoras presentes en la fracción mononuclear de médula ósea (CMMO), factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF), ambas terapias o ninguna. Comparamos los cambios angiográficos desde el momento basal a un seguimiento de 9 meses en los segmentos recubiertos de stent o distales a él en la arteria responsable (ARI), así como en otra arteria diferente a la que llamamos contralateral. No se hallaron diferencias entre grupos respecto de la pérdida luminal en segmentos tratados ( $-0.03 \pm 0.5$  vs  $-0.10 \pm 0.5$  vs  $-0.19 \pm 0.4$  vs  $-0.11 \pm 0.7$ ,  $p=0.74$ ). Tampoco se encontraron diferencias en los segmentos distales de los

diferentes grupos frente al control: CMMO ( $0.12 \pm 0.2$  vs  $0.00 \pm 0.2$ ,  $p=0.36$ ), G-CSF ( $-0.08 \pm 0.3$  vs  $0.00 \pm 0.2$ ,  $p=0.67$ ) o terapia combinada ( $-0.07 \pm 0.3$  vs  $0.00 \pm 0.2$ ,  $p=0.76$ ). El análisis de una arteria contralateral tampoco evidenció diferencias significativas entre los cuatro grupos de tratamiento ( $-0.52 \pm 0.3$  vs  $0.04 \pm 0.4$  vs  $0.14 \pm 0.4$  vs  $-0.11 \pm 0.4$ ,  $p=0.09$ ).

## **Conclusión**

Estos hallazgos sugieren que el uso de terapia celular, en cualquiera de los tres métodos evaluados, no está asociado a mayor hiperplasia intimal ni progresión acelerada de la enfermedad aterosclerótica coronaria en un seguimiento a medio plazo.

# INTRODUCCIÓN

---



# El Endotelio

## I. EL ENDOTELIO SANO

### a. La estructura de la arteria sana

#### **Intima o endotelio**

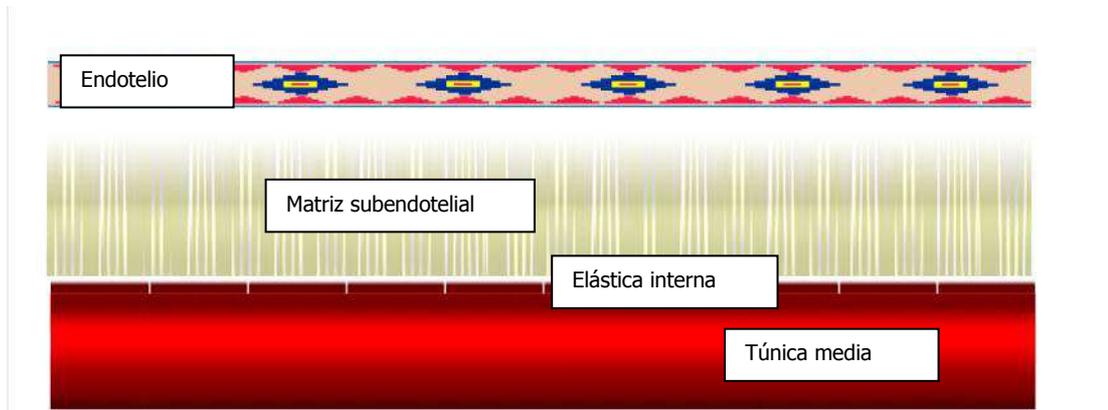
Las arterias sanas tienen una estructura trilaminar. La capa más interna, la túnica íntima, es delgada al nacer. A veces se la define como una fila única de células endoteliales sobre una lámina basal, pero la realidad es más compleja.

La célula endotelial de la íntima constituye el punto crucial de contacto con la sangre. Estas células poseen mecanismos reguladores de radical importancia para la homeostasis y no funcionan adecuadamente si existe enfermedad vascular.

Por ejemplo, la célula endotelial es de las pocas superficies, naturales o sintéticas, capaces de mantener la sangre en estado líquido durante un contacto prolongado. Esta compatibilidad con la sangre tan importante se debe en parte a la expresión de moléculas de proteoglicanos heparan-sulfatos en su superficie. Estas moléculas, como la heparina, sirven como cofactor a la antitrombina III, de modo

que pueda inactivar la trombina. Además, la superficie de la célula endotelial también contiene trombomodulina, que se une a la trombina y ejerce propiedades antitrombóticas activando a las proteínas S y C. Por otra parte, si un trombo se empieza a formar, la célula endotelial normal posee mecanismos fibrinolíticos en su superficie, ya que es capaz de producir enzimas que catalizan la activación del plasminógeno, que se transforma en plasmina, una enzima fibrinolítica<sup>1</sup>.

Esta capa monolaminar de células endoteliales descansa sobre una membrana basal que contiene colágeno no fibrilar (tipo IV), laminina, fibronectina y otras moléculas extracelulares. Con la edad, las arterias desarrollan una íntima más compleja. Aparece un tejido conectivo o matriz subendotelial que contiene células musculares lisas y colágeno del tipo fibrilar (tipos I y III). La célula muscular lisa produce los componentes de la matriz extracelular de la íntima. La presencia de una íntima más compleja, conocida por los patólogos como engrosamiento difuso de la íntima, caracteriza la mayor parte de las arterias de los adultos. En algunas localizaciones tiende a existir un mayor engrosamiento que en otras, incluso en ausencia de aterosclerosis. Por ejemplo, la arteria descendente anterior a menudo contiene un cojinete de células musculares lisas más desarrollado. Este engrosamiento no supone acúmulo de lípidos ni placa de ateroma. La membrana elástica interna sirve de límite entre la íntima y la túnica media, como se ilustra de modo esquemático en la figura 1<sup>1</sup>.



**Figura 1** . Estructura de la arteria sana. La íntima consiste en una capa más interna monolaminar de células endoteliales que descansa sobre tejido conectivo (subendotelial) y que se encuentra separada de las células musculares de la túnica media por la elástica interna.

## Túnica media

Esta capa se encuentra entre la membrana elástica interna y la externa. Su composición varía dependiendo del tipo de arteria. La túnica media de las arteriolas comprende una única capa de células musculares lisas. Las arterias pequeñas, aunque mayores que las arteriolas, tienen una estructura similar pero con una capa más gruesa de células musculares lisas. Estas arterias se denominan *de resistencia* porque contribuyen a la resistencia vascular y, por ello, afectan directamente a la presión arterial. En el extremo opuesto se encontrarían las grandes arterias elásticas o *de conducción*, llamadas así por la alta proporción de elastina en su capa media que les permitiría no sólo mantener su integridad sino acumular la energía cinética de la sístole ventricular<sup>2</sup>. En estas grandes arterias las células musculares lisas se disponen en capas y en las pequeñas arterias de resistencia se disponen sin un orden claramente laminar. Las células musculares lisas de las

arterias sanas rara vez proliferan. En la arteria sana además existe un estado de homeostasis de la matriz extracelular, equilibrándose su producción con su destrucción. La lámina elástica externa forma la frontera con la adventicia<sup>1</sup>.

## **Adventicia**

Normalmente recibe poca atención, aunque recientemente se apunta a su potencial papel en la homeostasis y la patología arterial. Contiene fibras de colágeno. En ella encontramos los vasa vasorum y las terminaciones nerviosas, así como fibroblastos y mastocitos<sup>1</sup>.

### **b. La función endotelial**

El endotelio vascular cumple una serie de funciones en la homeostasis de los vasos sanos. Localizado entre la sangre y las células musculares lisas, el endotelio es capaz de traducir señales procedentes de la sangre y regular el tono vascular mediante la producción de factores humorales vasoactivos<sup>3</sup>.

El endotelio produce sustancias que son potentes vasodilatadores, como el factor relajante derivado del endotelio (EDRF) y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), y sustancias vasoconstrictoras, como la endotelina 1 (ET-1). Normalmente, el endotelio promueve la vasodilatación en respuesta a diferentes

estímulos. La vasoconstricción inapropiada caracteriza la respuesta vascular de pacientes con disfunción endotelial<sup>4</sup>.

La vasodilatación dependiente o mediada por el endotelio tiene lugar tanto en las grandes arterias de conducción como en las pequeñas de resistencia. Este mecanismo se deteriora en presencia de factores de riesgo coronario considerándose la disfunción endotelial una fase muy precoz de la aterosclerosis, previa incluso a su detección por coronariografía. Las arterias sanas se vasodilatan con el ejercicio, de modo que aumente el flujo coronario. Sin embargo, si existe disfunción, el ejercicio puede provocar vasoconstricción paradójica típicamente en el lugar de la estenosis o en segmentos irregulares. También se observa esta reacción tras la administración de acetilcolina o en situaciones de estrés emocional<sup>5</sup>.

### **Los factores vasodilatores producidos por el endotelio**

En las arterias sanas, la vasodilatación derivada del endotelio predomina sobre la vasoconstricción directa de las células musculares lisas. La vasodilatación mediada por el endotelio se realiza a través de dos factores: EDRF y EDHF.

El EDRF es producido por un endotelio intacto y produce vasodilatación mediada por acetilcolina. Ha sido identificado como el radical de óxido nítrico (NO) formado por las células endoteliales por la acción de la NO sintasa. El NO difunde hacia las

células musculares lisas activando la guanilatociclasa intracelular y aumentando el guanosin monofosfato cíclico (GMPc) y, con ello, disminuyendo el calcio intracelular y produciendo la vasodilatación. Una vez liberado de las células endoteliales, el NO tiene una vida media muy corta<sup>6</sup>. La liberación de NO se estimula por productos de la trombosis (trombina), agregados plaquetarios (serotonina, adenosina) y otros estímulos químicos (histamina, bradiquinina). En contraste al NO, los nitrovasodilatadores (nitroglicerina, nitroprusiato) y la prostaciclina actúan directamente sobre las células musculares lisas, independientemente del endotelio<sup>3</sup>. La adenosina, actúa tanto de forma dependiente como independiente del endotelio, aunque a altas dosis predomina la forma independiente del endotelio.

El NO también impide el reclutamiento y la diferenciación de las células inflamatorias mediante la inhibición de la producción de citoquinas y moléculas de adhesión leucocitaria, de modo que la reducción de NO se ha asociado a la activación de placas vulnerables y síndromes coronarios agudos. El mecanismo por el que el NO reduce el reclutamiento consiste en la inhibición de la expresión de genes implicados en este proceso, como son: molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adhesión del tejido vascular (VCAM-1), selectina derivada de las plaquetas (P-selectina) y proteína quimiotáctica de los monocitos (MCP-1)<sup>7-9</sup>.

El NO reduce la entrada de lípidos en la íntima<sup>10</sup>. Por su parte, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) reducen la NO sintasa, al igual que los productos de la degradación de quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)<sup>11</sup>.

La reducción de NO se debe tanto a un descenso de la producción como a un aumento de su destrucción. Esto se ha objetivado en pacientes dislipémicos, hipertensos, diabéticos o fumadores<sup>12-15</sup>.

Por otra parte, la vasodilatación derivada del endotelio también sucede por la hiperpolarización de las células musculares lisas mediante la activación de canales de potasio dependientes de calcio, en respuesta al EDHF<sup>16</sup>. Este factor parece ser mucho más importante en vasos pequeños. Se libera por estímulos similares al NO. El NO inhibe la producción de EDHF. Si disminuye el NO, se mantiene la función vasodilatadora por la regulación al alza de EDHF.

### **Los factores vasoconstrictores derivados del endotelio**

Los factores vasoconstrictores mejor caracterizados son las endotelinas. A diferencia del NO, que se activa e inactiva en segundos, la constricción mediada por la endotelina es de inicio más lento y puede llegar a durar horas. Las endotelinas son estimuladas por la trombina, la angiotensina, la epinefrina, la vasopresina. La ET-1 ejerce su efecto uniéndose a receptores presentes en las células musculares lisas induciendo la constricción y la proliferación. Las partículas de LDL oxidadas son un potente estímulo para la síntesis de ET-1. Las concentraciones plasmáticas de ET-1 están elevadas en la hipercolesterolemia, hipertensión, aterosclerosis, infarto de miocardio e insuficiencia cardiaca<sup>17</sup>.

Por tanto, el endotelio sano es capaz de mantener la sangre en estado líquido y de regular el tono vascular. Veremos en los próximos apartados cómo distintos agentes externos pueden “enfermarlo” o “lesionarlo” y cómo es capaz de generar mecanismos locales y centrales para su “reparación”.

## **II. EL ENDOTELIO ENFERMO**

### **a. El inicio de la aterosclerosis**

#### **Acumulación de lípidos**

Los primeros pasos en la aterogénesis en humanos no están perfectamente definidos. Se cree que pequeñas lipoproteínas se acumulan en la íntima. Estas partículas se agrupan en agregados y son oxidadas y modificadas químicamente<sup>18</sup>.

El LDL de la circulación es capaz de difundir de forma pasiva a través de las uniones intercelulares endoteliales. La tasa de difusión es mayor cuanto mayores sean los niveles de LDL a través de un endotelio con permeabilidad aumentada. Otras fracciones lipídicas también son importantes en la aterosclerosis. La lipoproteína(a) tiene una estructura molecular similar al LDL con una apolipoproteína adicional y es altamente aterogénica, se acumula en la pared arterial de forma similar al LDL y estimula la proliferación de las células musculares lisas<sup>19, 20</sup>.

La acumulación de lípidos subendoteliales, particularmente si están oxidados, es un estímulo para la reacción inflamatoria que inicia y mantiene la activación endotelial. El endotelio activado expresa selectina y otras moléculas de adhesión y quimiotácticas. De hecho, el efecto protector de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) es en parte explicado por su capacidad para bloquear esta expresión<sup>21</sup>.

Es difícil explicar cómo factores de riesgo sistémicos pueden dar lugar a lesiones focales. Hay quien sugiere un origen "monoclonal", como si se tratara de un leiomioma<sup>22</sup>, sin embargo la preferencia por bifurcaciones o tras la salida de una rama sugiere un origen hidrodinámico. El flujo alterado en un punto favorece las fases iniciales de la formación de la placa de ateroma, del mismo modo que un flujo laminar parece prevenirlo<sup>23</sup>.

## **Reclutamiento de leucocitos**

También ocurre en fases tempranas de la aterosclerosis. La célula endotelial normal generalmente resiste interacciones adhesivas con leucocitos. Incluso en tejidos inflamados, la mayor parte del reclutamiento de leucocitos tiene lugar en las vénulas postcapilares, no en las arterias. Sin embargo, existen leucocitos que se adhieren al endotelio y se deslizan por diapédesis entre las uniones celulares, entrando en la íntima y acumulando lípidos en su interior (la futura célula espumosa). Además de monocitos, los linfocitos T también se acumulan en las lesiones ateroscleróticas. La expresión de ciertas moléculas de adhesión en la

superficie de la célula endotelial regula la adherencia de los monocitos y los linfocitos T.

Existen dos tipos de moléculas de adhesión: por un lado las pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, como la VCAM-1 o la ICAM-1, y por otro las selectinas. La VCAM-1 interacciona con una integrina presente en los leucocitos implicados en la aterogénesis<sup>24</sup>. La ICAM-1 es más inespecífica tanto en el tipo de leucocitos con que interacciona como en su localización en la circulación, que es prácticamente ubicua. La E-selectina (del endotelio) recluta preferentemente polimorfonucleares y no parece jugar un papel fundamental en la formación de la placa de ateroma. Sin embargo, la P-selectina sí parece desempeñar un papel importante y se encuentra expresada en mayor cantidad sobre el endotelio de las placas de ateroma<sup>25</sup>.

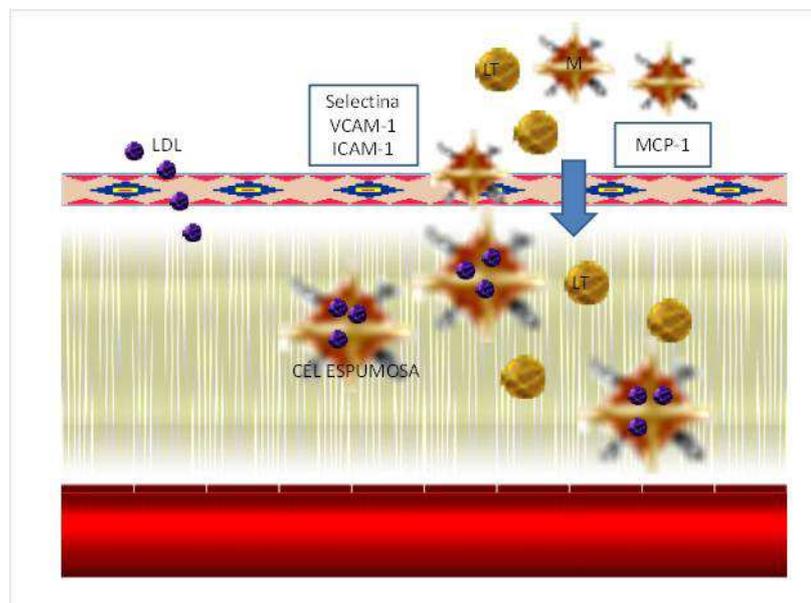
Una vez adheridos al endotelio, los leucocitos reciben una señal para penetrar en la pared arterial. Para que se produzca esto se precisa de factores de quimiotaxis, algunos específicos de monocitos (MCP-1) y otros de linfocitos<sup>26, 27</sup>.

### **Formación de células espumosas. La estría grasa.**

El monocito, una vez reclutado por la íntima, se llena de lípidos transformándose en un macrófago o célula espumosa. Este acúmulo nada tiene que ver con el receptor habitual de LDL sino con otros receptores (depuradores). Una vez

transformados en células espumosas pueden dividirse gracias a moléculas como el factor estimulador de colonias de monocitos<sup>28</sup>.

Histológicamente nos encontramos en la fase de la estría grasa (figura 2). El acúmulo subendotelial de células espumosas y linfocitos T es una fase asintomática y no estenótica. Dependiendo del posterior equilibrio entre factores proaterogénicos y antiaterogénicos, algunas de estas estrías grasas progresarán a ateroma y otras regresarán<sup>29</sup>. En estudios anatomopatológicos postmortem se observa que estas estrías se presentan en la aorta al final de la primera década, en las coronarias al final de la segunda y en la circulación cerebral en la tercera<sup>2</sup>.



**Figura 2.** Primera fase de la aterosclerosis. La formación de la estría grasa. Las pequeñas lipoproteínas LDL difunden a través del endotelio y son oxidadas. Esto estimula la activación del endotelio que expresa moléculas de adhesión (selectinas, VCAM-1, ICAM-1) para la captación de leucocitos que atraviesan el endotelio estimulados por factores de quimiotaxis (MCP-1). Una vez dentro, el monocito se llena de lípidos transformándose en célula espumosa. M: monocitos. LT: linfocitos T.

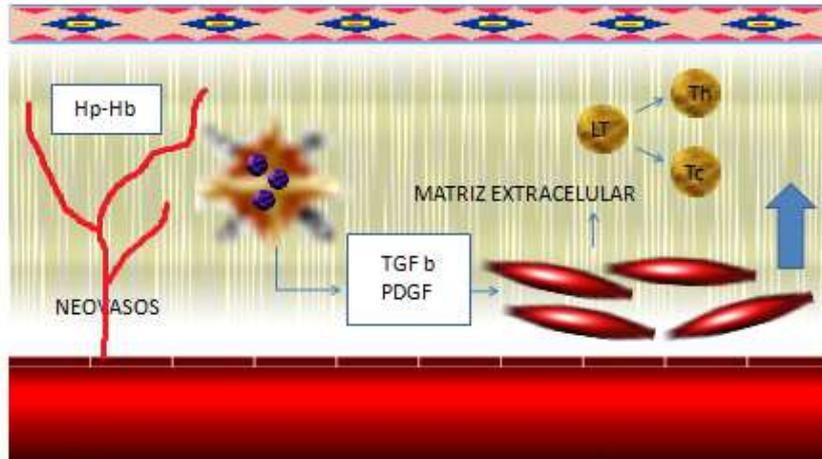
## **b. Evolución de la placa de ateroma**

### **Las células inflamatorias o de inmunidad**

Se ha demostrado el papel principal de la inflamación en la aterogénesis. Existe una inmunidad frente a la placa de ateroma que denominamos innata, sin antígeno desencadenante, y otra adaptativa o mediada por antígeno (figura 3).

Las células espumosas sirven no sólo como reserva de lípidos sino también como fuente de agentes proinflamatorios y factores activadores de plaquetas. Pueden también formar grandes cantidades de agentes oxidantes. Todo ello promueve la inflamación y la progresión de la placa y se considera "inmunidad innata"<sup>30</sup>.

La "inmunidad adaptativa" o mediada por antígeno comienza con la presentación del antígeno por las células dendríticas de la lesión a las células T (como lipoproteínas modificadas) activándolas. A su vez, estas células T activadas liberan citoquinas que modulan la aterogénesis. Las células T helper (CD4) pueden producir citoquinas proinflamatorias (Th1) o antiinflamatorias (Th2). Las células T citolíticas (CD8) expresan factores que inducen la apoptosis y citolisis de células musculares lisas, endoteliales y macrófagos. No queda claro el papel de las células B ni de los anticuerpos (la inmunidad humoral)<sup>30</sup>.



**Figura 3** Evolución de la placa de ateroma. En respuesta a péptidos angiogénicos se generan neovasos frágiles que tienden a romperse. La hemoglobina liberada se une a la haptoglobina (Hp) y es fagocitada por los macrófagos. Los macrófagos activados liberan citoquinas (TGF $\beta$  y PDGF) que estimulan la migración de las células musculares lisas y la producción de matriz extracelular así como activan la inmunidad adaptativa (linfocitos). LT: linfocitos T. Th: linfocito T helper. Tc: linfocito T citolítico.

## Las células musculares lisas

Las células musculares lisas que se encuentran en la túnica media de las arterias sanas, difieren de aquellas que se encuentran en la íntima de la placa de ateroma. Aunque algunas células musculares lisas se encuentran en la íntima tempranamente, la mayor parte proceden de la túnica media atraídas por sustancias quimiotácticas como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) que producen los macrófagos. Las células musculares lisas de la íntima presentan un fenotipo más inmaduro que las células quiescentes de la túnica media. Por ejemplo, presentan más miosina de isoforma embrionaria y contienen más retículo endoplásmico y menos fibras contráctiles<sup>31</sup>.

Estas células musculares lisas pueden dividirse en la íntima durante la aterogénesis. Aunque la replicación de las células musculares lisas es lenta en la placa de ateroma estable, puede dispararse en determinados momentos como cuando se produce la ruptura de la placa con exposición a potentes mitógenos, como la trombina. Por el contrario, puede inducirse la apoptosis de estas células en respuesta a citocinas inflamatorias solubles o por actuación directa de las células T. Existen en el citoplasma un tipo específico de proteasas, denominadas caspasas, implicadas en esta muerte programada celular. La apoptosis está implicada tanto en la progresión como en la regresión de la placa, en sus complicaciones y en el remodelado vascular<sup>29</sup>.

### **La matriz extracelular subendotelial**

Gran parte del volumen de una placa de ateroma avanzada es matriz extracelular. Está constituida por colágenos (tipo I y III), proteoglicanos y fibras de elastina. Las células musculares lisas producen estas moléculas. Los estímulos son: el PDGF (también implicado en atraer a las células a la íntima, como vimos) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). En esta matriz extracelular existe un balance entre producción y destrucción, que llevan a cabo las metaloproteinasas<sup>1</sup>. Estas metaloproteinasas, producidas también por las células musculares, juegan un papel fundamental en la migración de la célula muscular lisa y en el remodelado arterial, de modo que inicialmente se produce un remodelado positivo con crecimiento externo de la íntima y después, cuando el crecimiento de la placa

supera aproximadamente el 40% del área de sección transversal, se produce la estenosis luminal<sup>1</sup>.

## **La angiogénesis en la placa**

La célula muscular lisa no está sola en su proliferación y migración en la placa aterosclerótica. Se generan nuevos vasos en respuesta a péptidos angiogénicos que se producen en la placa. Esta microvasculatura tiene un significado funcional, proporcionando nutrientes y oxígeno y reclutando mayor número de leucocitos (son ricas en VCAM-1). Estos neovasos son más frágiles y tienden a romperse. La hemorragia y la trombosis in situ promueven aún mayor replicación de las células musculares lisas y acúmulo de matriz extracelular.

En ausencia de enfermedad, los vasa vasorum nutren la parte más externa de la arteria y la íntima se nutre por difusión de oxígeno desde la luz. Conforme la íntima se engruesa, los vasa vasorum suponen una fuente cada vez mayor de nutrientes. Los vasa vasorum consisten en una red de pequeñas arterias y venas. En las arterias coronarias, estos vasos se originan desde las bifurcaciones de los vasos epicárdicos<sup>1</sup>.

La neovascularización o la angiogénesis es el proceso por el que se generan nuevos vasos. Los mecanismos moleculares que llevan a esta formación de neovasos se relacionan con la hipoxia. Aunque recientemente se señalan otros

mecanismos independientes de la hipoxia, mediados por inflamación y la activación de receptores Toll-like<sup>32</sup>.

La neovascularización ocurre cuando la íntima se engruesa más allá de las 500 micras. Se sugirió que la angiogénesis favorecía la aterosclerosis mediante el "goteo" de lipoproteínas a la íntima a través de estos microvasos permeables<sup>33</sup> pero la realidad es que la neovascularización ocurre raramente en ausencia de aterosclerosis previa. Se ha visto que puede preceder a la disfunción endotelial, con lo que se deduce que juega un papel fundamental en las fases iniciales de la aterosclerosis. Los neovasos reclutan leucocitos, lo que resulta fundamental para la evolución de la placa y se ha objetivado una menor infiltración leucocitaria en placas calcificadas que tienen menor cantidad de neovasos<sup>32</sup>.

El proceso sería el siguiente (ver de nuevo figura 3 en página 33). La neovascularización desde la adventicia se desarrollaría con el desencadenante de los depósitos de LDL oxidados en la íntima. Los neovasos ayudarían a eliminar estos depósitos siempre que exista un gradiente, es decir, siempre que la concentración de LDL sea menor en la luz del neovaso. Sin embargo, los neovasos permitirían también la salida de eritrocitos (hemorragia intraplaca) atrayendo macrófagos. La permeabilidad de estos vasos está regulada por dos factores: el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) A y la angiotensina II, ambos potentes estimuladores de la permeabilidad<sup>34</sup>.

Tras el acúmulo de lípidos y la hemorragia intraplaca se produce la activación de macrófagos por la hemoglobina (Hb) libre. La haptoglobina (Hp) se une rápidamente a la Hb intentando minimizar el daño. El complejo Hp-Hb se elimina por los macrófagos uniéndose al receptor CD163, el cual puede desencadenar una respuesta proinflamatoria o antiinflamatoria. Esto depende del genotipo de la haptoglobina: Hp-1 resulta en una respuesta antiinflamatoria y Hp-2 en proinflamatoria<sup>35</sup>. Los macrófagos activados estimulan la migración de células musculares lisas así como activan la inmunidad adaptativa, como vimos en los apartados previos. Además, liberarían metaloproteinasas que romperían la cubierta fibrosa precipitando la ruptura de la placa y la trombosis<sup>32</sup>.

En conclusión, los microvasos derivados de los vasa vasorum nutren la placa aterosclerótica y permiten la comunicación permanente entre circulación sistémica y la placa de ateroma, permitiendo que leucocitos y eritrocitos se extravasen y se desencadene la respuesta inflamatoria. La inhibición de la angiogénesis podría tener efectos beneficiosos en el tratamiento de la aterosclerosis.

## **La mineralización de la placa**

Las placas a menudo desarrollan áreas de calcio conforme evolucionan. Algunas células musculares lisas secretan proteínas osificantes<sup>1</sup>.

### **c. Complicación de la aterosclerosis**

#### **La estenosis arterial**

La formación y la evolución de la placa a lo largo de las fases previamente descritas llevan años y normalmente transcurren asintomáticas. Al superarse la capacidad de remodelado positivo, la luz arterial se va viendo comprometida. Esta evolución es discontinua, con periodos de crecimiento y otros de mayor estabilidad. Cuando la estenosis es mayor del 60% puede generar limitación de flujo en situaciones de incremento de la demanda, generando angina estable. Pero en muchos casos de IAM, no existe historia previa de angina y, de hecho, no se relacionan siempre con grandes estenosis con compromiso de flujo<sup>36, 37</sup>.

#### **La placa vulnerable**

El estudio anatomopatológico de pacientes fallecidos por muerte súbita ha permitido definir tres situaciones distintas: ruptura de placa, erosión de placa y la calcificación de la placa (de más a menos frecuente). Consideramos placa vulnerable a aquella que tiende a trombosarse. Podríamos añadir una cuarta situación, aquella que se produce por oclusión aguda en segmentos coronarios tratados y en los que se ha inhibido la reparación (stent recubierto)<sup>38</sup>.

### La rotura de la placa (60-70% de eventos coronarios)

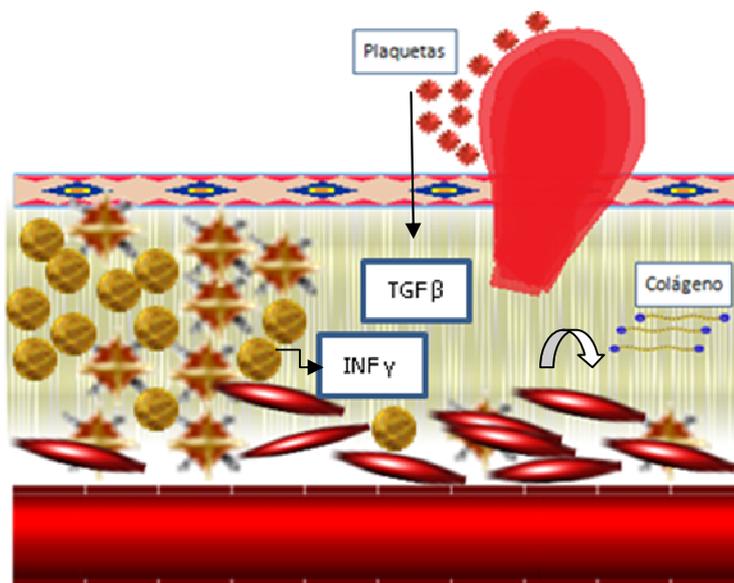
Generalmente se considera placa vulnerable a aquella con un gran núcleo lipídico y con una cubierta fibrótica que sufre un fenómeno lítico, de modo que se establece contacto entre las plaquetas y lípidos y entre los factores de coagulación y el factor tisular (figura 4). Cuanto más fina sea la cubierta será más vulnerable<sup>39</sup>. La cubierta fibrótica de la placa está constituida por colágeno. Un factor que reduce la síntesis de colágeno por las células musculares lisas es la citoquina interferón gamma de las células T. Sin embargo, el TGF- $\beta$  y el PDGF liberados por plaquetas tienden a reforzar la cubierta al incrementar la síntesis<sup>38</sup>. También el catabolismo de la matriz extracelular por las metaloproteinasas contribuye al debilitamiento de la cubierta, a su ruptura y a la trombosis. Son las mismas enzimas que contribuyen a la migración de la célula muscular lisa<sup>1</sup>.

Otra característica de la placa vulnerable es una relativa escasez de células musculares lisas. La pérdida de células musculares en determinados lugares de la placa por inflamación y apoptosis contribuyen a la rotura de la placa, a la vez que la síntesis de matriz es menor<sup>1</sup>.

Por último, otra característica de la placa vulnerable es el gran acúmulo de células espumosas activadas que intervienen en la destrucción de matriz y la apoptosis de células musculares lisas y que, desde un punto de vista biomecánico, forma zonas de "hombro" más propensas a romper. Además, producen factor

tisular capaz de inducir la trombosis tras la ruptura de la placa. El éxito de la terapia hipolipemiante se debe al menor acúmulo de lípidos y la menor inflamación y trombogenicidad de la placa<sup>1</sup>.

Se ha visto que la ruptura de placa puede ser multifocal y suceder en diferentes puntos a la vez y así se ha demostrado por ecografía intravascular (IVUS) en al menos el 79% de los casos. Es decir, existe un proceso inflamatorio sistémico. De ahí, el hablar del paciente vulnerable y del papel fundamental de fármacos como los inhibidores de los receptores plaquetarios IIbIIIa (fármacos antiIIbIIIa) en vez de únicamente la terapia mecánica focal<sup>38</sup>.



**Figura 4.** Placa de ateroma complicada. La rotura de la placa. Se produce un acúmulo importante de células espumosas que activan la inmunidad adaptativa. Las células T activadas liberan  $INF\gamma$  que inhibe la síntesis de colágeno por las células musculares lisas, haciendo que la cubierta de la placa sea más fina y vulnerable. La rotura de la cubierta fibrótica pone en contacto las plaquetas y el núcleo lipídico. El contacto de los factores de coagulación con el factor tisular induce la cascada de la coagulación. Por otra parte, la  $TGF\beta$  liberada por las plaquetas induce la producción de colágeno.

### La erosión de la placa (30-40% de eventos)

Este proceso es menos conocido y fue identificado por el grupo de Virmani<sup>40</sup>. Corresponde a un grupo diferente de pacientes (jóvenes, fumadoras, mujeres, con mayor índice de hipertrigliceridemia y diabetes mellitus). Se produce una erosión del endotelio en placas ricas en células musculares lisas y proteoglicanos y pobres en células inflamatorias y calcificaciones. El mecanismo no está claro.

### La calcificación de la placa

Este proceso fue descrito por el mismo grupo a raíz de los estudios anatomopatológicos<sup>40</sup>. Se observó trombosis luminal en placas con solución de la continuidad endotelial donde se observó protusión de nódulos calcificados y ausencia de células inflamatorias.

### Trombosis arterial en segmentos tratados

Con el objetivo de minimizar la reestenosis tras la angioplastia se utilizan estrategias que inhiben la reparación de modo que favorecen, como hemos visto, la trombosis. La lesión tratada presenta una placa aterosclerótica, con necrosis intimal y con "agujeros negros" (pérdida de neoíntima en los struts del stent). Los stents recubiertos inhiben la reestenosis pero también la reendotelización y dan lugar a la trombosis tardía<sup>38</sup>.

#### **d. El paciente vulnerable**

Este término se introdujo para referirse a un paciente con alta probabilidad de sufrir un evento cardíaco. La aparición de varias placas rotas simultáneamente en estudios anatomopatológicos sugiere un proceso sistémico de "vulnerabilización". Y sin embargo, son evidentes los beneficios de tratar las lesiones focales limitantes de flujo mediante técnicas de revascularización percutáneas o quirúrgicas<sup>41</sup>.

Se han buscado biomarcadores plasmáticos de vulnerabilidad. La proteína C reactiva de alta sensibilidad parece identificar a aquellos pacientes con mayor riesgo independientemente de los valores de colesterol. Otros biomarcadores son: citoquinas (IL-6, IL-18), LDL oxidados, glutatión peroxidasa, la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína, la fosfolipasa A2 secretora tipo 2, mieloperoxidasa (MPO), metaloproteinasas de matriz (MMPs), la MCP-1, el factor de crecimiento placentario (PIGF), la proteína plasmática asociada al embarazo A (PAPP-A) o el CD40 ligando soluble<sup>42</sup>.

Los métodos de imagen no invasivos para la identificación de placas vulnerables se han centrado en las carótidas (de mayor tamaño, sin movimiento y más superficiales). Así, el grosor de la íntima por ultrasonidos o el tejido rico en lípidos por resonancia magnética (RM) son sugerentes de vulnerabilidad. El movimiento del árbol coronario hace que actualmente la técnica no invasiva más prometedora sea la tomografía computarizada multidetector (TCMD), si bien todavía no es capaz

de discernir del todo con fiabilidad qué placa resulta más vulnerable. Otros métodos invasivos para la determinación de la morfología de la placa coronaria son la técnica de IVUS y la tomografía de coherencia óptica (OCT)<sup>41</sup>.

### **III. EL ENDOTELIO LESIONADO**

#### **a. El intervencionismo coronario percutáneo (ICP)**

La revascularización percutánea con stent ha suplantado a la intervención quirúrgica en muchas ocasiones y sus resultados dependen de las características del paciente, de la anatomía coronaria y del procedimiento.

La angioplastia con balón supone la rotura y aplastamiento de la placa de ateroma con expansión de la lámina elástica externa y la redistribución axial de la placa a lo largo del vaso. Este beneficio inicial es contrarrestado por el retroceso elástico precoz y el remodelado negativo crónico del vaso en el sitio tratado. El stent es una prótesis endoluminal capaz de sellar disecciones y oponerse al retroceso elástico y al remodelado negativo mejorando los resultados del balón.

Sigwart y col fueron los primeros en implantar stents en arterias coronarias de humanos en el año 1986<sup>43</sup>. El grupo promotor del stent de Palmaz-Schatz desarrolló dos estudios aleatorizados multicéntricos en 1994 demostrando menos

disecciones residuales, mayor ganancia luminal y menor pérdida de luz tardía con implante de stent que sin él<sup>44, 45</sup>.

Desde la introducción de los stents el problema ha cambiado. Ahora la pérdida de luz se produce por engrosamiento neointimal dentro del stent y se trata de un tejido mixomatoso rico en matriz extracelular con células musculares lisas. Esta proliferación se inicia por un daño mecánico, bioquímico e inmunológico del vaso que supone la erosión del endotelio y su disfunción, la inflamación, y la activación y proliferación de células musculares lisas<sup>46</sup>.

Los stents recubiertos de fármaco emergen como la solución a la reestenosis del stent metálico convencional. La primera aplicación en humanos del stent recubierto de rapamicina fue en 2001 y estudios posteriores apoyaron su eficacia<sup>47, 48</sup>.

## **b. El endotelio dañado por stent convencional**

La súbita distensión de la pared arterial por el balón o el stent ocasiona una lesión en la pared vascular que provoca denudación endotelial, fractura de la placa en el 90% de los casos, con extensión a la capa media en el 80% y depósito de plaquetas. La respuesta a esta agresión tiene lugar durante un largo periodo de tiempo y se manifiesta como hiperplasia intimal, un tipo especial de aterosclerosis<sup>46</sup>.

Los factores de riesgo de mayor reestenosis tras el implante de stent son: la localización (peor resultado en arteria descendente anterior), diabetes mellitus, presencia de estenosis residual, tamaño del vaso, número de stents, longitud del stent, desobstrucciones y lesiones de bifurcación u ostiales<sup>46</sup>.

El proceso reestenótico tiene varios mecanismos fisiopatológicos de diversa trascendencia según se trate de una angioplastia con balón o de la implantación de un stent:

- Retroceso elástico, que ocurre en los primeros 60 minutos tras el inflado y que ocasiona la pérdida de parte de la ganancia inicial, que es debida al componente elástico del vaso y a la lesión aterosclerótica.
- Hiperplasia neointimal con células musculares lisas.
- Acompañando a la proliferación de la íntima se produce un cambio en la sección de la arteria denominado "remodelado negativo", que ocasiona un estrechamiento del vaso que ocurre también a lo largo de los primeros meses postdilatación<sup>46</sup>.

Las arterias tratadas con stent tienen una ganancia inicial mucho mayor que las tratadas con angioplastia con balón debido al andamiaje producido por el mismo, que previene el retroceso elástico. Pero los stents producen un mayor engrosamiento intimal en comparación a la angioplastia con balón.

## **Definiciones y conceptos básicos**

El fenómeno de hiperplasia intimal engloba cualquier célula que forme un compartimento multilaminar internamente a la lámina elástica interna y que exprese de forma permanente o transitoria actina alfa. De este modo incluimos todas aquellas células heterogéneas pero que se asemejan a la célula muscular lisa<sup>49</sup>.

La reestenosis intrastent angiográfica se define como el reestrechamiento de más del 50% del diámetro dentro del stent o en sus 5 mm proximales o distales. Se clasifica según su longitud en focal (<10mm) y difusa (>10mm)<sup>46</sup>.

El concepto de reestenosis tiene el inconveniente de que es dicotómico (sí/no). Por ello se prefiere hablar de "ganancia aguda" inicial (diferencia de diámetro luminal antes e inmediatamente después de la dilatación) y "pérdida de luz tardía" en el seguimiento (diferencia en el diámetro postintervención y en el seguimiento). Ambas variables definidas en valores absolutos en milímetros<sup>46</sup>.

## **Fisiopatología de la reestenosis**

La fisiopatología de la reestenosis implica la acumulación de nuevo tejido dentro de la pared arterial. Este proceso sigue una secuencia que comienza con una fase inicial trombótica que se produce en los tres primeros días, y que es el resultado de la inmediata activación y agregación de plaquetas seguida de la formación de un

trombo rico en fibrina pegado a la masa plaquetaria. En los siguientes 3-8 días se desarrolla una fina capa de células endoteliales acompañada de un intenso tráfico de células inflamatorias (sobre todo macrófagos) hacia el interior de la pared arterial por la producción de moléculas de adhesión y citoquinas por las plaquetas, leucocitos y células musculares lisas<sup>50</sup>.

En una fase más tardía, las células musculares lisas de la media se transforman y migran a la íntima donde proliferan. Allí producen matriz extracelular rica en proteoglicanos y colágenos y el componente celular del neottejido supone finalmente sólo un 11%<sup>50</sup>.

La proliferación y la migración de las células musculares lisas de la media son fundamentales para la reestenosis, puesto que son las productoras de matriz extracelular. Se acepta que las células musculares lisas son células multifuncionales del sistema vascular y que pueden transformarse perdiendo su capacidad de contracción y ser simplemente productoras. Así, constituyen un grupo heterogéneo en el que existe un pequeño grupo que difiere en su comportamiento y fenotipo y que se las considera precursoras, que proliferan y sintetizan matriz siendo la base de la reestenosis<sup>50</sup>.

El papel de la formación de neovasos del que hablamos en el fenómeno de la aterosclerosis no está tan ampliamente estudiado en la reestenosis, pero dado que

ambos fenómenos comparten similares factores de crecimiento, parece lógico pensar que podría estar implicada.

Generalmente el proceso se completa en 20-40 días en los stents convencionales pero se prolonga más allá de los seis meses en los stents recubiertos.

### **c. El endotelio dañado por stent liberador de fármaco (SLF)**

Los stents convencionales no recubiertos reducen el retroceso elástico y el remodelado de la angioplastia con balón. Sin embargo, inducen mayor daño vascular desencadenando mayor hiperplasia neointimal. Se han contemplado diversas sustancias como inhibidoras del proceso de reestenosis (antiinflamatorias, antiproliferativas, factores de endotelización). Los SLF proporcionan una alta concentración local de estos agentes bioactivos en los 30 primeros días tras el implante, que se consideran críticos.

### **Tipos de SLF**

Tras algunos intentos fallidos de evitar la reestenosis, mediante tratamientos sistémicos o mediante radiación local, apareció el SLF<sup>51</sup>. Específicamente, los resultados del RAVEL<sup>48</sup> y SIRIUS<sup>52</sup> llevaron a aprobar el SLF de rapamicina o sirolimus (CYPHER) y los resultados de TAXUS I<sup>53</sup>, II<sup>54</sup> y IV<sup>55</sup> a aprobar el stent recubierto de paclitaxel (TAXUS). La pérdida de luz tardía (a los 6 meses) es menor

en aquellos recubiertos de sirolimus que en los de paclitaxel ( $0.16 \pm 0.3$  mm vs  $0.36 \pm 0.5$  mm)<sup>51</sup>. Ambos stents constan de una plataforma metálica, un polímero biocompatible y una droga antiproliferativa y han demostrado reducir significativamente el grado de reestenosis. Se considera a estos stents la primera generación de SLF y aunque muchos estudios han avalado su seguridad y eficacia a corto y medio plazo, existe aún el debate de su seguridad a largo plazo en relación a las trombosis intrastent muy tardías<sup>51</sup>.

Recientemente ha aparecido una nueva generación de SLF. El primero de ellos, también recubierto de citostático, fue el de zotarolimus (ENDEAVOR) que fue testado en los estudios ENDEAVOR I y II demostrando pocas trombosis muy tardías o efectos adversos en relación a su respectivo stent convencional. Sin embargo, el estudio ENDEAVOR III no logró demostrar la no inferioridad respecto del stent recubierto de sirolimus en términos de pérdida de luz tardía o reestenosis binaria. El estudio ENDEAVOR IV mostró no inferioridad respecto del stent recubierto de paclitaxel<sup>51</sup>.

Otro stent de reciente aparición es el recubierto de everolimus (XCIENCE V) que en el estudio SPIRIT I mostró su superioridad con menor pérdida de luz tardía que el stent convencional y, posteriormente, con el SPIRIT II y III, su superioridad frente al stent recubierto de paclitaxel, con similar tasa de trombosis intrastent<sup>51</sup>.

Finalmente, existen también stents no recubiertos de fármacos citostáticos. El stent GENOUS está recubierto de anticuerpos monoclonales anti-CD34. De este modo captura del torrente de sangre circulante las células progenitoras de células endoteliales y logra una endotelización completa en menos de un mes, evitando así el uso prolongado de terapia doble antiagregante. Su indicación estaría reservada a aquellos pacientes que, por riesgo hemorrágico, requieren una terapia antiagregante menos agresiva<sup>56</sup>.

Las líneas de investigación actuales buscan la combinación de los beneficios de ambos tipos de stents recubiertos. De esta forma, se está intentando desarrollar una plataforma que pueda albergar recubrimientos diferentes en su superficie luminal y en su superficie parietal, de manera que puedan liberar fármacos citostáticos hacia la pared arterial que impidan la hiperplasia neointimal y la subsiguiente reestenosis, y por su cara luminal tengan un recubrimiento capaz de lograr la rápida endotelización completa de los struts y con ello disminuir el riesgo de trombosis aguda<sup>56</sup>.

### **El stent liberador de rapamicina (sirolimus)**

Nos vamos a detener en el stent recubierto de rapamicina, que es el utilizado específicamente en nuestro trabajo. La rapamicina fue aislada por primera vez en un cultivo de *Streptomyces hygroscopicus* y se desarrolló como agente antifúngico<sup>57</sup>. Posteriormente se vio que era un potente inmunodepresor y se usó

en el trasplante renal para prevenir el rechazo del injerto. Después se descubrió que inhibía la proliferación y migración de la célula muscular lisa y lo desarrollaron como agente antirreestenótico<sup>58, 59</sup>.

El stent Cypher (Cordis Johnson & Johnson) consiste en sirolimus (140 microgr/cm<sup>2</sup>) en una amalgama de dos polímeros bioestables (un grosor de 5 micrómetros) que se monta sobre un stent de acero inoxidable Bx Velocity stent. La liberación de sirolimus se ve ralentizada por un polímero que actúa de barrera de difusión, de modo que el fármaco (la mayor parte de él) se libera a lo largo de los primeros 28 días<sup>60</sup>.

## **Reestenosis tras el implante de un SLF**

La reestenosis tras el implante de un stent es una reacción excesiva de reparación del daño vascular. Los SLF han demostrado reducir este fenómeno. Sin embargo, los resultados en la práctica clínica no son tan sorprendentes como en los estudios aleatorizados ya que se han implantado en lesiones y pacientes complejos que no estaban incluidos en estos trabajos (off label). En el registro RESEARCH<sup>61</sup>, se establecieron predictores de reestenosis tras el implante del stent de rapamicina: tratamiento de reestenosis previa, lesiones ostiales, diabetes, mayor longitud, menor diámetro de vaso de referencia, vaso diferente a la descendente anterior. Otro predictor de gran importancia es la falta de expansión completa

(malaposicionamiento). Incluso se ha descrito resistencia celular de ciertos individuos a la rapamicina<sup>62</sup>.

El proceso de reestenosis que se caracteriza por la secuencia de inflamación y proliferación y migración de células musculares lisas se ve interrumpido por el fármaco citostático. Pero también la reendotelización. Tanto las células endoteliales como las musculares lisas que proliferan en la íntima son en parte derivadas de células progenitoras que se movilizan desde la médula ósea a los vasos. Los SLF inhiben la movilización y la diferenciación a células endoteliales y musculares, de modo que no sólo inhiben la reestenosis, sino también la reendotelización, lo que puede llevar a la trombosis tardía del stent<sup>62</sup>.

### **Trombosis intrastent en los SLF**

La trombosis intrastent supone la oclusión aguda de una arteria coronaria, generalmente principal, y se acompaña de una alta mortalidad. La definición de trombosis intrastent varía en la bibliografía. Se ha convenido que es definitiva cuando el diagnóstico es angiográfico o por anatomía patológica, probable cuando se trata de una muerte inexplicable en los primeros 30 días tras el procedimiento o, independientemente del momento, cuando se produce un infarto de dicho territorio arterial sin confirmación angiográfica ni otra causa posible, y posible cuando se trata de una muerte inexplicada más allá de los 30 días<sup>63</sup>.

Según el momento de la trombosis, se dice que es aguda en las primeras 24 horas tras el procedimiento, subaguda entre las 24 horas y el mes, tardía entre el mes y el año y muy tardía si se produce más allá del año. Los SLF la presentan menos en el primer mes respecto de los stents convencionales pero su incidencia es mayor más allá del año<sup>63</sup>.

Como factores de riesgo de trombosis intrastent en los stents recubiertos se encuentran factores relacionados con el paciente, con la lesión y con el procedimiento. Algunos de estos factores son: diabetes mellitus insulín-dependiente, insuficiencia renal, disfunción ventricular, calcificación de la lesión, oclusiones crónicas, bifurcaciones, número de lesiones tratadas, longitud del stent, las disecciones residuales, el flujo coronario disminuido tras la angioplastia, estenosis residuales en los bordes del stent, la mala expansión del stent, el menor calibre del stent<sup>63</sup>.

En estudios anatomopatológicos se ha objetivado la endotelización incompleta del SLF y su papel en la trombosis más allá de doce meses tras la implantación. Otros estudios no invasivos con OCT también han objetivado este fenómeno de lenta endotelización<sup>64</sup>.

## **IV.EL ENDOTELIO REPARADO**

### **La respuesta al daño vascular: local y central**

La pared arterial dañada produce, además de una respuesta local que ya hemos repasado, una profunda respuesta sistémica que implica una cascada de sucesos moleculares y celulares que promueven la reparación de la pared vascular. Esta respuesta incluye la producción de citoquinas y factores de crecimiento, la liberación de progenitores celulares desde la médula ósea y otros órganos, el anclaje de los progenitores a la luz arterial, la integración de los progenitores en un nuevo y rejuvenecido endotelio, y la regulación autocrina, paracrina y endocrina por los progenitores y por el endotelio reparado. La respuesta depende de la capacidad local y sistémica para la reparación<sup>65</sup>.

La inflamación del tejido vascular dañado promueve el reclutamiento de células mononucleares derivadas de la médula ósea. En particular, precursores endoteliales con capacidad intrínseca para la reparación de la pared vascular. Estas células son producidas y liberadas por la médula ósea y otros tejidos en respuesta a señales del tejido endotelial dañado o enfermo. La ausencia o disfunción de estas células supone mayor enfermedad vascular<sup>65</sup>.

## **Los precursores endoteliales (EPC)**

En un pasado reciente, se creía que la diferenciación de células multipotentes a angioblastos y posteriormente su diferenciación a células endoteliales sólo ocurría en el desarrollo embrionario. Pero en 1997 se aislaron en sangre periférica unas células con marcadores CD34+ y receptor para VEGF (VEGFR2/CD309/KDR) que se llamarían precursores endoteliales circulantes (EPC) y que se diferenciaban ex vivo a células endoteliales maduras<sup>66</sup>. Al año siguiente, se pensó en la médula ósea como tejido formador de estos precursores en el adulto<sup>67</sup>. Finalmente, quedaron definidas como células portadoras de los marcadores CD34+ y VEGFR2. Estudios posteriores introdujeron el marcador CD133 (o AC133) como indicador de forma precursora o inmadura de célula endotelial<sup>68</sup>.

Posteriormente se objetivó un origen diverso de los precursores endoteliales, de médula ósea y de otros órganos, y diferencias en su capacidad proliferativa y su aspecto (más o menos fusiforme según su grado de madurez)<sup>69</sup>. Existen además fenómenos de transdiferenciación de otras células a precursores endoteliales<sup>70</sup>. Es difícil actualmente definir la "verdadera" célula precursora endotelial.

## **El papel de los EPCs en la neovascularización**

La neovascularización es la opción terapéutica ideal para rescatar tejidos en peligro por isquemia crítica. El hallazgo de que células derivadas de la médula ósea

podrían asentarse en lugares de isquemia y expresar marcadores endoteliales una vez allí ha empujado a su uso con el objeto de lograr una vasculogénesis terapéutica. Se ha objetivado su capacidad para aumentar la densidad capilar y la neovascularización del tejido isquémico<sup>71</sup>.

En cuanto a los diferentes tipos morfológicos y funcionales que engloban los precursores endoteliales, todos ellos contribuyen a la neovascularización, sin embargo, aquellas células totalmente diferenciadas y maduras (CD34-) no mejoran la neovascularización<sup>72</sup>.

La incorporación de los EPCs en tejidos vasculares sanos es muy baja y se ve incrementada en presencia de lesión. Pero incluso en presencia de lesión, el número de células que se incorporan es relativamente bajo y sin embargo el resultado es evidente. Esto se debe a un efecto paracrino. Es decir, los EPCs liberan factores proangiogénicos. Existe un efecto de incorporación física al tejido vascular y efectos paracrinos que concluyen en una mejora de la neovascularización<sup>71</sup>.

Sin embargo, recordemos que la angiogénesis juega también un papel fundamental en la progresión de la aterosclerosis y, de hecho, existen estudios preocupantes que señalan la posibilidad de que las células precursoras aumenten el tamaño de la placa y su inestabilidad<sup>73</sup>.

## **El papel de los EPCs en la regeneración endotelial**

En el pasado, la regeneración del endotelio dañado se atribuía a la migración y proliferación de células endoteliales vecinas. Estudios más recientes, sin embargo, indican que existe una reparación adicional. Así, se ha visto que injertos de dacron se recubrían por células derivadas de la médula ósea CD34+<sup>67</sup> o incluso con células más inmaduras CD133+ que concomitantemente expresaban el VEGFR2<sup>74</sup>. Walter y colaboradores demostraron que los precursores endoteliales circulantes se asentaban en las zonas desnudas del endotelio tras la dilatación con balón en una arteria<sup>75</sup>. Pero al estudiar en pacientes trasplantados el origen de las células resultó ser tanto del receptor (procedentes de médula ósea) como del donante (células residentes)<sup>76</sup>.

Lo que parece claro es que la rápida regeneración de la monocapa de células endoteliales previene la cascada inflamatoria que lleva a la reestenosis al recuperarse de forma precoz la función endotelial y mecanismos protectores del endotelio como el mediado por el óxido nítrico.

## **La movilización de los EPCs**

Fisiológicamente, se creía que la isquemia era la señal predominante que inducía la movilización de los EPCs desde la médula ósea. De modo que la isquemia incrementaría el VEGF y factor derivado de las células estromales tipo 1 (SDF1) y

que estos, a su vez, inducirían la movilización<sup>71,77</sup>. Existen múltiples factores y fármacos que afectan a la movilización de estos precursores (tabla 1 y 2)<sup>78</sup>.

<b>Estímulo</b>	<b>Respuesta</b>
Edad	Menor supervivencia de EPC Menor movilización y actividad
Estrógenos	Mayor nº EPC
Ejercicio	Mayor nº EPC
FRCV -Tabaquismo -HTA -DL -DM	Menor nº EPC Mayor nº EPC con menor supervivencia Menor nº y peor supervivencia Menor nº EPC
C. Isquémica -IAM -AI -EC severa	Mayor nº EPC Mayor nº EPC Menor nº EPC
Insuficiencia Cardíaca -NYHA I-II -NYHA III-IV	Mayor nº EPC Menor nº EPC
Insuficiencia renal	Menor nº EPC
<b>Fármaco</b>	<b>Respuesta</b>
IECAs	Mayor nº EPC
ARA II	Mayor nº EPC
Estatinas	Mayor nº EPC
Nitratos	Mayor nº EPC
EPO	Mayor nº EPC
G-CSF	Mayor nº EPC

**Tabla 1 y 2.** Relación establecida entre algunos factores clínicos y fármacos con las células precursoras endoteliales. FRCV: factores de riesgo cardiovascular. IAM: infarto agudo de miocardio. AI: angina inestable. EC: enfermedad coronaria. EPC: célula precursora endotelial.

Como vemos, la enfermedad coronaria es reflejo de un déficit de reparación. Sin embargo, cuando la rotura de placa tiene lugar se produce una movilización de progenitores en un intento de reparación, que no es suficiente. De hecho, tras el infarto agudo de miocardio (IAM) se produce en las primeras 2 horas una elevación del número de progenitores circulantes (respecto de la población control) que dura hasta 60 días después del evento<sup>79</sup>.

## **El anidamiento y la diferenciación**

El mecanismo por el que esto sucede no se conoce bien. El primer paso en el anidamiento implica la adhesión de los precursores a las células endoteliales activadas y la transmigración de los precursores a través de la monocapa endotelial. Las  $\beta 2$  integrinas parecen mediar en este proceso de adhesión al endotelio<sup>75</sup>.

Otro aspecto importante es la quimiotaxis. Los factores que atraen los EPCs al tejido isquémico son: SDF-1, mediadores lipídicos y otros factores liberados por células inmunes. En los primeros días tras un infarto se produce una sobreexpresión de SDF-1 con el objetivo de atraer estos precursores<sup>80</sup>, al igual que otros factores como VEGF<sup>77</sup>, MCP-1 o determinadas interleucinas<sup>81</sup>.

Finalmente, el proceso de diferenciación de los EPCs a endotelio funcional también es desconocido, aunque el VEGF, entre otros, parece intervenir en este proceso.

## **El envejecimiento en presencia de factores de riesgo y aterosclerosis**

La reparación arterial puede ser exitosa y completa, de modo que la inflamación que sigue al daño vascular se resuelva. En muchas ocasiones, sin embargo, la reparación es incompleta o patológica y lleva a remodelado de la pared arterial. El remodelado patológico puede llevar a formación de aneurisma, estenosis, reestenosis o disección de las arterias. Con el envejecimiento, en presencia de factores de riesgo cardiovascular, la médula ósea puede “gastarse” y no ser capaz de producir los precursores necesarios para la reparación vascular<sup>65</sup>. Del mismo modo, los niveles bajos de EPC, independientemente de la edad, son biomarcadores de riesgo, más fiables incluso que los convencionales<sup>82</sup>. También están descendidos en la diabetes mellitus y en la artritis reumatoide<sup>83</sup>.

# La terapia celular

## I. INTRODUCCIÓN A LA TERAPIA CELULAR

### **a. Importancia de la terapia celular**

En los países desarrollados, la cardiopatía isquémica supone más de la mitad de todas las muertes de origen cardiovascular. El infarto de miocardio es el mayor componente de esta epidemia y la causa principal de insuficiencia cardiaca. El tratamiento que se ofrece actualmente y que supone la revascularización lo más precoz posible ha mejorado la supervivencia. Sin embargo, menos de la mitad de pacientes que sufren un infarto de miocardio con elevación del segmento ST alcanzan la reperfusión (epicárdica y microvascular) adecuada antes de que el miocardio sea irreversiblemente dañado. Como resultado, una gran proporción de pacientes que sobreviven al infarto están aún en riesgo de desarrollar insuficiencia cardiaca por remodelado ventricular<sup>84</sup>.

Ya que la principal causa subyacente del remodelado postinfarto y la disfunción ventricular es el daño irreversible de la pared infartada, el desarrollo de una terapia regenerativa que permita reconstituir sus componentes musculares y vasculares es muy prometedor. De hecho existen estudios preclínicos y clínicos con terapia celular que acercan cada vez más esta posibilidad. Se ha objetivado una mejoría en

la perfusión y en la contractilidad y la reconstitución del miocardio dañado por células madre, si bien los resultados de los ensayos clínicos en humanos han sido más dispersos y menos concluyentes que los realizados en animales<sup>84</sup>.

### **b. La historia de la terapia celular: desde el órgano post-mitótico hasta hoy**

El concepto de que el corazón es un órgano diferenciado definitivamente, incapaz de reemplazar sus miocitos, ha limitado la investigación en los últimos 50 años. Se consideraba que la reacción del corazón a la sobrecarga de trabajo consistía únicamente en la hipertrofia de los miocitos previamente existentes y que cuando se agotaba la hipertrofia sobrevenía la disfunción ventricular. Se ignoró la posibilidad de que el corazón era capaz de renovarse e incluso hoy hay quien lo mira con escepticismo. Estos antiguos conceptos fueron puestos en duda ante la evidencia de que tras un infarto de miocardio, tras sobrecarga de volumen prolongada e incluso en el corazón insuficiente, existía regeneración tanto en animales como en humanos<sup>85</sup>.

Existe evidencia de la homeostasis cardiaca, los miocitos mueren y otros nuevos aparecen continuamente a todas las edades<sup>86</sup>. Es el desequilibrio entre el crecimiento y la destrucción lo que lleva a la descompensación, la evolución a fallo cardiaco y la muerte. A pesar de las dudas iniciales acerca de la formación de nuevos miocitos aduciendo su confusión con otros tipos celulares (fibroblastos,

células endoteliales) que sí proliferaban, la prueba que resultó más definitiva vino del estudio de corazones trasplantados del otro sexo. Un corazón de mujer implantado en un hombre presenta miocitos y células vasculares con el cromosoma Y (quimerismo), lo que sugiere un anidamiento de células del receptor que migran al corazón donado<sup>87</sup>.

Se ha determinado la presencia de células inmaduras también en corazones no trasplantados que se han definido como células madre cardíacas residentes<sup>88</sup>. La renovación miocárdica es significativa tras el infarto, en la miocardiopatía dilatada y en la estenosis aórtica<sup>88-90</sup>.

### **c. Conceptos básicos en terapia celular**

Se denomina célula madre o troncal a la célula inmadura (que permanece en una etapa temprana de desarrollo), capaz de autorrenovarse (capaz de formar nuevas células madre indefinidamente), clonogénica (capaz de dar lugar a células iguales) y capaz de diferenciarse para producir una progenie de células maduras con funciones específicas bajo ciertas condiciones (microambiente)<sup>84</sup>.

Las células madre pueden dividirse de forma asimétrica dando origen a una célula comprometida madura y otra célula igual a ella que permanece indiferenciada. Las células madre se han clasificado según su potencial de diferenciación en:

- Totipotentes: capaces de dar origen a todos los tipos de células, embrionarios o extraembrionarios (cigoto o mórula).
- Embrionarias o pluripotentes: capaces de dar origen a todas las células del embrión (blastocisto).
- Adultas multipotentes: capaces de dar origen a un subgrupo de linaje de células (ectodermo, mesodermo y endodermo).
- Adultas unipotentes o satélite: sólo capaces de contribuir con un tipo de célula madura (ej: mioblastos).

Antes se consideraba que, previo al nacimiento, las células indiferenciadas iban determinándose y comprometiéndose con la formación de un número cada vez más reducido de tipos celulares. Sin embargo, este concepto también hubo de modificarse al objetivarse transiciones de una línea celular a otra. La habilidad de las células madre del adulto de generar células distintas a las del tejido en que se encuentran constituye un proceso denominado plasticidad. Normalmente, los términos de plasticidad y transdiferenciación son usados como sinónimos. La posibilidad de que exista fusión celular hace dudar de si realmente existe plasticidad, en el sentido de que en la fusión lo que sucede es que dos células, una no comprometida y otra ya diferenciada, forman un híbrido y el destino de esta célula fusionada la determina la célula madura, y no, como tal, una transdiferenciación<sup>85</sup>.

Las células se definen en laboratorio, además de por su funcionalidad y morfología, según sus marcadores de superficie, que son moléculas que expresa una determinada célula en su membrana y que pueden determinarse de forma sencilla para clasificarla (por ejemplo, CD45 es un marcador característico de células hematopoyéticas nucleadas). Las siglas CD hacen referencia a "cluster of differentiation" seguidas de un número en orden cronológico de su descubrimiento. Aquellas que son específicas de una especie se denominan con las iniciales de la especie en inglés.

Se define cardiopoesis al proceso por el que las células multipotentes o pluripotentes se comprometen de forma definitiva con el programa cardíaco. Como exponen Behfar y col, se puede guiar la cardiopoesis si se logran mimetizar las señales cardiogénicas naturales<sup>91</sup>.

Podemos aumentar la supervivencia de las células con diferentes técnicas de pretratamiento. La terapia génica es la introducción de material genético en un organismo para obtener, mediante la producción de proteínas, un resultado terapéutico. Para introducir el gen necesitamos un vector (un virus, un plásmido) que penetre en la célula. Así, podríamos mejorar la supervivencia de las células con el gen de la transcriptasa inversa de la telomerasa o de la proteinkinasa Akt (que dificultan la apoptosis) o con el gen del VEGF<sup>92</sup> (que mejoran la adhesión al vaso). También se puede pretratar las células mediante la administración en cultivo de

moléculas como estatinas, el inhibidor de p38 o los estimuladores de la sintasa de óxido nítrico endotelial.

Del mismo modo puede pretratarse el tejido receptor. El pretratamiento del tejido diana se podría realizar con citoquinas que aumenten el reclutamiento celular como el SDF-1 o el VEGF<sup>93</sup> o mediante ondas de choque<sup>94</sup>.

Los factores de crecimiento son proteínas capaces de estimular el crecimiento y la diferenciación celular, regulando de esta manera procesos celulares de reparación. Estos factores se unen específicamente a receptores en la superficie de la célula donde deben actuar. Algunos son procesados en laboratorio para utilizarlos como terapia biológica. Es el caso del factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF) que promueve el desarrollo de precursores de granulocitos y neutrófilos y moviliza células madre pluripotentes de médula ósea.

#### **d. Las células madre residentes**

En definitiva, tras un infarto agudo de miocardio, el corazón no es capaz de regenerarse a sí mismo. Aunque se creen algunos miocitos, la capacidad de crecimiento del corazón está limitada y es incapaz de reconstituir el miocardio dañado. Pero esto no significa que no exista cierto grado de proliferación sino que es insuficiente para un evento agudo y devastador como un infarto de miocardio. Las células cardiacas residentes progenitoras colaboran en un lento recambio

celular. La cantidad de crecimiento del que es capaz un corazón sometido a sobrecarga es enorme. Hay que buscar estrategias para movilizar las células residentes hacia el territorio infartado para su reparación, y para ello es necesaria la formación de vasos que proporcionen oxígeno a los miocitos para su supervivencia y maduración<sup>85</sup>.

Por tanto, sí existen células madre en el corazón adulto (células madre residentes) capaces de diferenciarse en los principales tipos celulares cardiacos: miocitos, células musculares lisas y células endoteliales vasculares. Estas células sólo suponen una cantidad de 1/10.000 miocitos. Presentan como marcador de superficie c-kit y cumplen las propiedades de la célula madre. Los beneficios de la terapia con células madre externas al corazón se producen en parte por efectos paracrinos que activan las células residentes progenitoras.

Las células madre del corazón se disponen en nichos. Es decir, un conjunto de células inmaduras en el núcleo que conectan externamente con miocitos maduros y fibroblastos por proteínas de adhesión (conexinas y adherinas). Funcionalmente estas estructuras son importantes porque regulan mediante interacciones célula a célula la reparación tisular. La destrucción de los nichos además de los miocitos en el infarto de miocardio dificulta la curación<sup>95</sup>.

De forma similar, en cultivos tridimensionales en suspensión las células progenitoras cardiacas forman cardioesferas. Estas cardioesferas se componen de

células clones c-kit positivas capaces de proliferar en el centro, mientras que en la periferia existen células diferenciadas con marcadores que señalan su compromiso a células musculares lisas (actina alpha), endoteliales (factor de von Willebrand) o mesenquimales (CD105, CD90). El trasplante de cardioesferas en la periferia del infarto ha mostrado reparación tisular en ratones<sup>96</sup>.

## **II. LOS FACTORES DE CRECIMIENTO**

Varias citoquinas hematopoyéticas incluyendo el G-CSF, el factor de las células madre o SCF, la interleucina 3, el GM-CSF (de granulocitos y macrófagos), el M-CSF y la eritropoyetina, han mostrado regular el crecimiento y la diferenciación de los precursores hematopoyéticos.

La G-CSF endógena es una potente citoquina hematopoyética que es producida y liberada por monocitos, fibroblastos y células endoteliales. La G-CSF regula la producción de neutrófilos en la médula ósea y estimula la proliferación, maduración y activación de los neutrófilos. La G-CSF se une a su receptor específico presente en progenitores mieloides, linfoides y células sanguíneas maduras activando cascadas de señales que afectan a la supervivencia y diferenciación celular. La G-CSF también está implicada en la movilización de células progenitoras desde la médula ósea a la sangre periférica<sup>97</sup>. Esta movilización parece intermediada por el factor derivado de las células madre o SDF-1<sup>98</sup>.

Hay una evidencia cada vez mayor de que la movilización de células progenitoras al corazón y su diferenciación a miocitos y células endoteliales es un proceso que tiene lugar de forma natural. Durante un IAM, hay un aumento de precursores endoteliales y un anidamiento en el corazón dañado. Y aunque el mecanismo no está del todo claro, se cree que la administración precoz de las citoquinas implicadas favorecería la recuperación del tejido dañado. Así, se ha visto que el remodelado posterior depende de la capacidad de "movilizar" del paciente, de modo que, en aquellos con insuficiencia cardiaca avanzada, el número de precursores circulantes es menor<sup>99</sup>. El retraso en la administración de factor G-CSF tras el inicio de los síntomas en un IAM ha sido variable en los estudios, variando desde 6.5h a más de 1000h. Las señales de reclutamiento tienen lugar inmediatamente tras el daño y después disminuyen por lo que parece adecuada la administración precoz<sup>99</sup>.

La administración de G-CSF se ha estudiado tanto en el contexto de isquemia crónica como en el del infarto agudo de miocardio. En el contexto de isquemia crónica, Ripa y col han administrado G-CSF con el objeto de inducir la vasculogénesis, con pobres resultados. En el contexto del infarto agudo de miocardio, existen al menos nueve estudios aleatorizados que han evaluado su seguridad y eficacia. La administración del factor ha variado, oscilando de 2.5 a 10 mgr/kg durante 4-6 días, y ha sido bien tolerada. En un estudio inicial se observó una tasa inesperada de reestenosis en los pacientes tratados con factor que llevó a interrumpir el estudio (MAGIC)<sup>100</sup>, pero ensayos posteriores demostraron la

seguridad de esta terapia. Parece existir una mejoría en los pacientes tratados frente al grupo control en función ventricular e índices de remodelado en algunos estudios (FIRSTLINE-AMI<sup>101</sup> y RIGENERA<sup>102</sup>). Sin embargo, los beneficios de esta terapia siguen siendo motivo de controversia<sup>98,99</sup>.

Si tomamos dos de esos estudios con conclusiones enfrentadas observamos algunas diferencias. El estudio FIRSTLINE-AMI concluye que el grupo tratado con G-CSF tras un infarto agudo de miocardio mejora significativamente el grosor y la función ventricular y disminuye el remodelado. El estudio REVIVAL-2 concluye que esta terapia no tiene efecto ni sobre la función ni sobre el remodelado. Ambos concluyen que no existe un mayor índice de reestenosis. Las principales diferencias eran el tiempo de administración y la edad de los pacientes. En el FIRSTLINE-AMI la administración fue muy precoz (una media de 89 minutos tras la reperusión) y los pacientes eran más jóvenes y hay descritas respuestas diferentes en relación a la edad en estudios animales<sup>103</sup>.

Un metaanálisis reciente con un total de 385 pacientes entre 8 estudios analizados no mostró diferencias significativas tras la administración de G-CSF aunque sí tendencia a aumentar la función ventricular y disminuir los índices de remodelado en los pacientes tratados. Sin embargo, sí se observó en el análisis por subgrupos un beneficio significativo en aquellos que presentaban una función basal inferior al 50% y en aquellos que se administraba de forma precoz ( $\leq 37$  horas) tras el infarto<sup>104</sup>.

### **III. LAS CÉLULAS**

#### **a. Las células embrionarias**

La célula embrionaria es pluripotente y, por tanto, capaz de originar las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) y recrear un embrión completo. Suponen la masa celular más interna del blastocisto<sup>105</sup>.

Desde la década de los 80 se ha sabido que las células embrionarias de los ratones podían diferenciarse in vitro a cardiomiocitos<sup>106</sup>. Más recientemente se comunicó la capacidad de células embrionarias humanas de diferenciarse a cardiomiocitos si se inyectaban en ratones<sup>107</sup>. Se ha propuesto la aplicación práctica que pudieran tener las células embrionarias como tratamiento de defectos congénitos cardíacos<sup>108</sup>, pero sobre todo su uso se ha enfocado a tratar el infarto agudo de miocardio, la insuficiencia cardíaca y la miocardiopatía<sup>109</sup>.

Sin embargo, la principal característica de las células embrionarias que es su pluripotencialidad, la capacidad de dar origen a las tres capas germinales, supone también su mayor limitación, por su oncogenicidad. Se han hecho verdaderos esfuerzos en limitar su potencial de desarrollo de modo que deriven únicamente a células cardíacas con pretratamiento con factores de crecimiento<sup>110</sup> o genético<sup>111</sup>.

Varios grupos han comunicado sus beneficios funcionales en el infarto de miocardio en estudios animales<sup>110</sup> y sin embargo, también se ha comunicado el desarrollo de teratomas<sup>111</sup>. Existe además el problema inmune<sup>112</sup> (puesto que se trata de células alogénicas) y el problema ético de uso de embriones. A día de hoy, no es una opción en humanos.

### **b. Las células madre pluripotentes inducidas**

Precisamente para evitar los problemas éticos y de rechazo por el sistema inmune de las células embrionarias alogénicas surgen estas otras células artificiales que derivan de una célula somática adulta. Se ha logrado constituir estas células indistinguibles de las embrionarias mediante la transferencia de un núcleo<sup>113</sup>, mediante fusión celular<sup>114</sup> y mediante la expresión de ciertos genes<sup>115</sup>.

El reciente descubrimiento de que es posible reprogramar la célula somática mediante la transducción con retrovirus de únicamente cuatro genes (Oct3/4, Sox2, c-Myc y KLF4) e incluso prescindir del gen c-Myc obteniendo células que cumplen las propiedades de la célula embrionaria y son más seguras (menos oncogénicas) es un salto importante en la terapia celular<sup>115</sup>. Pero actualmente sigue siendo una opción con muchos interrogantes.

### **c. Las células derivadas de la médula ósea**

La observación en corazones trasplantados de células del receptor en una proporción significativa llevó a la hipótesis de que existían células progenitoras en el adulto procedentes de la médula ósea<sup>87</sup>. Se pensó que estas células poseían la capacidad de migrar, anidar y diferenciarse en miocitos.

Se iniciaron estudios animales con células progenitoras extraídas de médula ósea. Las células progenitoras hematopoyéticas implantadas en corazones de ratón a los que se les había provocado un infarto de miocardio se diferenciaban a cardiomiocitos, células endoteliales o células musculares lisas y mejoraban la función cardíaca<sup>116</sup>, aunque los resultados no fueron siempre tan satisfactorios<sup>117,118</sup>.

En estudios con humanos se ha utilizado frecuentemente la fracción mononuclear del aspirado de médula ósea que contiene diversos tipos celulares y que puede adquirirse fácil y rápidamente, sin previa selección, lo que es importante en la terapia del infarto agudo de miocardio<sup>119</sup>.

En la médula ósea existen diferentes tipos de células madre. La fracción mononuclear del aspirado de médula ósea es heterogénea y contiene diferentes subpoblaciones de estas células troncales. En terapia celular se han utilizado principalmente tres tipos: hematopoyéticas (HSC), endoteliales (EPC) y

mesenquimales (MSC). Se cree que existe un progenitor común para las HSC y los EPC que se denominaría hemangioblasto<sup>71</sup>.

Las HSC clásicamente se diferencian en células sanguíneas, tanto mieloides como linfoides. Parece que pudieran diferenciarse también en cardiomiocitos<sup>116</sup>. Se encuentran en médula ósea y sangre periférica. Presentan marcadores de superficie como CD 34, CD 133, CD45, c-kit (también llamado CD 117 o SCFR), CD 90 low (Thy 1.1), Sca-1 y son negativas para Lin (marcador de línea celular hematopoyética)<sup>120</sup>.

Las EPC se encuentran también en médula ósea y sangre periférica. Existe un continuo debate acerca de su fenotipo y características funcionales. En general se definen como células que coexpresan marcadores hematopoyéticos (CD 34, CD 133) con marcadores endoteliales como VEGFR2 (también llamado CD309 o KDR+) o CD31. La transdiferenciación de EPCs a cardiomiocitos también ha sido descrita<sup>121</sup>.

La existencia de células madre mesenquimales (MSC) en la médula ósea se objetivó en 1966<sup>122</sup> y después se describirían en el cordón umbilical y en tejido adiposo. Las MSC son un pequeño grupo que se puede separar de la fracción mononuclear del aspirado de médula ósea gracias a su capacidad para adherirse al plástico<sup>84</sup> y que presentan como marcadores de superficie CD 105, CD 73, CD 90 (Thy 1) y carecen de CD45, CD34, CD 133, CD14, CD11b, CD19 o HLA DR<sup>84,98,123</sup>.

Tienen que poder diferenciarse en músculo, cartílago, hueso, grasa. Estas células además han demostrado ser capaces de diferenciarse a células endoteliales<sup>124</sup>, musculares lisas<sup>125</sup>, a cardiomiocitos<sup>126</sup> e incluso neuronas tanto in vitro como in vivo<sup>127</sup>. La proporción de células mesenquimales de la médula ósea es muy pequeña (0.01-0.001% de la población de células nucleadas). Presentan la ventaja de que son poco inmunogénicas, lo que es importante en trasplantes alogénicos<sup>119</sup>.

El grupo de Verfaillie describió una subpoblación que precedería al linaje de MSC, llamadas células progenitoras adultas multipotentes (MAPC) que tendrían la capacidad de diferenciarse a las tres líneas celulares. Su existencia ha sido cuestionada por otros grupos. Son negativas para CD 31, CD 44, CD 45, CD 105, Thy 1 (CD 90), Sca-1, E-cadherina (CD324), complejos de histocompatibilidad (MCH I y II) y Lin y expresan altos niveles de c-kit, VLA-6 (CD49f) y CD 9<sup>120,128</sup>.

También se ha descrito otro grupo celular llamado población lateral de células (Side Population cells, SP) o también llamadas HSC altamente enriquecidas que han sido aisladas tanto a partir de médula ósea como de músculo utilizando técnicas de citometría de flujo basándose en la capacidad para excluir el colorante fluorescente Hoescht 33342. Las SP podrían diferenciarse a células con características de músculo cardíaco y endotelio. Son CD34 negativas, c-kit y Sca-1 positivas. Estas células son anteriores a HSC y pueden dar lugar a ellas al hacerse CD34+<sup>129</sup>.

#### **d. Las células madre periféricas: los mioblastos esqueléticos**

La capacidad del músculo esquelético de responder a un daño mediante la proliferación y la diferenciación de células madre se conoce desde hace tiempo. Esta capacidad regenerativa reside en una pequeña población de células mononucleares llamadas células satélites y su progenie de mioblastos esqueléticos, que, en respuesta al daño, proliferan y eventualmente se fusionan para formar miotubos multinucleados y poder así restablecer la normal arquitectura del músculo. Se pensó en el trasplante de mioblastos del músculo esquelético específicamente para la cicatriz del infarto crónico de miocardio por razones prácticas, por un lado su potencial proliferativo en cultivo y su gran resistencia a isquemia ya que al estar parcialmente comprometidas con la línea miocítica no son tan dependientes del microambiente<sup>130</sup>. Además, su preparación requiere mucho tiempo impidiendo su uso en contexto del infarto agudo de miocardio. El cultivo lleva aproximadamente 3 semanas para obtener un número suficiente de células. Tras el cultivo se confirma la presencia de sus marcadores característicos<sup>119</sup>.

Desde las primeras comunicaciones en animales<sup>131</sup>, otros muchos estudios han demostrado la factibilidad de este tipo de terapia celular. Se ha demostrado que los mioblastos trasplantados anidan y se diferencian en miotubos multinucleados adquiriendo algunas características del músculo cardíaco como la cadena pesada de miosina de contracción lenta, pero no se diferencian en cardiomiocitos funcionales o establecen conexión electromecánica con los cardiomiocitos del receptor<sup>130</sup>.

Aunque la mayor parte de los estudios que usan mioblastos esqueléticos se han desarrollado en modelos de infarto crónico también podría ser útil en cardiopatía no isquémica<sup>132</sup>.

Como vías de administración generalmente se ha usado la inyección intramuscular directa quirúrgica pero también podría administrarse intracoronaria aunque no hay que olvidar que, dado el tamaño y la adhesividad de los mioblastos, la administración intracoronaria podría provocar embolia<sup>133</sup>. Otra vía de administración con estas células ha sido la inyección intramiocárdica, pero percutánea endoventricular<sup>134</sup>.

Los estudios preclínicos indican que la mejora en la función tras el trasplante de mioblastos esqueléticos no se debe a la formación de nuevas células contráctiles<sup>130</sup>. El efecto beneficioso es probablemente de mecanismo paracrino, aumentando la angiogénesis y la vasculogénesis, con la excepción de las recientemente descritas células precursoras de cardiomiocitos aisladas en el músculo esquelético de ratones (Spoc) que sí se diferencian in vitro e in vivo a cardiomiocitos<sup>135</sup>. También se ha objetivado la fusión con los cardiomiocitos in vivo, pero el número es demasiado escaso para justificar la mejora funcional<sup>130</sup>.

Quizás la complicación más preocupante del trasplante de mioblastos sean las arritmias cardiacas que se objetivaron con los primeros estudios clínicos con estas células, sin embargo en estudios posteriores no pareció asociarse de forma

significativa. Como mecanismos implicados se ha propuesto que la liberación de factores de crecimiento altera la duración del potencial de acción o que tras el implante las células se mantienen funcionalmente aisladas de las células autóctonas y constituyen un substrato proarritmogénico<sup>136</sup>.

La pérdida de más del 90% de las células trasplantadas en las primeras 48hs tras la inyección intramiocárdica es uno de los mayores problemas. Para intentar minimizar este problema las células han sido pretratadas con antioxidantes (diazóxido), antiinflamatorios o con transducción de genes proangiogénicos. También se han administrado concomitantemente con células de médula ósea que faciliten su anidamiento por mecanismo paracrino o con biomateriales<sup>130</sup>.

### **e. Las células madre periféricas del tejido adiposo**

El tejido adiposo deriva de la capa mesodérmica del embrión y se desarrolla tanto pre como postnatalmente. Microscópicamente, la evidencia más temprana de la existencia de los adipocitos en el ser humano es en el segundo trimestre de embarazo y son similares a fibroblastos. Con la maduración aparecen en su interior acúmulos lipídicos multi o uniloculares.

Macroscópicamente existen al menos cinco tipos de tejido adiposo: grasa blanca (unilocular), grasa marrón o parda (multilocular), grasa de la médula ósea, grasa mamaria y mecánica. En cada uno de ellos la función es distinta. En la médula ósea

la grasa tiene un papel activo y otro pasivo. Por un lado rellena los espacios donde cesa la hematopoyesis y sirve de reserva energética y fuente de citoquinas para los fenómenos de osteogénesis y hematopoyesis. La grasa parda genera calor. En el recién nacido está en los órganos (corazón, riñón, aorta, gónadas) pero desaparece con la madurez. La grasa mamaria provee de nutrientes durante la lactancia y está regulada por las hormonas del embarazo. Los depósitos mecánicos (retroorbitario y palmar) ejercen un soporte mecánico. Finalmente, la grasa blanca sirve de reserva energética y aislamiento térmico. Y cada vez cobra mayor importancia el papel endocrino del tejido adiposo, capaz de secretar adiponectina, leptina, resistina y otras adipokinas.

El contenido de células madre difiere según el tipo de tejido adiposo y su localización. En ratones la cantidad es mucho mayor en la grasa blanca que en la marrón y en humanos se ha visto que es mayor en la grasa del brazo que en el muslo, abdomen o pecho<sup>137</sup>.

El aislamiento de células del tejido adiposo consiste en su incubación con colagenasa y centrifugación con lo que se consigue separar las células adiposas maduras y queda la fracción estromal vascular<sup>138</sup>. Esta fracción contiene una población heterogénea de células circulantes, fibroblastos, pericitos y células endoteliales así como progenitores. Finalmente, se logran aislar en gran medida estos progenitores por adherencia. El inmunofenotipo de estas células es similar a

las células madre derivadas de médula ósea, y son positivas para CD34 a diferencia de las MSC.

Los investigadores han postulado un número de mecanismos por los que las células progenitoras del tejido adiposo pueden regenerar tejidos. La primera de ellas consiste en la capacidad de estas células de producir citoquinas y factores de crecimiento (efecto paracrino) o la capacidad de modular el nicho de células residentes favoreciendo la diferenciación, o proveyendo de antioxidantes, o incluso proporcionando nuevas mitocondrias a la células dañadas.

Se ha considerado no sólo el uso de tejido adiposo autólogo sino también heterólogo. El autólogo tiene la ventaja de su histocompatibilidad, pero no siempre es factible. Las células heterólogas parecen ser compatibles ya que reducen la expresión de complejos de histocompatibilidad, aunque este hallazgo debe ser demostrado por otros estudios<sup>137</sup>.

La plasticidad in vitro de las células estromales del tejido adiposo subcutáneo está bien establecida<sup>139</sup>. Uno de los primeros estudios realizado con estas células en contexto de un infarto de miocardio mostró anidamiento de las células en el miocardio murino<sup>140</sup>. Posteriormente, también se objetivó mejoría de la función ventricular y menor remodelado. Una modalidad consiste en la aplicación de monocapas de células adiposas para la reparación miocárdica que objetivó mejora de la función tras el infarto de miocardio con formación de neovasos y

arraigamiento de las capas<sup>141</sup> con un papel del VEGF fundamental en el proceso de diferenciación<sup>142</sup>.

Dentro de la fracción de células estromales existen células endoteliales y células precursoras capaces de diferenciarse en células endoteliales e incluso en células musculares lisas. Por otra parte, estudios recientes han mostrado que las células madre derivadas del tejido adiposo pueden formar tumores en ratones inmunodeficientes. Por ello, hay que hacer una llamada a la cautela<sup>137</sup>.

## **IV. LA ADMINISTRACIÓN**

### **a. El momento de administración de las células**

El proceso de curación y remodelado del miocardio determina el momento ideal para la administración celular. Tras la necrosis, el miocardio es rápidamente invadido por leucocitos y mastocitos formando una matriz de fibrina cuyo pico se alcanza entre las 24 y 72 horas. Al final de la primera semana se eliminan los miocitos necróticos y se reduce el número de neutrófilos y monocitos, aparece el tejido de granulación en la tercera semana y la cicatriz se encuentra totalmente formada aproximadamente a la sexta.

El anidamiento de las células madre inyectadas dependerá de la presencia de factores de crecimiento y adhesión y de la migración e invasión celular del tejido

infartado. La supervivencia posterior de estas células también depende de la aportación de nutrientes, del microambiente inflamatorio y de las citocinas.

El número de precursores circulantes aumenta rápidamente para descender de forma progresiva hasta la segunda semana. La movilización coincide con la expresión de factores moduladores de la adhesión y la quimiotaxis. Existe un pico precoz de radicales de oxígeno que pueden dañar las células si son administradas muy pronto. Se ha analizado la movilización fisiológica de citocinas inflamatorias y células precursoras tras el infarto que alcanza su pico aproximadamente al séptimo día tras el infarto y con todo ello se sugiere que el mejor momento para el implante es entre el día 3º y el 7º<sup>143</sup>.

## **b. El modo de administración**

El objetivo de cualquier modo de administración de células es conseguir una concentración ideal de células para reparar el miocardio dañado con el mínimo riesgo para el paciente. Vamos a repasar algunos de los métodos utilizados<sup>144</sup>.

### **Intravascular**

#### Intravenoso

Es poco agresivo y se ha descrito la llegada de las células madre administradas al tejido dañado pero en escasa cuantía. De hecho esta forma de administración es

muy dependiente de la presencia de factores quimiotácticos, que se encuentran aumentados en el contexto del infarto agudo de miocardio pero no en la cardiopatía crónica. Pero el verdadero problema es que las células quedan atrapadas en los pulmones, hígado y bazo.

### Seno coronario

Consistiría en canalizar el seno coronario y avanzar un balón de angioplastia en la vena cardiaca según el territorio infartado. Se infla el balón y se inyectan las células. No siempre es posible este acceso por tortuosidad venosa.

### Intracoronario

Es el modo más popular de administración especialmente en el infarto agudo de miocardio. Consiste en interrumpir el flujo con un balón de angioplastia e infundir las células. Este método precisa de citocinas inflamatorias para la adhesión y el anidamiento.

## **Intramiocárdico**

### Transepicárdico

Se utiliza durante la revascularización quirúrgica. La principal ventaja es que asegura un gran número de células inyectadas por área. Es muy invasivo y no alcanza todas las áreas (septo).

### Transendocárdico

Se avanza un catéter desde la femoral hasta el interior del ventrículo izquierdo con un sistema de aguja que permita inyectar en el endocardio elegido las células. La inyección puede guiarse por fluoroscopia o por mapeo electromecánico (con el acortamiento lineal y con el voltaje de cada punto sensado). El mapeo electromecánico permite determinar qué zonas son isquémicas pero viables (poco movimiento, pero voltaje conservado).

### Transvenoso coronario

Consiste en avanzar un catéter hasta el seno coronario e inyectar desde ahí el miocardio. Se puede guiar con ecografía intravascular. De nuevo nos encontramos con el problema de la tortuosidad venosa.

## **V. LA IMAGEN**

### **a. Seguimiento de las células implantadas**

El método ideal de seguimiento debería ser capaz de informarnos del anidamiento, supervivencia y funcionamiento de las células implantadas. Para ello, se precisa del marcaje de las células. Este etiquetado celular se puede realizar de forma directa o "pasiva" (implantando la sustancia a rastrear) o de una forma

indirecta (implantando los genes que producirán la sustancia a rastrear). Estos genes "reporteros" llegan al núcleo celular por transfección con virus que actúan como vectores con capacidad para integrarse en el ADN celular de forma estable<sup>145</sup>. La expresión de estos genes es detectada y señala no sólo la presencia de la célula, sino su viabilidad. Es decir, antes de la administración celular se les transfiere un gen para su marcaje. Posteriormente, estas células podrán ser detectadas mediante la administración endovenosa de una sonda reportera (óptica o radiomarcada) que es específica para el producto del gen de las células administradas. La ventaja de esta forma de marcaje indirecto es que nos asegura la viabilidad, ya que sin viabilidad no existe transcripción del gen transferido ni, por tanto, acúmulo de la sonda en un sitio concreto. Otra ventaja es que puede visualizarse en diferentes ocasiones sin pérdida de señal<sup>145</sup>.

### **Marcaje directo en resonancia magnética**

En resonancia magnética se utilizan dos tipos de partículas para el marcaje celular. Las SPIO o partículas de óxido de hierro superparamagnéticas mayores de 30nm y las USPIO (ultrapequeñas SPIO) menores de 30nm. Son partículas cristalinas recubiertas de polímeros como dextrano, polietilenglicol y almidón. Las USPIO alcanzan una mayor vida media. El mecanismo por el cual el hierro entra en la célula es la endocitosis<sup>146</sup>. Estudios animales usando SPIO demostraron ser un método no tóxico de marcaje de células sin afectar a su transdiferenciación posterior. El número más pequeño de células que es capaz de detectar la

resonancia convencional fue de  $10^5$ . Con mayores campos magnéticos (mayor número de teslas) aumenta la sensibilidad y se logra incluso identificar células individuales marcadas. Sin embargo, la mayor desventaja es la posibilidad de que la célula identificada esté realmente muerta. Otra posibilidad es que, al dividirse la célula, su concentración de hierro oxidado se diluya y sea indetectable<sup>145</sup>.

### **Marcaje directo en medicina nuclear**

El marcaje directo de células con isótopos radioactivos tiene mayor sensibilidad que las técnicas de resonancia, pero menor resolución espacial. Estas técnicas ofrecen mucha información acerca del anidamiento tras la inyección celular<sup>145</sup>. Se usan radioisótopos con una vida media prolongada. Por ejemplo In-111 (2.8 días) en la tomografía de fotón único (SPECT) y Cu-64 (12.7 h) en la tomografía por emisión de positrones (PET)<sup>146</sup>.

Ejemplos de la aplicación de estas técnicas son la detección de progenitores celulares marcados con SPECT en el miocardio infartado de un ratón o el atrapamiento pulmonar de progenitores tras la administración endovenosa<sup>145</sup>.

Con el marcaje con PET con fluorodesoxiglucosa con F18 (F18-FDG) se ha demostrado el anidamiento tras la administración intracoronaria pero no endovenosa. El futuro está en encontrar radioisótopos con mayor vida media para evitar la pérdida de señal a lo largo de los días<sup>145</sup>.

## **Marcaje indirecto en visualización óptica**

Existen dos técnicas de marcaje óptico, con luminiscencia y con fluorescencia. La luminiscencia es una luz que se genera en una reacción enzimática catalizada por la luciferasa de la luciérnaga (Fluc). Si una célula posee luciferasa cuando entra en contacto con la D-luciferina emitirá luminiscencia, que será detectada por una cámara. Existen otras luciferasas que también se han utilizado. La señal emitida es tan débil que sólo se puede utilizar con animales pequeños (ratones).

La fluorescencia se genera por la excitación de un fluoroforo, como la proteína verde fluorescente (GFP) que es una proteína que se aisló de una medusa (*Aequoria victoria*) y que es espontáneamente fluorescente. No se transmite más allá de unos pocos centímetros por lo que la verdadera utilidad de esta técnica es visualizar las células marcadas en histología de forma directa con microscopios convencionales<sup>146</sup>.

## **Marcaje indirecto en medicina nuclear**

Se han desarrollado diferentes genes reporteros para SPECT y PET. La enzima timidinkinasa (TK) del virus Herpes Simple tipo 1 (HSV1-TK) o su mutante HSV1-sr39tk son capaces de fosforilar diferentes sustratos (que habremos marcado previamente). Los fosfatos resultantes son acumulados en las células. Las células

que no poseen el gen no acumulan el sustrato trazador. El sustrato de la TK que se administra se marca con un isótopo liberador de fotones o positrones<sup>146</sup>.

### **Marcaje indirecto en resonancia magnética**

De forma indirecta en resonancia se pueden transfectar las células que vamos a administrar con un gen de ferritina alterado que induzca una sobreexpresión de este producto y un acúmulo mayor de hierro en la célula administrada que podría ser detectado por resonancia. Un método parecido se ha desarrollado pero con el gen receptor de la transferrina alterado. Este método, más complejo, hace que al administrar posteriormente partículas USPIO unidas a la TF alterada éstas sólo se unan a las células que presentan receptores para ella.

Otro método sería marcando las membranas con quelantes de gadolinio que incrementen su captación y por tanto una imagen de hipercontraste en T1<sup>146</sup>.

### **b. Métodos para evaluar los efectos de la terapia celular**

#### **Función del ventrículo izquierdo**

Se han utilizado diferentes técnicas para determinar el tamaño y la función del ventrículo izquierdo: la ventriculografía, la ecocardiografía bidimensional, SPECT, la ventriculografía isotópica y la RM. El método más exacto es la RM<sup>145</sup>.

## **Perfusión miocárdica**

Para ello se ha utilizado el PET, SPECT, el primer paso en la RM y la ecocardiografía de contraste. Dentro de los métodos invasivos también se ha utilizado la reserva de flujo coronario (CFR) y el grado de *blush* miocárdico.

Hay que señalar que sólo el PET permite la cuantificación absoluta de la perfusión miocárdica, ya que el SPECT muestra más bien diferencias en la captación del radiotrazador, si bien esta última técnica ha sido la más ampliamente utilizada con este propósito<sup>146</sup>.

## **Tamaño del infarto**

Se han utilizado técnicas directas de visualización (PET, SPECT, RM con gadolinio, ecocardiografía con contraste) o indirectas (ventriculografía, ecocardiografía bidimensional, RM cine). La más exacta de las técnicas es la RM con gadolinio, permitiendo además diferenciar entre infarto transmural o subendocárdico<sup>145</sup>.

## **Viabilidad del miocardio**

Para ello se ha utilizado el PET (principalmente con F18-FDG) o SPECT (con agentes marcados con F18-FDG o con Tc99m), ecografía con dosis bajas de dobutamina o transmuralidad por RM. Entre las técnicas invasivas se encuentran las técnicas de mapeo de actividad eléctrica (NOGA)<sup>145</sup>.

## **VI. EL CONTEXTO CLÍNICO**

La terapia celular ha acumulado experiencia en diferentes contextos clínicos, pero en humanos sobre todo se ha concentrado en cardiopatía isquémica.

### **a. Post-infarto agudo de miocardio**

Varios estudios han evaluado la terapia celular administrada tras un infarto agudo de miocardio, algunos con resultados positivos y otros neutros. Casi todos ellos con administración intracoronaria una vez abierta la arteria responsable y con fracción mononuclear de médula ósea, excepcionalmente se han utilizado células seleccionadas hematopoyéticas, mesenquimales o EPC, o células progenitoras movilizadas a sangre periférica<sup>105</sup>.

### **Estudios clínicos aleatorizados con implante de células**

Hasta el momento, los estudios con resultados positivos más significativos son el BOOST<sup>147</sup>, REPAIR-AMI<sup>148</sup>, FINCELL<sup>149</sup> y REGENT<sup>150</sup>. En el BOOST la fracción mononuclear de médula ósea demostró mejorar la contractilidad regional y la FEVI en un 6%. Sin embargo, sólo los pacientes con infartos más extensos mantuvieron la mejoría en el seguimiento a largo plazo (18 meses). En el REPAIR-AMI, la infusión de células mononucleares mejoró la FE en un 2.8% a los 12 meses<sup>151</sup> manteniendo la mejoría a los dos años<sup>152</sup>. En el estudio FINCELL la mejoría fue del

5%. En el REGENT una mejoría del 3% respecto del control, pero esas diferencias desaparecieron a los 6 meses.

Por otra parte, estudios con resultados neutros serían el trabajo de Janssens<sup>153</sup>, el estudio ASTAMI<sup>154</sup>, el estudio HEBE<sup>155</sup> y del grupo americano CCTRN (Cardiovascular Cell Therapy Research Network) los estudios LateTIME<sup>156</sup> y TIME<sup>157</sup>. Janssens y col no observaron diferencias en la FE global pero sí mejoría de contractilidad regional y menor tamaño del infarto. En el ASTAMI, no hubo efecto sobre la FEVI, los volúmenes ni el tamaño del infarto. El estudio HEBE no mostró diferencias en la contractilidad global o regional. Finalmente, el estudio LateTIME no mostró diferencias de contractilidad regional o global realizando la infusión a las dos semanas del infarto y el TIME tampoco las encontró a los 3 o 7 días postinfarto.

Dos estudios han utilizado células mesenquimales tras el infarto, el estudio de Chen y col<sup>158</sup> y el de Hare<sup>159</sup> con células alogénicas, con resultados positivos pero discretos. Otras células como las progenitoras de tejido adiposo se han estudiado (estudio APOLLO) sin que se hayan publicado los resultados definitivos.

Además de estos estudios se han realizado también otros comparando momentos y modos de administración (como el MYSTAR)<sup>160</sup>. En la tabla 3 aparecen algunos de los estudios aleatorizados con células madre en contexto de IAM más relevantes hasta el momento actual.

Análisis de los efectos proliferativos de la terapia celular

<b>ESTUDIO (año)</b>	<b>N</b>	<b>Tipo celular (vía admon)</b>	<b>Resultados</b>
TIME (2012) <sup>157</sup>	40 / 40 / 40	CMMO (ic)	No mejor FEVI
LateTIME (2011) <sup>156</sup>	58 / 29	CMMO (ic)	No mejor FEVI
Cao (2009) <sup>161</sup>	41 / 45	CMMO (ic)	Mejor FEVI
Hare (2009) <sup>159</sup>	39 / 21	Alo hMSC (iv)	Mejor FEVI
Herbots (2009) <sup>162</sup>	33 / 34	CMMO (ic)	Mejor regional
REGENT (2009) <sup>150</sup>	80 / 80 / 40	CMMO nosel/sel (ic)	Mejor FEVI
FINCELL (2008) <sup>149</sup>	40 / 40	CMMO (ic)	Mejor FEVI
Suárez de Lezo (2007) <sup>163</sup>	10 / 10 / 10	CMMO (ic) /G-CSF	Mejor FEVI (células)
REPAIR AMI (2006) <sup>148</sup>	101 / 103	CMMO (ic)	Mejor FEVI
Meluzin (2006) <sup>164</sup>	22 / 22/ 22	10 <sup>7</sup> / 10 <sup>8</sup> CMMO (ic)	Mejor FEVI (dosis-dte)
Janssens (2006) <sup>153</sup>	33 / 34	CMMO (ic)	No mejor FEVI
TCT-STAMI (2006) <sup>165</sup>	10 / 10	CMMO (ic)	Mejor FEVI
ASTAMI (2006) <sup>154</sup>	50 / 50	CMMO (ic)	No mejor FEVI
MAGIC Cell-3 (2006) <sup>166</sup>	25 / 25	G-CSF+CMP (ic)	Mejor FEVI
BOOST (2004) <sup>147</sup>	30 / 30	CMMO (ic)	Mejor FEVI
Chen (2004) <sup>158</sup>	34 / 35	MSC (ic)	Mejor FEVI
MAGIC (2004) <sup>100</sup>	10 / 10 / 7	G-CSF+/-CMP (ic)	Mejor FEVI

**Tabla 3.** Estudios clínicos aleatorizados con implante de células madre. CMMO: célula madre de médula ósea no seleccionada o mononuclear. MSC: célula madre mesequimal. CMP: células mononucleares de sangre periférica. G-CSF: factor estimulante de colonias granulocíticas. FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo. En cursiva aparece el número de pacientes control.

## Estudios clínicos aleatorizados con G-CSF aislado

Otra forma de utilizar la terapia celular en el contexto del infarto agudo de miocardio consiste en la movilización de células desde la médula ósea mediante la administración de G-CSF. Varios estudios han sido publicados hasta el momento, pero los resultados no son muy alentadores. Sólo tres estudios han mostrado resultados positivos: el estudio FIRSTLINE-AMI<sup>101</sup>, RIGENERA<sup>102</sup> y Takano y col<sup>167</sup>. El resto no mostró mejorías en la contractilidad (tabla 4).

ESTUDIO (año)	N	Dosis	Duración	Cambios
RIGENERA (2007) <sup>102</sup>	14/27	10	5	Mejor FEVI
Takano (2007) <sup>167</sup>	18/22	2,5	5	Mejor FEVI
Suárez de Lezo (2007) <sup>163</sup>	10/10/10	10	10	No mejor FEVI (G-CSF)
G-CSF-STEMI (2006) <sup>168</sup>	23/21	10	5	No mejor FEVI
STEMMI (2006) <sup>169</sup>	39/39	10	6	No mejor FEVI
Ellis (2006) <sup>170</sup>	6/6/6	5 / 10	5	No mejor FEVI
Zollhöfer (2006) <sup>171</sup>	56/58	10	5	No mejor FEVI
Valgimigli (2005) <sup>172</sup>	10/10	5	4	No mejor FEVI
FIRSTLINE AMI (2005) <sup>101</sup>	15/15	10	6	Mejor remodelado (no FEVI)
MAGIC (2004) <sup>100</sup>	10/10/7	10	4	No mejor FEVI (grupo G-CSF)

**Tabla 4.** Estudios aleatorizados realizados con G-CSF exclusivamente. FEVI: fracción de eyección de ventrículo izquierdo. Dosis expresadas en µgr/kg/día y duración en días.

## Estudios clínicos no aleatorizados con implante de células

Los estudios no aleatorizados con implante celular aparecen recogidos en la tabla 5. El estudio TOPCARE-AMI estudió la eficacia y seguridad de la terapia celular con dos tipos celulares aleatorizados (células progenitoras de médula ósea frente a circulantes) y un grupo control no aleatorizado<sup>173</sup>, objetivando igual resultado con ambas terapias y superioridad en FEVI y viabilidad frente al grupo control y a pesar de diferencias en el número de células implantadas (menor en el grupo de precursores circulantes).

ESTUDIO (año)	N	TIPO (vía)	CAMBIOS
Krause (2009) <sup>174</sup>	20	CMMO (i.m.)	Mejor FEVI
BALANCE (2009) <sup>175</sup>	62 / 62	CMMO (i.c.)	Mejor FEVI
HEBE piloto (2008) <sup>176</sup>	26	CMMO (i.c.)	Mejor FEVI
Choi (2007) <sup>177</sup>	10 / 63	G-CSF + CMP (i.c.)	No mejor FEVI
Li (2007) <sup>178</sup>	35 / 35	G-CSF + CMP (i.c.)	Mejor FEVI
Steinwender (2006) <sup>179</sup>	20	G-CSF + CMP (i.c.)	Mejor FEVI
Bartunek (2005) <sup>180</sup>	19 / 16	CMMO sel (CD133+) (i.c.)	Mejor FEVI
Fdez-Avilés (2004) <sup>181</sup>	20 / 20	CMMO (i.c.)	Mejor FEVI
Strauer (2002) <sup>182</sup>	10 / 10	CMMO (i.c.)	Mejor contractilidad

**Tabla 5.** Estudios no aleatorizados con implante de células en contexto de un IAM. Algunos de estos estudios presentan grupo control y los cambios expresados son en relación a ese grupo. CMMO: células mononucleares de médula ósea. Ic: intracoronaria. Im: intramuscular. FEVI: fracción de eyección de ventrículo izquierdo.

## **Estudios clínicos no aleatorizados con G-CSF aislado**

Existen dos estudios clínicos no aleatorizados realizados en la fase aguda del infarto agudo de miocardio con G-CSF. El estudio de Kuethe y col (2005)<sup>183</sup> no mostró mejoría significativa de la FEVI pero sí describe mejoría en la contractilidad respecto de un grupo control no aleatorizado. La dosis fue de 10 µgr/kg/d durante una semana. En ese mismo año se publica el estudio de Suárez de Lezo y col (2005)<sup>184</sup> con similar dosis pero durante 10 días de tratamiento y tampoco describe mejoría en la FEVI.

### **b. Cardiopatía isquémica crónica**

Existen dos escenarios en los que se ha ensayado principalmente la terapia celular dentro de la cardiopatía isquémica crónica: el infarto de miocardio antiguo con disfunción ventricular e insuficiencia cardiaca y la enfermedad coronaria no revascularizable que condiciona angina estable refractaria a la medicación habitual.

El reemplazo de la cicatriz acinética por miocardio viable mejoraría la función cardiaca e impediría la remodelación progresiva del VI. El trasplante de células en esta patología se enfrenta a un suministro limitado de sangre y puede no encontrar el medio ambiente adecuado para la transdiferenciación en células vasculares o en cardiomiocitos. El trasplante de mioblastos (MIO), que tienen mejor tolerancia a la isquemia y son encargados de diferenciarse a miocitos, puede ser la mejor opción

en estas circunstancias. Además de los mioblastos se han ensayado también células de la médula ósea o precursores circulantes.

Para los pacientes que a pesar de recibir una terapia médica óptima siguen con angina y no tienen opción de revascularización por enfermedad arterial difusa también se ha propuesto esta terapia. Además, si consideramos que algunos de ellos tienen asociado un deterioro regional de la función contráctil, la cual es parcialmente reversible cuando la perfusión tisular es restaurada (miocardio hibernado), hay una clara necesidad de nuevas estrategias terapéuticas. Parece que la inyección transendocárdica de células de médula ósea o precursores circulantes mejora el flujo colateral, la perfusión y la fracción de eyección del ventrículo izquierdo.

No existe gran número de estudios aleatorizados en estos contextos. Se ha realizado aleatorización e implante de células en contexto de cirugía de revascularización coronaria como los llevados a cabo por Lai y col<sup>185</sup>, Ang y col<sup>186</sup> y el estudio MAGIC de Menasché y col<sup>187</sup> sin buenos resultados. De forma más exitosa y también de forma aleatorizada se ha ensayado en cardiopatía isquémica e insuficiencia cardiaca con implante percutáneo (Dib y col en el estudio CAusMIC<sup>188</sup>), en enfermedad coronaria no revascularizable (Tse y col 2007<sup>189</sup>) y en desobstrucciones coronarias percutáneas (Erbs y col 2005<sup>190</sup>).

## Estudios clínicos con implante de células vía intracoronaria

Los estudios clínicos con o sin aleatorización realizados en cardiopatía isquémica crónica con células precursoras vía intracoronaria se muestran en la tabla 6. Los resultados son contradictorios.

ESTUDIO	N	TIPO	R	CONTX.CLINICO	CAMBIOS
GAIN I(2008) <sup>191</sup>	16	G-CSF + CMP (CD 133+)	NO	EC no revascularizable	Efectos adversos. Igual isquemia.
TOPCARE-CHD(2007) <sup>192</sup>	121	CMMO	NO	Infarto previo	Mejor FEVI
Boyle(2006) <sup>193</sup>	5	G-CSF + CMP (CD 34 +)	NO	EC no revascularizable	Menos síntomas. Colateralización.
Gao (2006) <sup>194</sup>	14/14	CMMO	NO	Infarto previo	Mejor FEVI. Menos síntomas.
Erbs (2005) <sup>190</sup>	13/13	G-CSF + CMP	SI	ICP a oclusión crónica	Mejor FEVI y contractilidad
Katritis (2005) <sup>195</sup>	11/11	MSC	NO	Infarto previo	Mejor viabilidad y contractilidad.
Kueth(2005) <sup>196</sup>	5	CMMO	NO	Infarto previo	Igual FEVI. Igual síntomas.
IACT(2005) <sup>197</sup>	18	CMMO	NO	Infarto previo	Mayor viabilidad

**Tabla 6.** Estudios clínicos con implante celular intracoronario. EC: enfermedad coronaria. R: aleatorizados si/no. G-CSF: Factor estimulador de colonias granulocíticas. CMMO: células mononucleares de médula ósea. MSC: células mesenquimales. CMP: células mononucleares periféricas. ICC: insuficiencia cardíaca. EC: enfermedad coronaria. FEVI: fracción de eyección de ventrículo izquierdo.

## Estudios clínicos con implante celular intramiocárdico directo

En contexto de la cirugía de revascularización coronaria se han realizado estudios con implante de células progenitoras de forma directa (tabla 7).

ESTUDIO	N	TIPO	R	CONTX. CLINICO	CAMBIOS
Lai(2009) <sup>185</sup>	22/22	CMMO	SI	Revascularización qx	No mejor FEVI
Ang(2008) <sup>186</sup>	21/21/20	CMMO (ic/im)	SI	IM previo + RQ	No mejor FEVI
MAGIC(2008) <sup>187</sup>	33/34/30	MIO	SI	IM previo + RQ	No mejor FEVI
Stamm(2007) <sup>198</sup>	20/20	CD 133+ MO	NO	Revascularización qx	Mejor FEVI
Dib(2005) <sup>199</sup>	30	MIO	NO	IM previo + RQ/AV	Seguro.
Archundia(2005) <sup>200</sup>	5	CD 34+ CMP + G-CSF	NO	IM previo + RQ	Seguro.
Chachques(2004) <sup>201</sup>	20	MIO	NO	IM previo + RQ	Seguro.
Galiñanes(2004) <sup>202</sup>	14	CMMO	NO	IM previo + RQ	Mejoría segmentaria.
Siminiak(2004) <sup>203</sup>	10	MIO	NO	IM (>3mss) + RQ	Arritmias V.
Stamm(2004) <sup>204</sup>	12	CMMO	NO	IM (>10ds) + RQ	Seguro
Menasché(2003) <sup>205</sup>	10	MIO	NO	IM previo + RQ	Seguro.
Herreros(2003) <sup>206</sup>	12	MIO	NO	Infarto previo + RQ	Seguro.
Hamano(2001) <sup>207</sup>	5	CMMO	NO	Revascularización qx	Seguro.

**Tabla 7.** Estudios clínicos realizados con administración de células mediante inyección intramiocárdica directa. R: aleatorizado si/no. CMMO: células de médula ósea no seleccionadas. MO: médula ósea. MIO: mioblastos. CMP: células madre periféricas o circulantes. RQ: revascularización quirúrgica. AV: asistencia ventricular. CF: clase funcional. FEVI: fracción de eyección de VI. IM: infarto de miocardio.

## Estudios clínicos con implante celular intramiocárdico percutáneo

La administración celular por inyección directa en miocardio no precisa de cirugía, puede realizarse de forma percutánea (tabla 8).

ESTUDIO	N	TIPO	R	CONTX.CLINICO	RESULTADOS
FOCUS (2012) <sup>208</sup>	61/31	CMMO	SI	ICC + EC no rev	No mejor FEVI ni síntomas.
SEISMIC (2011) <sup>209</sup>	26/14	MIO	SI	ICC + DAI	No mejor FEVI. Mejoría síntomas.
ACT34-CMI(2011) <sup>210</sup>	56/56/56	CD 34+	SI	EC no rev	Mejor CFy perfusión
CAuSMIC(2009) <sup>188</sup>	12/11	MIO	NO	IM previo + ICC	Más viable.
Van Ramshorst (2009) <sup>211</sup>	25/25	CMMO	SI	EC no rev	Mejor FEVI. Mejor perfusión y CF
PROTECT-CAD(2007) <sup>189</sup>	9/10/9	CMMO	SI	EC no rev	Mejor FEVI y CF.
Ripa(2006) <sup>212</sup>	16	VEGF+GCSF	NO	EC no rev	No mejor perfusión
POZNAN(2005) <sup>213</sup>	10	MIO	NO	IM previo + ICC	Mejor FEVI y CF.
Perin (2003) <sup>214</sup>	14 /7	CMMO	NO	ICC + EC no rev	Mejor FEVI
Smits (2003) <sup>215</sup>	5	MIO	NO	IM previo + ICC	Mejor FEVI
Tse (2003) <sup>216</sup>	8	CMMO	NO	EC no rev	Mejor CF. No FEVI

**Tabla 8.** Estudios con administración intramiocárdica de células mediante técnica percutánea. MIO: mioblastos. CMMO: células madre de médula ósea no seleccionadas. IM: infarto de miocardio. ICC: insuficiencia cardiaca. EC no rev: enfermedad coronaria no revascularizable. FEVI: fracción de eyección de VI. CF: Clase funcional. R: aleatorizado si/no.

## Estudios clínicos con factor estimulante de colonias granulocíticas

También en la cardiopatía isquémica crónica se ha realizado movilización de precursores mediante la administración de G-CSF sin infusión intracoronaria o inyección intramiocárdica celular con pobres resultados. Los estudios con G-CSF en este contexto aparecen en la tabla 9.

ESTUDIO	N	DOSIS	R	CONTX.CLIN	RESULTADOS
Meier(2009) <sup>217</sup>	26/26	10 µg/Kg/d x 14 ds	SI	EC no rev	Mejor colaterales
Suzuki(2006) <sup>218</sup>	11/11 12/12	2 µg/Kg/d x 10 ds	SI	EC no rev IM antiguo	Mejor FEVI en IM antiguo con G-CSF
Wang(2005) <sup>219</sup>	13/16	5 µg/Kg/d x 6 ds	NO	EC no rev ICC	Mejor síntomas. Peor FEVI
Hill (2005) <sup>220</sup>	16	10 µg/Kg/d x 5 ds	NO	EC no rev	No mejor perfusión o síntomas

**Tabla 9.** Estudios con G-CSF en cardiopatía isquémica crónica. R: aleatorizado si/no. EC no rev: enfermedad coronaria no revascularizable. FEVI: fracción de eyección de VI.

### c. Otras miocardiopatías

Por último, se ha ensayado la terapia celular mediante la infusión intracoronaria de células progenitoras en otras miocardiopatías, como la idiopática y la chagásica, con resultados alentadores y aparecen en la tabla 10.

ESTUDIO (año)	N	TIPO	R	CONTX. CLINICO	RESULTADOS
Ribeiro(2012) <sup>221</sup>	90/93	CMMO	SI	MCD chagásica	No mejor FEVI
Chen(2008) <sup>222</sup>	71/187	CMMO	NO	MCD no isquémica	Mejor contractilidad
ABCD(2006) <sup>223</sup>	24/20	CMMO	SI	MCD idiopática	Mejor FEVI y CF.
Huang(2006) <sup>224</sup>	10/8	CMMO	NO	MCD idiopática	Mejor síntomas. No FEVI
Vilas-Boas(2006) <sup>225</sup>	25	CMMO	NO	MCD chagásica	Mejor FEVI
Wang(2006) <sup>226</sup>	12/12	MSC	SI	MCD idiopática	No mejor FEVI

**Tabla 10.** Estudios con infusión celular intracoronaria en otras miocardiopatías diferentes a la isquémica. CMMO: células médula ósea no seleccionadas. R: aleatorizado si/no. MCD: miocardiopatía dilatada. FEVI: fracción de eyección de VI. MSC: células mesenquimales. CF: clase funcional.

## VII. LOS RIESGOS

### a. Diferenciación inapropiada

Los mecanismos por los que la terapia celular tiene un efecto beneficioso implica la diferenciación de las células progenitoras en miocardiocitos, células endoteliales o ambas, fusión celular y/o efectos paracrinos de las células trasplantadas. Este aspecto es controvertido ya que algunos estudios sugieren que las células madre pueden diferenciarse a fibroblastos o incluso calcificarse, aunque estos hallazgos pueden deberse a defectos en la técnica. Sin embargo, cierto es que el miocardio dañado adulto carece de factores de crecimiento embrionarios fundamentales para la correcta diferenciación. Es por esto que las nuevas técnicas procuran diferenciar

las células pluripotenciales hacia el linaje cardíaco antes del trasplante (cardiopoiesis) aunque queda todavía por conocer en profundidad los mecanismos de diferenciación y compromiso celular<sup>227</sup>.

## **b. Eventos cardiovasculares mayores adversos**

Las arritmias ventriculares representan un riesgo inherente a cualquier paciente que sufre un infarto de miocardio. Las arritmias ventriculares se han relacionado preferentemente con la administración de mioblastos esqueléticos<sup>227</sup>. Los mioblastos implantados se diferencian a miotubos multinucleados. Los mioblastos que carecen de la expresión de cierta conexina no se unen a los miocitos cercanos, de modo que constituyen un sustrato arritmogénico por reentrada. Estas células se encuentran funcionalmente aisladas y laten en asincronía con los cardiomiocitos del receptor. Pero no sólo la heterogeneidad eléctrica sino otros fenómenos, contribuyen a la formación de arritmias, como la neoformación de nervios y el edema y daño local producido en la administración<sup>84</sup>.

No se ha comunicado de forma sistemática un incremento de arritmias ventriculares con células de la médula ósea, incluso se ha descrito un papel beneficioso de las células mesenquimales sobre los trastornos de conducción. Sin embargo, estudios in vitro han mostrado la capacidad de las células mesenquimales de generar arritmias mediante circuitos de reentrada y parece estar relacionado con la unión de miocitos del receptor con las células mesenquimales inexcitables. Si

esto es así, las arritmias deberían aparecer algo después del anidamiento celular y no inmediatamente tras la inyección intracoronaria, como se ha reportado<sup>227</sup>. Parece claro que existen factores de confusión, como la disfunción ventricular, que en sí mismos predisponen a la arritmia ventricular. No obstante, quedan por definir las diferencias celulares, si la incidencia es dosis-dependiente o guarda relación con el tiempo de implantación<sup>227</sup>. En la tabla 11 se recogen estos y otros eventos cardiovasculares descritos.

ESTUDIO	N(células/control)	Muerte e IM	ACVA	TV/FV	ICC
TOPCARE <sup>173</sup>	29(CMMO)/30(CMP)/11	1/1/0	-	-	-
Fdez- Avilés <sup>181</sup>	20/13	-	1/0	-	-
Bartunek <sup>180</sup>	19/16	-	-	2/0	-
Perin <sup>214</sup>	14/7	1/0	-	-	-
Boyle <sup>193</sup>	5	1	-	-	-
Menasché <sup>205</sup>	10	-	-	4	-
Siminiak <sup>203</sup>	10	1	-	4	-
Smits <sup>215</sup>	5	-	-	1	-
Dib <sup>199</sup>	30	-	-	4	-
POZNAN <sup>213</sup>	10	-	-	1	-
BOOST <sup>147</sup>	30/30	1/1	-	-	3/1
Janssens <sup>153</sup>	33/34	-	-	-	0/2
REPAIR <sup>148</sup>	101/103	2/7	-	4/4	0/2
ASTAMI <sup>154</sup>	50/50	1/0	-	2/1	-
Strauer <sup>197</sup>	14/7	1/0	-	-	-

**Tabla 11.** Eventos cardiovasculares recogidos en algunos estudios de terapia celular. IM: infarto de miocardio. ACVA: accidente cerebrovascular. TV/FV: taquicardia/fibrilación ventricular. IC: insuficiencia cardiaca. CMMO: células madre de médula ósea no seleccionadas. CMP: células madre periféricas.

### **c. Anidamiento fuera del miocardio**

A día de hoy la administración e implantación de células en el órgano diana siguen siendo subóptimas. La eficacia de los métodos de administración ronda el 3%, si bien aumenta en la inyección directa en el miocardio (10-15%). Independientemente de la vía elegida, las células trasplantadas se dirigen a los pulmones, al hígado y al bazo en pocas horas. No hay suficiente conocimiento de la cinética del anidamiento celular. Se ha comunicado que las células derivadas de la médula ósea se detectan en el miocardio a las 20 horas tras la inyección intracoronaria, pero sólo en algunos pacientes, y que existe un anidamiento en hígado y bazo. No se ha comunicado que alcancen el sistema nervioso<sup>227</sup>.

### **d. Efectos sobre aterosclerosis**

Recientemente se ha avanzado mucho en la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares responsables de la formación de colaterales y en la aterogénesis. Esto se ha acompañado de forma paralela de mejoras en las terapias diseñadas para favorecer la formación de colaterales e inhibir el desarrollo de la aterosclerosis. Sin embargo, muchas veces las intervenciones que tenían como objetivo aumentar las colaterales produjeron un aumento de la aterogénesis y viceversa. A esto se le conoce como el fenómeno de Jano (o de las dos caras). Así, se ha identificado un gran número de moléculas que participan y favorecen ambos

fenómenos, como son: VEGF, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-1 y 2), MCP-1 y la nicotina.

La aterogénesis, la isquemia y el estrés de las fuerzas de corriente tangentes (shear stress) favorecen la formación de colaterales mediante la activación de múltiples genes relacionados con la inflamación. Las citoquinas expresadas ejercen efectos locales, pero también son liberadas de forma sistémica, activando y atrayendo células inflamatorias e inmunes de tejidos como la médula ósea o el bazo. Estas células anidan en los tejidos activados y contribuyen tanto a la formación de colaterales como a la aterogénesis. Dado que existen estos mecanismos comunes, podemos asumir que si se altera cualquier componente de estas cascadas la repercusión se observará en ambos procesos<sup>228</sup>.

Se ha sugerido que las células de médula ósea y los progenitores derivados de sangre periférica podrían contribuir al crecimiento de la microvasculatura intraplaca derivada de los vasa vasorum, lo que podría predisponer al crecimiento de la lesión aterosclerótica, la hemorragia intraplaca, la activación de los macrófagos y, en consecuencia, la desestabilización de la placa. Así, la infusión intracoronaria de células progenitoras podría agravar la progresión de las lesiones ateroscleróticas en pacientes con enfermedad coronaria. La infusión de células progenitoras puede no sólo favorecer el desarrollo de reestenosis del segmento tratado con stent sino que puede también acelerar la progresión de la enfermedad coronaria en el vaso distal al lugar de infusión de las células progenitoras.

Por otra parte, algunos estudios en animales<sup>229</sup> han permitido analizar la composición y el tamaño de la placa tras la infusión de células mononucleadas de médula ósea y el resultado fue que, si bien no parecía alterar la composición y la estabilidad de la placa, sí se objetivó un aumento de su tamaño. También se han comunicado efectos negativos en otros estudios<sup>230, 231</sup> en los que se concluye que en el remodelado vascular (en la reestenosis y en la aterosclerosis) las células derivadas de la médula ósea están implicadas.

En el contexto de nuestro estudio, tras un infarto de miocardio reciente, se ha estudiado la progresión de la aterosclerosis tras la infusión celular y tras la administración de G-CSF.

Respecto de la infusión celular se presentaron algunos resultados contradictorios. Bartunek y col<sup>232</sup> en el 2005 comunicaron un caso de progresión distal al stent farmacoactivo con infusión de células de médula ósea seleccionadas y llamaron a la cautela. Del mismo grupo belga, Mansour y col<sup>233</sup>, en el año 2006, también expresaron su preocupación tras objetivar, en un estudio no aleatorizado, mayor pérdida luminal distal al stent no objetivando progresión en una arteria coronaria diferente a la ARI. Se utilizaron en este estudio células enriquecidas CD133+. Sin embargo, Assmus y col<sup>234</sup> presentaron los resultados de un estudio tampoco aleatorizado, pero con más pacientes (166 frente a los 38) y con células no seleccionadas y procedentes también de médula ósea, y no observaron diferencias en la aparición de lesiones de novo o mayor incidencia de eventos cardiovasculares

en el grupo tratado. Bien es verdad que no realizaron análisis de pérdida luminal en zonas no tratadas de forma sistemática en todos los pacientes. Sin embargo, Kang y col, en su estudio MAGIC-Cell 3-DES<sup>166</sup> aleatorizado (y con estimulación con G-CSF), sí analizaron la pérdida luminal distal al stent y no objetivaron diferencias. Posteriormente, en 2010, Arnold y col<sup>235</sup>, de nuestro grupo de trabajo, presentaron los resultados del análisis angiográfico y con ecografía intravascular de segmentos distales a la infusión celular y de una arteria contralateral en pacientes tratados con células de médula ósea no seleccionadas. No se objetivaron diferencias con los sujetos controles.

Respecto de la administración de factor estimulador, Takano y col<sup>167</sup> en 2007 analizaron segmentos coronarios tratados y no tratados sin evidenciar progresión en aquellos sujetos que recibieron G-CSF.

### **e. Efectos en la endotelización y la reestenosis**

La preocupación por un aumento de la hiperplasia intraluminal en relación a la terapia celular comenzó con la comunicación en 2004 por parte de Kang y col durante el desarrollo del ensayo clínico conocido como MAGIC<sup>100</sup>, en el que se infundían células madre intracoronarias movilizadas con G-CSF, un incremento inesperado del número de reestenosis sobre stent convencional que llevó a suspender el reclutamiento.

En nuestro contexto, tras un infarto agudo de miocardio, se han analizado los efectos tanto del factor estimulador como de la infusión directa de células.

Respecto de la administración de G-CSF, posteriores al MAGIC son los resultados de Valgimigli y col<sup>172</sup>, estudio aleatorizado con un 50% de pacientes tratados con stent convencional y con similar pérdida de luz tardía entre los grupos. También Ripa y col<sup>169</sup>, con un 64-67% de stent convencional, en su estudio aleatorizado STEMMI mostró que no existía pérdida luminal mayor ni en el segmento cubierto con stent ni en el conjunto tratado que incluye los bordes. Takano y col<sup>167</sup> tampoco objetivaron diferencias con stent convencional.

En el caso de la infusión directa de células progenitoras, de nuevo Mansour y col<sup>233</sup>, en 2006, con stent convencional, células seleccionadas y estudio no aleatorizado, presentaron sus resultados con una mayor pérdida de luz tardía intrastent. Sin embargo otros autores, como Assmus y col<sup>234</sup>, también con stent convencional, no objetivaron mayor reestenosis, ni tampoco el estudio posterior MagicCell3-DES<sup>166</sup> o FINCELL<sup>149</sup>, estos dos últimos con stents recubiertos.

Parece adecuada la elección de stents recubiertos de fármacos antiproliferativos como precaución ante un eventual incremento de la tasa de reestenosis en terapia celular. La terapia celular aplicada a este tipo de stents incluso puede resultar beneficiosa para su más rápida endotelización y, en consecuencia, menor tasa de complicaciones como la trombosis tardía<sup>236</sup>.

## HIPÓTESIS

---



## Hipótesis

La infusión intracoronaria de células madre de médula ósea, la administración de factor estimulador de colonias o la combinación de ambos tratamientos en el contexto de un infarto agudo de miocardio no incrementa la reestenosis del stent recubierto de rapamicina ni acelera la enfermedad aterosclerótica coronaria.



## OBJETIVOS

---



## Objetivos

- Comparar la pérdida de luz tardía del stent recubierto de rapamicina en aquellos pacientes que, en contexto de un infarto agudo de miocardio, reciben infusión intracoronaria de células madre, factor estimulador de colonias o ambas estrategias terapéuticas frente al tratamiento convencional.
- Comparar la progresión de la enfermedad aterosclerótica en un segmento distal al tratado y en una arteria diferente a la tratada, en aquellos pacientes que, en contexto de un infarto agudo de miocardio, reciben infusión intracoronaria de células madre, factor estimulador de colonias o ambas estrategias terapéuticas frente al tratamiento convencional.



## MATERIAL Y MÉTODOS

---



## Introducción

El estudio del grupo TECAM (terapia celular aplicada al miocardio) aleatorizado fue un ensayo clínico randomizado, multicéntrico, coordinado por el Instituto de Ciencias del Corazón (ICICOR) del Hospital Clínico Universitario de Valladolid en colaboración con el Servicio de Hematología del Hospital Universitario del Río Hortega de Valladolid y el Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) de la Universidad de Valladolid, en el que 120 pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación persistente del segmento ST y revascularización adecuada fueron aleatorizados a una de las siguientes cuatro estrategias de tratamiento: Grupo 1 con implante intracoronario de células progenitoras adultas, Grupo 2 con factor estimulador de colonias granulocíticas subcutáneo, Grupo 3 con implante celular combinado con factor estimulador y Grupo 4 con tratamiento convencional, con el objeto de valorar el efecto de dichas terapias sobre la función, volumen y contractilidad ventricular.

Los hospitales participantes en el reclutamiento de pacientes fueron: Hospital Clínico Universitario de Valladolid (Valladolid), Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid), Hospital Universitario de Salamanca (Salamanca), Complejo Hospitalario de León Virgen del Camino (León), Hospital General Yagüe (Burgos), Hospital de Segovia (Segovia), Hospital Río Carrión (Palencia) y Hospital Universitario Río Hortega (Valladolid).

El estudio se inició en 2005 y finalizó en septiembre de 2010, al completarse el seguimiento del último paciente incluido.

Esta misma población es la utilizada en esta tesis doctoral para valorar, mediante angiografía cuantitativa, el efecto de la terapia celular sobre las lesiones tratadas o sobre las lesiones ateroscleróticas de segmentos alejados.

## Protocolo del estudio

### **I. Población del estudio**

En el estudio se incluyeron pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación significativa y persistente del segmento ST de cualquier localización, en los que se había efectuado revascularización con implante de stent recubierto de rapamicina en la arteria responsable en las primeras 72 horas desde el comienzo del infarto y tras firmar el consentimiento informado.

#### **a. Criterios de inclusión**

- Edad entre 18 y 75 años.
- Infarto agudo de miocardio (dolor torácico de más de 30 minutos de duración que no responde a nitroglicerina con curva enzimática típica de

necrosis miocárdica) con sumatorio en mm de ST elevado en el electrocardiograma (ECG) de 12 derivaciones superior a 6 mm.

- Implantación de stent/s recubierto/s de drogas antiproliferativas en lesión culpable del infarto, con evidencia de recuperación de un flujo epicárdico normal (flujo TIMI grado 3) y con estenosis residual post-stenting  $\leq 30\%$  dentro de las 72 horas posteriores al comienzo de los síntomas.
- Revascularización adecuada mediante implantación de stent/s recubierto/s de drogas antiproliferativas de lesiones significativas no culpables en la arteria responsable, salvo localización muy distal, y de aquellas lesiones severas en otras arterias principales no responsables del infarto que irrigen territorio viable y funcionalmente importante.
- Alteración en la motilidad en la región dependiente de la arteria responsable.
- Firma del consentimiento informado escrito.

#### **b. Criterios de exclusión**

- Clase clínica Killip III ó IV.
- Sospecha o evidencia de complicación mecánica del infarto.
- Historia de taquicardia ventricular sostenida o fibrilación ventricular posterior a las primeras 24 horas del infarto.
- Portador de desfibrilador cardiaco implantable o potencial candidato para su implantación.

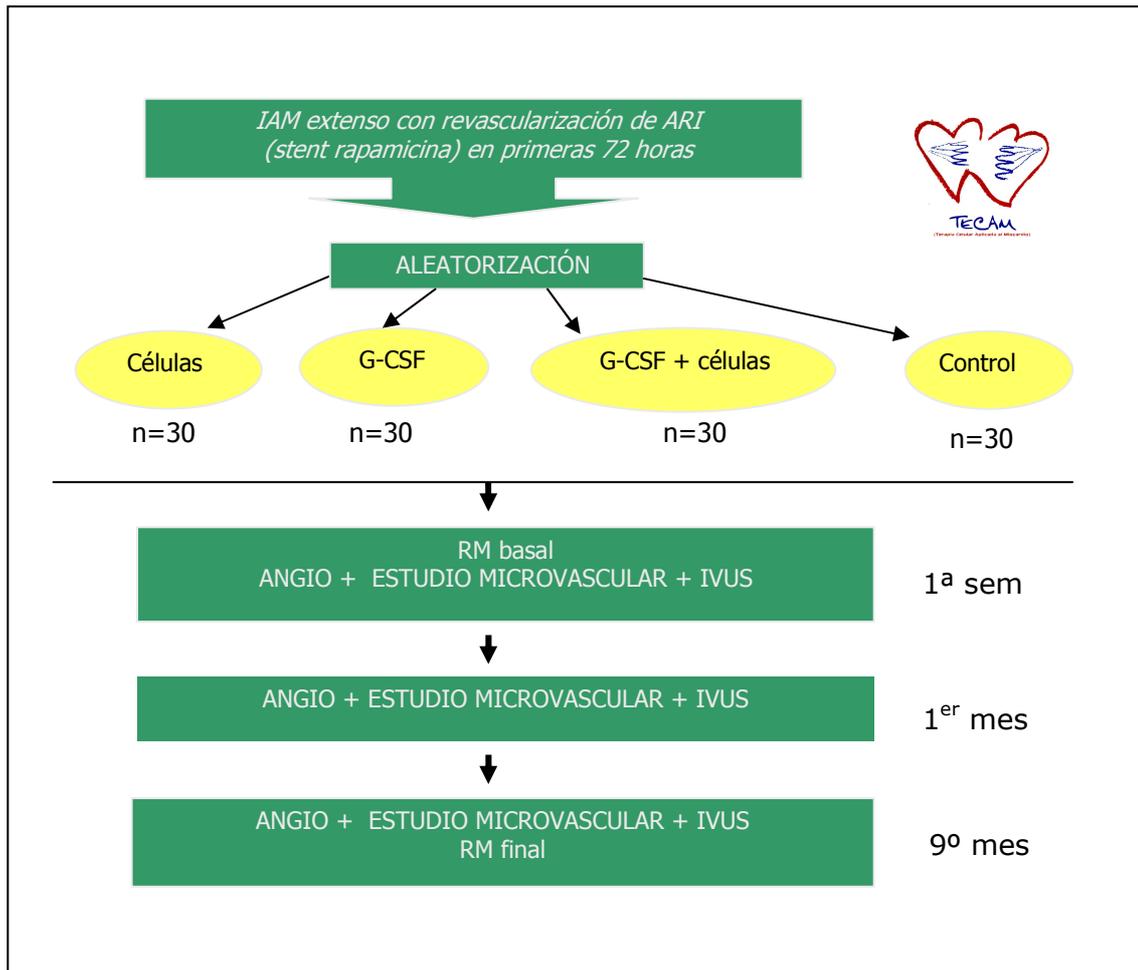
- Tratamiento en las 4 semanas previas con cualquier fármaco en investigación.
- Uso actual o potencial de drogas antineoplásicas o inmunosupresoras.
- Historia de cáncer en los últimos 5 años.
- Tratamiento previo con revascularización transmiocárdica con LASER.
- Mujeres en edad fértil (salvo intención expresa de no concepción).
- Cualquier enfermedad que pueda afectar la supervivencia del paciente durante la duración del estudio.
- Imposibilidad de retirada del tratamiento con anticoagulantes.
- Hemorragia activa o cirugía mayor en las 2 semanas previas que contraindique la utilización de heparina o antiagregantes.
- Hemopatía maligna previa (leucemias o linfomas) o estados de hipercoagulabilidad (síndrome antifosfolipídico, déficit de antitrombina, proteína C y proteína S, Factor V Leiden).
- Insuficiencia renal previamente conocida con creatinina > 2.5 mg/dL.
- Accidente cerebrovascular de cualquier tipo en el último año o accidente cerebrovascular hemorrágico en alguna ocasión.
- Estar pendiente de algún procedimiento de cirugía mayor de cualquier localización en el próximo año.
- Enfermedad vascular que impida la realización de un cateterismo.
- Antecedentes de hipersensibilidad al Filgrastim, proteínas derivadas del *E. coli* o cualquier componente de la formulación.

- No firmar el consentimiento informado.

### **c. Grupos de tratamiento**

En las 24 horas siguientes al implante del stent los pacientes incluidos eran aleatorizados (1:1:1:1) a uno de los siguientes grupos de tratamiento (figura 5):

- Grupo 1 (trasplante intracoronario): terapia convencional más extracción (punción médula ósea cresta ilíaca posterior) y trasplante de células madre de médula ósea autólogas entre el 3<sup>er</sup> y 7<sup>o</sup> día tras la aleatorización.
- Grupo 2 (movilización de progenitores con G-CSF): terapia convencional más administración por vía subcutánea del Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (G-CSF; 10 µg/Kg/día subcutáneo), comenzando inmediatamente después de la aleatorización y manteniendo dicha pauta durante 5 días.
- Grupo 3 (combinación de trasplante celular intracoronario y movilización de progenitores con G-CSF): terapia convencional más trasplante de células madre y administración subcutánea de G-CSF. Los pacientes asignados a este grupo de tratamiento son sometidos a extracción y trasplante intracoronario de células madre de médula ósea autólogas entre el 3<sup>er</sup> y 7<sup>o</sup> día tras la aleatorización, y el mismo día de la aleatorización comienzan a recibir tratamiento con G-CSF por vía subcutánea continuando 5 días.
- Grupo 4 (control): terapia convencional sin ningún tratamiento de regeneración con células.



**Figura 5.** Esquema del protocolo del estudio TECAM aleatorizado. IAM: infarto agudo de miocardio. G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos. ANGIO: coronariografía y ventriculografía. IVUS: ecografía intravascular. RM: resonancia magnética.

## II. Protocolo de imagen

### a. Durante el ingreso hospitalario

- Cateterismo cardiaco en la primera semana tras la aleatorización, en el que se realizó ventriculografía y coronariografía selectiva, análisis de la reserva de flujo

coronario y de la perfusión en la arteria responsable del infarto (ARI), y estudio IVUS intracoronario.

- RM cardiaca también en primera semana tras la aleatorización (estudio de volúmenes ventriculares, función sistólica, grosor miocárdico y viabilidad y tamaño del infarto).

### **b. Al mes de la randomización**

- Cateterismo cardiaco con ventriculografía y coronariografía selectiva, análisis de la reserva de flujo coronario y de la perfusión en la arteria responsable, y estudio IVUS intracoronario de la arteria responsable.

### **c. A los 9 meses de la aleatorización**

- RM cardiaca de volúmenes ventriculares, función sistólica global, grosor miocárdico y viabilidad y tamaño del infarto.
- Cateterismo cardiaco con ventriculografía y coronariografía selectiva, análisis de la reserva de flujo coronario y de la perfusión en la arteria responsable, y estudio IVUS intracoronario.

### **III. Protocolo angiográfico y de revascularización**

#### **a. Cateterismo prealeatorización**

- Los pacientes fueron sometidos a un cateterismo cardiaco en las 72 horas siguientes al inicio del infarto de acuerdo con el siguiente protocolo:
- Acceso vascular vía femoral o radial con catéteres de 6F.
- Se procedió a heparinización si era necesario según el tratamiento recibido por el enfermo en el momento del cateterismo.
- Se utilizó contraste iónico hiposmolar.
- Se realizó una ventriculografía en proyección oblicua anterior derecha (OAD) a 30 grados con al menos dos latidos contiguos en ritmo sinusal con velocidad de inyección de 10-14 mL/s durante 4 segundos. Y, en ausencia de contraindicación, también en proyección oblicua anterior izquierda (OAI) a 60°.
- Se realizó una coronariografía selectiva completa comenzando por la arteria no responsable del infarto con al menos tres proyecciones ortogonales para la arteria coronaria izquierda y dos para la derecha. Se eligieron las proyecciones que permiten la mejor visualización del segmento con mínimo acortamiento arterial y mínimo grado de entrecruzamiento de ramas.
- Al comienzo de la grabación de cada una de las proyecciones de la coronariografía el catéter está vacío de contraste y se visualizan dentro del fotograma al menos 3 centímetros de la parte distal del catéter.
- Se filmó a 25 imágenes por segundo y se grabó en CD-R en formato DICOM.

Después del cateterismo diagnóstico se realizó la angioplastia con stent de la arteria culpable y del resto de lesiones en otras arterias siempre que fue necesario con los criterios siguientes:

- La arteria culpable es nativa.
- La estenosis culpable es mayor del 70% (valoración visual) o del 50% por cuantificación automática.
- Diámetro de referencia mayor de 2.5 mm por valoración visual.
- Alta probabilidad de acceso a la lesión culpable con el stent (ausencia de enfermedad difusa o tortuosidad proximal excesiva).
- Alta probabilidad de expandir el stent totalmente (ausencia de calcificación severa).
- Aquellas estenosis significativas (mayor del 70% por valoración visual) no adyacentes a la lesión culpable en la ARI (salvo localización muy distal) fueron revascularizadas percutáneamente (stent recubierto) siempre que fue posible. En caso de afectación multivaso, aquellas estenosis superiores al 90% por valoración visual localizadas en arterias coronarias principales no responsables del infarto que se consideraron susceptibles de revascularización percutánea, fueron tratadas con implante de stent (recubierto) cuando fue posible y el territorio irrigado era viable y funcionalmente importante (oclusiones crónicas no incluidas).
- Se consideró revascularización funcional adecuada cuando se trataron de manera satisfactoria (estenosis residual inferior al 10% post-stenting en dos

proyecciones ortogonales) todas aquellas lesiones significativas no culpables localizadas en la arteria responsable o en otras arterias coronarias principales no culpables que irrigen territorio supuestamente viable.

No se realizó angioplastia de la arteria culpable cuando se objetivó:

- Una estenosis no significativa (menor del 70% por estimación visual o menor del 50% por cuantificación semiautomática).
- Una estenosis del tronco de la arteria coronaria izquierda  $\geq 60\%$  por estimación visual.
- Una lesión ostial que si fuera tratada pudiera afectar al tronco común de la arteria coronaria izquierda, a menos que esté protegido.
- O ramas laterales mayores de 2.75 mm que pudieran ser obliteradas por el stent.

El procedimiento de angioplastia se realizó de acuerdo a las consideraciones siguientes:

- El diámetro deseable del stent se determinó por angiografía, para alcanzar un diámetro luminal final un 10% mayor del de referencia.
- Se utilizaron stents un 10-15% más largos que la lesión para "atrapar" el material trombótico de la placa y evitar así su embolización.
- Se utilizaron stents recubiertos con fármacos antiproliferativos (principalmente de rapamicina).

- Se prefirió el implante directo de stent sin predilatación para evitar la compresión y embolización de material trombótico.
- Si el implante directo de stent no fue posible se predilató con un balón no distensible cuyo tamaño fuera 1 mm menor que el diámetro de referencia.
- Ante la posibilidad de mal resultado con un stent más largo, se utilizaron stents más cortos adyacentes hasta cubrir la longitud deseada, comenzando la implantación en sentido distal-proximal.
- La presión de expansión máxima fue de 12 atm.
- Se valoró el resultado inicial mediante criterios angiográficos, considerando que es satisfactorio cuando el flujo postimplantación es normal (TIMI 3) y la estenosis postimplantación es menor o igual al 10% en 2 proyecciones ortogonales.
- Si se necesitó una expansión posterior del stent, se hizo con un balón no distensible sobredimensionado de 0.25 a 0.50 mm respecto al diámetro arterial de referencia a alta presión (14 a 20 atm).

En cuanto a las arterias no culpables del infarto:

- En caso de afectación multivaso, se trataron aquellas lesiones significativas en arterias no culpables del infarto que irrigaran territorio supuestamente viable (oclusiones crónicas no incluidas) para conseguir una adecuada revascularización funcional.

- Si una adecuada revascularización funcional no pudo ser lograda y el paciente no es un buen candidato para cirugía de pontaje coronario, se buscó la revascularización percutánea más extensa posible.
- La angioplastia en arterias o segmentos no culpables fue con stent recubierto siempre que: a) la accesibilidad del segmento estenosado fuera fácil; b) la estenosis fuera severa (>90% por estimación visual); c) el área viable irrigada por el vaso fuera funcionalmente importante; d) el diámetro de referencia del vaso fuera mayor de 3 mm por estimación visual.

## **b. Cateterismos posteriores**

Se realizaron siguiendo el siguiente protocolo:

- Se recogió el tamaño, el modelo y la marca del catéter utilizado.
- Se realizó una coronariografía selectiva completa con al menos tres proyecciones ortogonales para la arteria coronaria izquierda y dos para la derecha. Se eligieron las proyecciones que permitían la mejor visualización del segmento con mínimo acortamiento arterial y mínimo grado de entrecruzamiento de ramas.
- Se realizó además un estudio de perfusión angiográfico, el análisis de reserva coronario y ecografía intravascular de la arteria responsable.
- Se realizó una grabación específica en CD formato DICOM para cada uno de los pacientes de cualquier rama de tratamiento y esta grabación se envió a la Unidad de Análisis Centralizado de Imagen Cardíaca del ICICOR (ICICORELAB,

Hospital Clínico Universitario de Valladolid) para análisis centralizado ciego de la misma.

#### **IV. Protocolo de extracción medular e implante celular**

Se realizó entre el día 3º y 7º postrandomización de acuerdo con el protocolo siguiente:

- Extracción médula ósea: por medio de punción en la cresta ilíaca del paciente, se obtenían 50 mL de médula ósea. Se separó la fracción mononuclear de la médula diluida en PBS/heparina mediante Ficoll. El producto final se resuspendió con plasma salino heparinizado preparado para su infusión.
- Infusión intracoronaria: a través de un balón de angioplastia inflado a baja presión para impedir el flujo retrógrado de la suspensión, se alternaron periodos de infusión continua (2 minutos) con otros de reperfusión (1 minuto) hasta finalizar.

##### **a. Material específico para el implante celular**

- Introdutor de 7 F, por la conexión lateral de toma de presiones constantes.
- Catéter guía de 6 F.
- Alambre-guía de 0.014 "J" con soporte adecuado y de 300 cm de longitud (en su defecto, guía de 180 cm + extensión).

- Catéter balón coaxial.
- Alargadera de 25 cm. de alta presión macho-hembra con rotor.
- Bomba de perfusión con jeringa.
- Protector estéril (tipo IVUS).
- Jeringa de 20 mL conteniendo las células madre y llave de tres vías.

### **b. Procedimiento de implante**

- Se conectaba la jeringa de células madre a la bomba de perfusión.
- La velocidad de infusión fue de 1 mL/min.
- Premedicación habitual como en otros procedimientos intervencionistas.
- Protector estéril en la bomba.
- Punción arterial según técnica de Seldinger.
- Introdutor 7F y conexión a presiones por colateral.
- Canalizar la arteria coronaria responsable del infarto con el catéter guía de 6 F.
- Avanzar y situar la guía en la arteria responsable del infarto.
- Pasar a través de la guía el catéter balón previamente purgado con plasma fisiológico 0.9% por la conexión central, mientras que la conexión lateral es para el inflado del balón.
- Situado el catéter balón se comprobaba a qué presión impedía el paso del flujo sanguíneo (2 a 4 atm).
- Se extrajo la guía y se conectó la jeringa de 10 cc cargada con 2-3 cc de plasma fisiológico 0.9% para hacer el purgado del catéter.

- Conexión de la alargadera de alta presión por la terminación - macho al catéter balón y por la terminación hembra a la llave de tres vías que previamente estará conectada a la jeringa de las células madres.
- Comenzar la perfusión y poner cronómetro en marcha.
- El volumen utilizado a través de todo el sistema es de 1.4 cc, eso significa que transcurrido 1 min y 40 seg comienzan a salir las células madre por el orificio distal del catéter balón.
- En ese momento se infla el balón de 2 a 4 atmósferas (impidiendo el paso de flujo sanguíneo).
- Continuar con la perfusión de células durante 2 minutos más.
- Transcurridos los 3 min 40 seg, cerrar bomba y desinflar el balón con presión negativa mínima y muy lentamente.
- Dejar reperfundir la arteria durante 1 minuto.
- Repetir el implante de células madre con inflado y desinflado del balón. Los sucesivos implantes serán exactamente de 2 minutos.
- Una vez concluida la perfusión, conectar a la llave de tres vías una jeringa con 5-6 cc de plasma fisiológico 0.9% y comenzar a lavar muy lentamente (1'40") todo el sistema para asegurar una entrada completa de las células madre.
- Se retira el sistema de infusión y el catéter guía y el procedimiento se da por concluido.

## **V. Protocolo de administración del factor estimulador**

El G-CSF (filgrastim) se administró en las primeras 24 horas postrevascularización, inmediatamente después de la aleatorización y siempre que le correspondiera según su grupo de tratamiento, y se mantuvo durante 5 días (10 ug/kg/día por vía subcutánea en una dosis).

### **a. ¿Qué es el filgrastim?**

Filgrastim es un factor estimulador de las colonias humanas de granulocitos que se obtiene mediante la tecnología del DNA recombinante. El Neupogen (factor metionil-recombinante estimulador de las colonias de granulocitos humanos, r-metHuG-CSF) es la marca de filgrastim registrada por la empresa Amgen Inc. y la utilizada en este estudio, y consiste en una proteína de 175 aminoácidos producida por una bacteria *Escherichia Coli* inoculada con gen del G-CSF humano. Los factores de estimulación de las colonias de granulocitos son glicoproteínas que actúan sobre las células hematopoyéticas uniéndose a sus receptores de superficie y estimulando su proliferación, su compromiso de diferenciación y algunas de sus actividades celulares finales.

Los niveles séricos de filgrastim alcanzan su pico a las 2-6 horas tras la administración subcutánea y "plateau" en 3-5 días. Su efecto se observa en las primeras 24 horas y se ha comprobado que la cifra de neutrófilos disminuye un

50% a los 2 días de suspender el G-CSF y vuelve al rango normal a los 4-7 días; el pico plasmático puede mantenerse 12 horas. Por vía subcutánea se absorbe en un 100%. Se metaboliza por degradación sistémica, tiene una vida media de eliminación de 1.8-3.5 horas y no se tiene evidencia de acumulación del fármaco en un periodo por encima de 11 – 20 días. La dosificación es individual y se basa en el peso real (incluso en pacientes con obesidad mórbida).

Por sus acciones, el filgrastim es ampliamente usado en la clínica onco-hematológica: a) en enfermos con cáncer no mieloide para acelerar y optimizar la recuperación de neutrófilos después de diferentes tratamientos con quimioterapia mielosupresora, y disminuir así la frecuencia y la severidad de las infecciones potencialmente asociadas a estas terapias; b) para reducir el tiempo de recuperación de neutrófilos en pacientes con leucemia mieloide aguda después del tratamiento de consolidación con quimioterapia; c) en pacientes con cáncer no mieloide sometidos a mieloablación con quimioterapia más trasplante ulterior de médula ósea, para reducir la duración de la neutropenia y sus efectos secundarios; d) en pacientes que van a ser sometidos a leucoaféresis y posterior trasplante de células hematopoyéticas, para aumentar el contenido de estas células en sangre circulante y aumentar así la rapidez y eficacia de los injertos; y e) en pacientes con neutropenia crónica severa, para disminuir la severidad y las consecuencias de esta situación mediante la administración crónica de G-CSF.

## **b. Reacciones adversas significativas descritas**

- Suelen ser de carácter leve y pasajero y se relacionan con la dosis.
- Efectos frecuentes (>10% de los pacientes tratados): 1) Sistema nervioso central: fiebre. 2) Dermatológico: alopecia. 3) Gastrointestinal: náuseas, vómitos, diarrea, mucositis, esplenomegalia (más común en pacientes que prolongaron >14 días el tratamiento y normalmente es subclínica). 4) Neuromuscular y esquelético: dolores óseos (24%) sobre todo en sacro, crestas iliacas y esternón.
- Efectos poco frecuentes (1% a 10% de los casos tratados): 1) Cardiovascular: dolor torácico, edemas. 2) Sistema nervioso central: cefalea. 3) Dermatológico: rash cutáneo. 4) Gastrointestinal: anorexia, estomatitis, estreñimiento. 5) Hematológico: leucocitosis, trombocitopenia. 6) Local: dolor en el sitio de inyección; 7) Neuromuscular y esquelético: debilidad, osteoporosis. 8) Respiratorio: disnea, tos, molestias faríngeas. 9) Endocrino y metabólico: elevación reversible del ácido úrico. 10) Hepático: aumento de LDH o fosfatasa alcalina. 11) Renal: hematuria, proteinuria.
- Efectos raros (menos del 1% de los pacientes tratados): Pericarditis, tromboflebitis, taquiarritmia supraventricular.

### **c. Contraindicaciones**

Hipersensibilidad al filgrastim, proteínas derivadas de *E. coli* o cualquier componente de la formulación; tratamiento concomitante con quimioterapia mielosupresora o radioterapia.

### **d. Advertencias y precauciones**

- Previo al uso de filgrastim debe realizarse un conteo sanguíneo completo.
- No se debe utilizar G-CSF en el período 24-48 horas antes o después de la administración de quimioterapia por la posibilidad de aumentar la tasa de división celular mieloide.
- Existe un efecto en el crecimiento tumoral sobre todo en neoplasias mieloides, pero otros tumores pueden tener receptores de membrana para el G-CSF.
- Usar con precaución en pacientes con antecedentes de gota o psoriasis.
- En caso de sepsis vigilar la posibilidad de desencadenar distrés respiratorio.
- Las reacciones de tipo alérgico han ocurrido tanto tras la primera dosis como en dosis posteriores. Suelen ser más frecuentes con la administración intravenosa y dentro de 30 minutos de infusión. La mayoría de los casos se resolvió rápidamente con anti-histamínicos, esteroides, broncodilatadores y/o epinefrina. Los síntomas se repitieron en >50% de pacientes con una nueva dosis.
- La mayoría de los pacientes experimentan un 30% a 50% de disminución en los leucocitos circulantes en los 1-2 días tras la interrupción del tratamiento.

- Drogas que pueden facilitar la desgranulación de neutrófilos como el litio, deben usarse con cautela.

#### **e. Efectos tóxicos / Sobredosificación.**

Ningún efecto adverso clínico se ha visto con las dosis altas que producen una cifra de neutrófilos  $>10.000/\text{mm}^3$ . Al cesar el tratamiento, hay un 50% de disminución en los neutrófilos circulantes dentro de 1-2 días, y una nivelación de las cifras en los 1-7 días posteriores.

### **VI. Protocolo de seguimiento clínico**

#### **a. Momento de recogida**

Se recogieron variables clínicas y analíticas durante la fase hospitalaria y las sucesivas visitas al mes, a los cuatro meses y a los nueve.

#### **b. Variables recogidas**

##### **Variables clínicas**

- Examen físico (sólo se analizaron sexo, peso, talla)
- Factores de riesgo cardiovascular (diabetes mellitus, hipertensión arterial, hipercolesterolemia, tabaquismo).

- Historia del infarto actual (fecha del infarto, tipo de reperfusión)
- En el grupo de implante o grupo combinado (fechas de extracción e implante, número de células implantadas)
- Tratamiento (IECAs, ARA II, estatinas, anticoagulantes orales, diuréticos, nitratos, betabloqueantes, antagonistas del calcio, AAS, clopidogrel)

### **Variables analíticas**

Analítica basal (creatinina, Hb, hematocrito, plaquetas, leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, T protrombina, fibrinógeno, colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos, TTPa) y valores máximos de marcadores de lesión cardiaca.

## **VII. Protocolo de análisis angiográfico**

### **a. Unidad de Imagen Cardiaca del ICICOR**

El análisis de las imágenes (resonancia magnética, coronariografías y ventriculografías y ecografía intravascular) se ha realizado en la Unidad de Imagen del ICICOR, y para ello, cada centro remitió las imágenes en formato DICOM en CD a esta unidad.

Esta unidad de imagen se formó a partir de la necesidad de disponer de determinadas unidades centrales que apoyaran la investigación de los centros

pertenecientes a la Red de Enfermedades Cardiovasculares (RECAVA), red financiada por el Instituto de Salud Carlos III.

El fin de estas unidades es disponer de todos los medios necesarios para medir cualquier parámetro que, obtenido mediante técnicas de imagen en cardiología, sea considerado como objetivo equivalente o "sustituto" en los ensayos clínicos y poner esos medios a disposición de cualquier centro que lo precise.

### **b. Formación de un experto en análisis angiográfico**

Para llevar a cabo este proyecto de tesis el doctorando se ha formado en el análisis angiográfico mediante el aprendizaje tutorizado en la Unidad de Imagen del ICICOR. El programa de formación ha incluido los siguientes aspectos:

### **Conocimiento práctico de la realización de la ventriculografía y coronariografía**

Como parte de su formación en cardiología, el doctorando ha permanecido durante 9 meses en la sección de hemodinámica del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Durante este periodo ha adquirido los conocimientos teóricos y prácticos para la realización e interpretación de un cateterismo cardiaco.

## **Conocimientos teóricos sobre el funcionamiento general de una unidad central de análisis de imagen**

El doctorando ha obtenido los conocimientos adecuados que le han permitido entender la necesidad de utilizar una unidad de imagen para hacer investigación clínica de forma rigurosa con el objetivo de obtener unos resultados fiables y reproducibles. En la formación del doctorando se ha puesto especial énfasis en los conceptos de variabilidad y de objetivos surrogados. Además, ha aprendido aspectos prácticos sobre la organización de la unidad como el control de calidad y los sistemas de almacenamiento de imágenes. El doctorando ha adquirido los conceptos básicos sobre la formación, transporte y almacenamiento de imágenes.

El programa de formación ha incluido los conceptos teóricos necesarios para llevar a cabo el análisis angiográfico:

- Definición de los parámetros analizados.
- Conocimiento de los métodos de análisis.
- Factores técnicos que influyen en el análisis de las distintas variables.
- Limitaciones que pueden aparecer en el análisis.
- Relación de las variables analizadas con los eventos clínicos.
- Comparación de los valores obtenidos con otras técnicas de imagen.

## **Aprendizaje de la técnica de análisis cuantitativo angiográfico**

El aprendizaje de la técnica de análisis cuantitativo angiográfico es el aspecto esencial del programa de formación.

El doctorando ha permanecido en la Unidad de Imagen un número de horas suficiente para conseguir, al término del periodo de formación, hacer un análisis cuantitativo de cualquier parámetro angiográfico.

Al final del periodo de formación el doctorando ha realizado un examen para ser acreditado como experto de análisis cuantitativo. Para analizar la concordancia entre variables cuantitativas se utilizó el coeficiente de correlación intraclase (CCI), considerándose el examen aprobado cuando el CCI fue mayor a 0.7.

### **c. Análisis angiográfico cuantitativo**

#### **Software utilizado**

QCA-CMS 6.0 de Medis medical imaging systems (Leiden, Holanda) es el software que se utilizó para el análisis angiográfico cuantitativo del árbol coronario.

Este programa permite visualizar y calibrar estudios coronariográficos y realizar medidas de distintos parámetros relacionados con el grado y longitud de la obstrucción con exactitud de una forma sistemática y objetiva.

Las imágenes no deben haber sido comprimidas por ningún algoritmo que distorsione el original (JPEG, por ejemplo). Las imágenes analizadas proceden de ficheros de datos DICOM (Digital Imaging and Communication in Medicine). DICOM es el estándar reconocido mundialmente para el manejo, almacenamiento, impresión y transmisión de imágenes médicas. Se diferencia de otros ficheros de datos en que agrupa la información dentro de un conjunto de datos, de modo que la imagen no puede ser separada por error del ID del paciente, entre otros datos.

### **Selección de una imagen adecuada**

Es importante elegir una imagen correcta para el análisis. Los criterios para su selección son:

- El vaso debe estar en una situación estable (respecto de los "frames" cercanos)
- La arteria debe estar llena de contraste y al final de la diástole
- La proyección elegida debe ser aquella en que la estenosis sea más pronunciada
- El segmento a estudio debe situarse en el mismo plano que el objeto calibrado.

### **La calibración**

Para poder obtener datos objetivos en medidas convencionales (mm) es necesario calibrar la imagen antes del análisis arterial. En el programa de CMS existen distintos modos de calibración: de rejilla, de esfera y de catéter.

En nuestro caso, el método de calibración elegido fue el de catéter. El analista selecciona un segmento del catéter y el programa de forma automática detecta los bordes, de modo que conociendo el grosor de este catéter (en French) se correlaciona con los mm/pixel de la imagen. En nuestro protocolo, el catéter elegido fue de 6F de 2 mm de grosor.

La imagen de catéter seleccionada debe mostrar sus bordes de forma nítida, sin superposición con otras estructuras. De forma general, la imagen seleccionada es aquella en que el catéter aparece relleno de contraste en el momento inmediatamente previo a su inyección en el interior de la arteria coronaria.

## **El análisis cuantitativo de lesiones no tratadas**

### Conceptos iniciales

Es importante seleccionar aquella imagen del segmento coronario en que éste aparezca lleno de contraste (generalmente en el segundo o tercer ciclo cardiaco de la grabación), en el final de la diástole (el registro electrocardiográfico puede ayudar), libre de superposición con otros vasos o ramas y aquel en que el segmento aparezca más extendido.

Es importante estandarizar los segmentos analizados según las recomendaciones de la AHA o ACC/AHA utilizando bifurcaciones como límites naturales.

En nuestro análisis es frecuente encontrar varios segmentos contiguos enfermos y tratados. En esos casos es recomendable iniciar y terminar el análisis en porciones sanas, lo que puede llevar a incluir más de uno de los segmentos.

Según las recomendaciones de la AHA de 1975, los segmentos coronarios se numeran como aparece en la tabla 12.

CD	TCI	DA	CX
Proximal (1)	Principal (5)	Proximal (6)	Proximal (11)
Media (2)		Media (7)	OM (12)
Distal (3)		Distal (8)	Distal (13)
IVP (4)		1 Diagonal (9)	
		2 Diagonal (10)	

**Tabla 12.** Segmentos coronarios según la AHA. CD: coronaria derecha. TCI: tronco coronario izquierdo. DA: descendente anterior. CX: circunfleja. IVP: interventricular posterior. OM: obtusa marginal.

El análisis se inicia estableciendo un punto inicial y uno final del segmento a analizar. De forma automática se establece una línea de recorrido entre ambos puntos que debe encontrarse dentro de los bordes arteriales, si no, puede reconducirse con un tercer punto. Una vez aceptada la línea de recorrido aparecen los contornos arteriales. En general, se considera que vasos con diámetro medio menor de 1.5 mm no deben ser analizados.

### Parámetros obtenidos

Una vez aceptados los contornos, los parámetros obtenidos son los siguientes:

- El diámetro de luz mínimo (MLD)
- El diámetro de referencia interpolado a nivel de la estenosis. Es decir, el cálculo del diámetro de referencia se obtuvo de acuerdo a una función calculada a partir de todos los diámetros del segmento analizado excepto la zona de obstrucción.
- Porcentaje de estenosis de diámetro:  $(1 - D_{\text{obst}} / D_{\text{ref}}) \times 100\%$ .
- La longitud de la zona de obstrucción. Es la distancia entre dos puntos cuyo diámetro es igual o excede a sus respectivos diámetros de referencia.
- La longitud del segmento total a analizar.

### ¿Cómo realizar el análisis de un segmento coronario no tratado?

- Se selecciona una imagen adecuada.
- Se calibra la imagen
- Se selecciona un punto proximal y otro distal (y en este orden) sanos que engloben el segmento a estudio (preferentemente entre bifurcaciones y de acuerdo a los segmentos estandarizados)
- Se comprueba que la línea de recorrido que se establece automáticamente entre los puntos proximal y distal esté dentro de los límites de la arteria.
- Se obtienen contornos automáticos según el algoritmo del programa. Se corrigen los bordes fallidos.

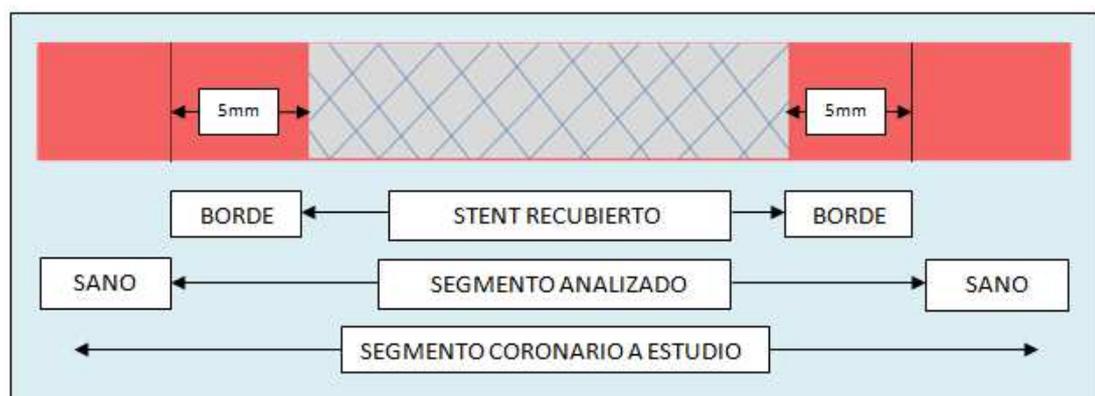
- Si existen zonas que distorsionen de forma significativa el diámetro de referencia (por ejemplo zonas aneurismáticas) pueden excluirse del análisis (“flagging”).

## El análisis cuantitativo de lesiones tratadas

### Conceptos iniciales

Tras determinar el segmento coronario total a estudio se fijan los límites del stent obteniéndose los siguientes subsegmentos (figura 6):

- Segmento recubierto con stent.
- Segmentos de borde proximal y distal del stent. Junto con el segmento previo constituyen el segmento tratado que coincide con el segmento analizado.
- Segmentos sanos proximales y distales. Constituyen junto con el segmento analizado el segmento coronario a estudio.



**Figura 6.** Dibujo esquemático del segmento coronario analizado cuantitativamente y, dentro de él, el segmento tratado que incluye el stent y sus bordes.

Por tanto en el análisis aparecerán detallados estos subsegmentos y, por cada uno de ellos, obtendremos los siguientes parámetros:

- el diámetro luminal mínimo (MLD)
- la posición del MLD respecto del punto inicial de análisis
- la longitud de la obstrucción
- el diámetro medio
- el diámetro de referencia
- el porcentaje de estenosis en diámetro
- la longitud de cada segmento
- la posición del segmento respecto del punto inicial de análisis

#### ¿Cómo se analiza un segmento con stent?

- Se siguen los mismos pasos que en los segmentos no tratados y después se determinan los límites (de forma manual) del stent. Es útil para hacer esto visualizar la imagen sin contraste y posteriormente en movimiento.
- Se obtiene un gráfico similar al obtenido con análisis de segmentos no tratados sobre el que aparecen señalados además los límites del stent y de los bordes proximal y distal.

### **Variables de seguimiento**

De las variables obtenidas en el análisis de cada coronariografía podemos obtener por cada paciente otras variables de seguimiento:

- Ganancia de luz aguda: diferencia entre el MLD tras la ICP y el MLD antes de la ICP.
- Ganancia de luz neta: diferencia entre el MLD en el seguimiento (a los 9 meses) y el MLD antes de la ICP.
- Pérdida de luz tardía: diferencia entre el MLD tras la ICP y el MLD en el seguimiento (a los 9 meses). Este análisis se realizará en el área recubierta por stent ("in stent") y en el segmento coronario tratado ("in segment").
- Reestenosis angiográfica: cuando en el seguimiento se supera el 50% de porcentaje de estenosis en diámetro. También analizable "in stent" o "in segment".

### **Metodología de análisis de nuestro estudio**

El protocolo de análisis de cada paciente consta de los siguientes puntos:

- Análisis de la lesión culpable previamente y tras la revascularización.
- Análisis del segmento tratado a la semana de la angioplastia y a los 9 meses (para determinar la pérdida de luz tardía o la reestenosis del stent implantado).
- Análisis de un segmento distal al stent a la semana de la angioplastia y a los 9 meses (para vigilar la progresión de la enfermedad aterosclerótica distal a la lesión culpable tratada). Se estudia un segmento distal, mayor de 20 mm y hasta 50 mm y con un diámetro medio mayor de 1.5 mm.
- Análisis de un segmento de una arteria diferente a la ARI a la semana de la angioplastia y a los 9 meses (para vigilar la progresión de la enfermedad

aterosclerótica en la arteria contralateral). Del mismo modo, se estudia un segmento de 20 a 50 mm.

Las variables angiográficas recogidas y analizadas son:

- Para el seguimiento de reestenosis:
  - Estudio basal (a la semana de la ICP):
    - Diámetro mínimo (total/subsegmentos)
    - Diámetro de referencia
    - %Estenosis (Estenosis residual)
  - Estudio a los 9 meses:
    - Diámetro mínimo (total/subsegmentos)
    - Diámetro de referencia
    - %Estenosis (Reestenosis binaria)
  - Pérdida de luz tardía (total/subsegmentos)
    - Variación del diámetro mínimo
- Para el seguimiento de la aterosclerosis:
  - Estudio basal (a la semana de la ICP):
    - Diámetro mínimo
    - Diámetro de referencia
  - Estudio a los 9 meses:
    - Diámetro mínimo
    - Diámetro de referencia

- Pérdida luminal a los 9 meses:
  - Variación del diámetro mínimo
  - Variación del diámetro de referencia

## **VIII. Análisis estadístico**

Las variables categóricas se expresan como valor absoluto y porcentaje y las continuas como media  $\pm$  desviación estándar y/o mediana y rango intercuartílico. La asunción de normalidad en las variables cuantitativas se ha comprobado mediante el análisis de la curtosis y asimetría y el test de Shapiro-Wilk's.

La comparación entre grupos de las variables categóricas se ha realizado mediante el test Chi Cuadrado. Para las comparaciones de variables cuantitativas se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) cuando se trataba de distribuciones normales y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis cuando no seguían una distribución normal. En caso de significación, se realizaron comparaciones múltiples mediante el test de Tukey. Todos los test fueron bilaterales y las diferencias consideradas significativas si  $p \leq 0,05$ . El análisis se realizó con el programa estadístico SPSS Inc. Versión 18.0 (Chicago, Illinois).



## RESULTADOS

---



# Características clínicas basales de los pacientes

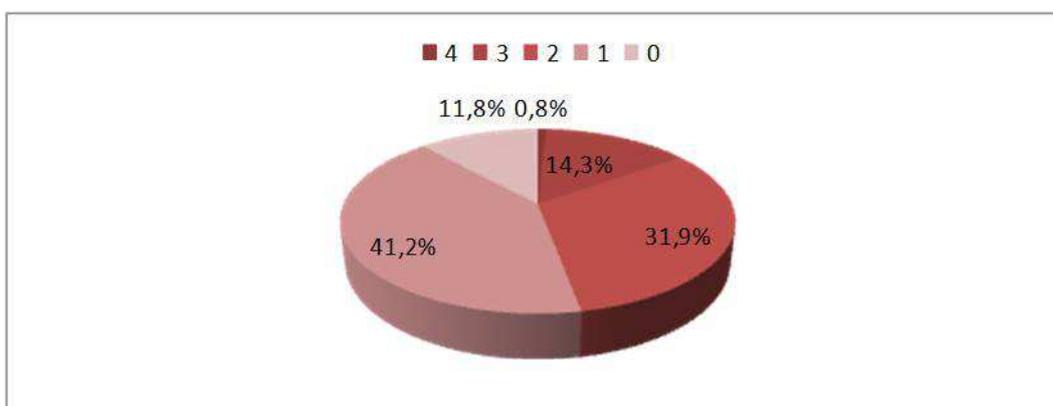
Fueron incluidos 120 pacientes en el estudio. Treinta pacientes recibieron células, 28 pacientes tratamiento combinado con G-CSF, 30 pacientes exclusivamente estimulación con G-CSF y 31 fueron controles. Uno de los pacientes retiró su consentimiento y ninguno de sus datos clínicos ni angiográficos han sido utilizados para este análisis.

## **I. Descriptivo general**

La media de edad de nuestros pacientes fue de  $56.3 \pm 9.96$  años. El 89.9%, es decir, 107 pacientes, eran varones. El peso medio fue de  $79.0 \pm 11.7$  kg y la talla de  $169.3 \pm 8.26$  cm, con un IMC calculado de  $27.6 \pm 3.75$ .

En cuanto a su perfil cardiovascular, encontramos que 16 pacientes tenían diagnóstico de diabetes mellitus (13.4%), 42 pacientes de hipertensión arterial (35.3%), 54 pacientes de dislipemia (45.4%) y 68 pacientes presentaban antecedentes de tabaquismo (57.1%).

En la figura 7 mostramos la distribución de frecuencias de la muestra, según el número de los factores de riesgo cardiovascular previamente citados que acumulaba cada individuo. La media por individuo fue de  $1.5 \pm 0.91$  factores de riesgo cardiovascular.

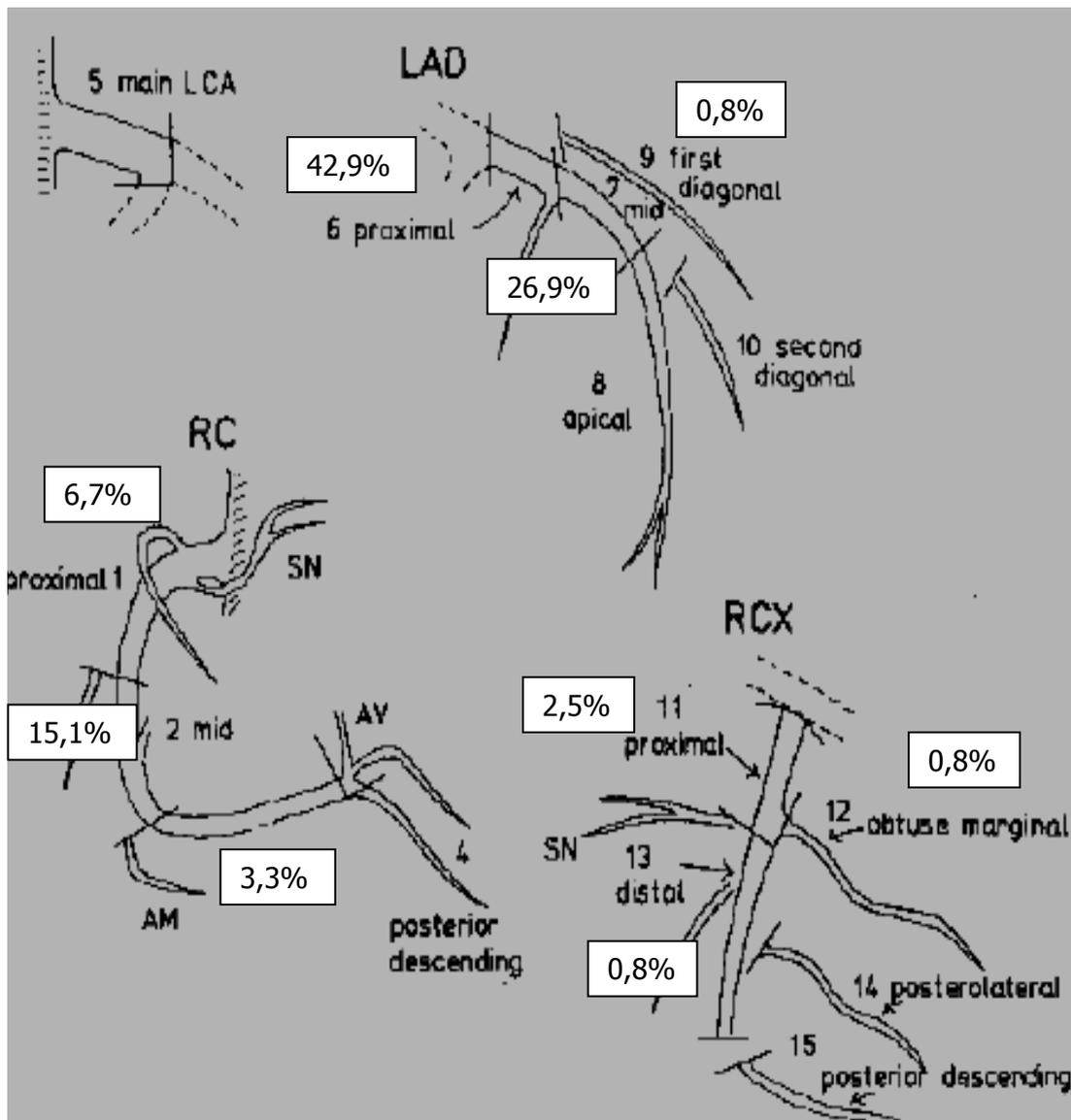


**Figura 7.** Distribución de los pacientes de la muestra de acuerdo al número de factores de riesgo cardiovascular acumulados.

La localización del infarto fue en su mayoría anterior (69.7%) englobando anterolaterales extensos y otros de menor significación en el electrocardiograma. Otras localizaciones fueron: inferior en 15 pacientes (12.5%), inferoposterior en 13 pacientes (10.8%), inferoposterolateral en 7 pacientes (5.8%) y lateral sólo en un paciente (0.8%).

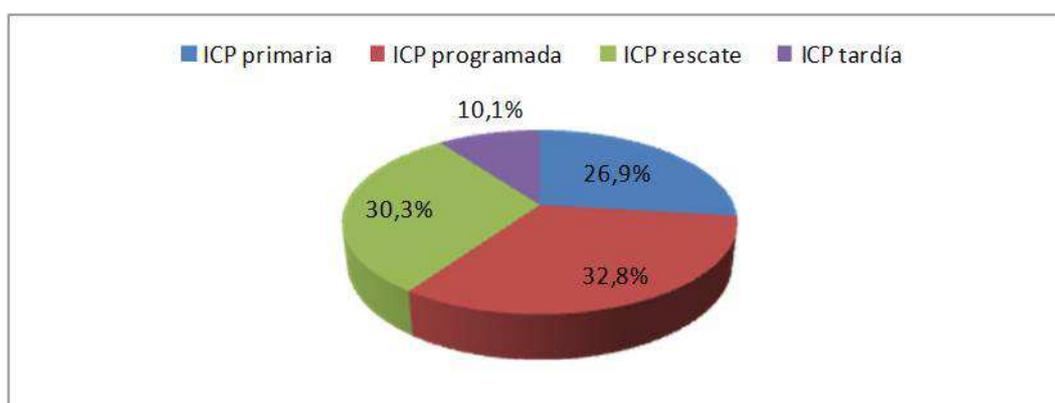
Acorde a estos resultados, se obtiene que los segmentos arteriales más frecuentemente responsables del infarto según la clasificación de la AHA de 1975 fueron: el segmento 6 (descendente anterior proximal) con 51 pacientes (42.9%),

el segmento 7 (descendente anterior media) con 32 pacientes (26.9%) y el segmento 2 (CD media) con 18 pacientes (15.1%) (figura 8).



**Figura 8.** Segmentos arteriales coronarios, según la clasificación de la AHA, relacionados con el infarto. Distribución de frecuencias en los pacientes de la muestra.

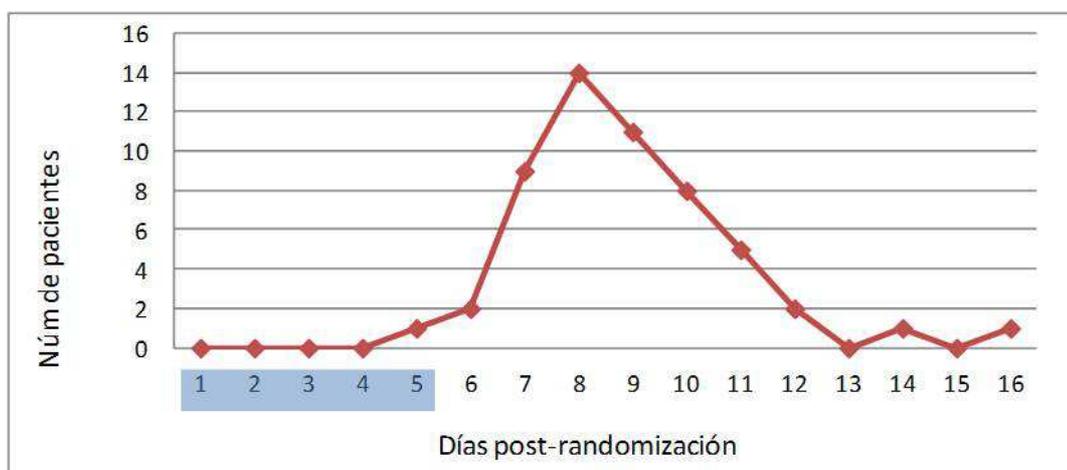
La estrategia de reperfusión no fue sometida a aleatorización, sino que fue determinada por indicación del cardiólogo responsable en cada paciente, de acuerdo a su situación clínica. Así se obtuvieron frecuencias similares para la angioplastia primaria, la angioplastia reglada tras fibrinólisis exitosa y la angioplastia de rescate (figura 9). Sólo doce pacientes no recibieron fibrinólisis y se les realizó angioplastia de forma tardía (pero siempre dentro de las primeras 72 horas).



**Figura 9.** Distribución del tipo de terapia de reperfusión. ICP: intervencionismo coronario percutáneo.

La longitud media del stent farmacoactivo utilizado fue de  $21.35 \pm 6.16$  mm y el diámetro medio fue de  $3.31 \pm 0.34$  mm.

El implante de células se realizó entre los días 5 y 16 (media 8.82 días) con una media de 407.98 millones de células implantadas (13.82 millones/ml). El objetivo de extracción medular e implante celular a los 3-7 días tras la aleatorización no se logró por motivos logísticos en todos los pacientes (ver figura 10). El día de inicio de la estimulación con G-CSF respecto del día del infarto fue el día  $2.24 \pm 0.981$ .



**Figura 10.** Día de implante celular desde el momento de la angioplastia. En azul aparecen los días correspondientes a la administración de G-CSF, que en los grupos que recibían estimulación se inició tras la aleatorización y se mantuvo durante 5 días.

El listado de variables de laboratorio del total de pacientes aparece en la tabla 13.

Variable	Mínimo	Máximo	Media	SD
CK-MB pico (U/L)	3	859	333,6	221,36
Creatinina (mg/dl)	0,5	1,5	0,9	0,18
Hemoglobina (g/dl)	10,4	17,4	14,0	1,39
Hematocrito (%)	29	52	41,2	4,02
Plaquetas (/mm <sup>3</sup> )	104.000	375.000	211.571,4	57.587,90
Leucocitos (/mm <sup>3</sup> )	2.470	57.900	12.787,7	8.781,61
Neutrófilos (/mm <sup>3</sup> )	494	51.600	9.747,8	7.724,54
Linfocitos (/mm <sup>3</sup> )	592	5.876	2.069,8	927,73
Monocitos (/mm <sup>3</sup> )	123	3.075	754,5	487,54
T Protrombina (s)	10	117	19,7	19,78
Fibrinógeno (mg/dl)	254	758	472,1	124,38
Col Total (mg/dl)	76	363	173,3	43,73
HDL (mg/dl)	21	79	39,7	12,27
LDL (mg/dl)	32	273	105,8	35,70
Triglicéridos (mg/dl)	58	352	135,2	52,61

**Tabla 13.** Variables de laboratorio analizadas. CK-MB: Creatinina-kinasa isoenzima específica de miocardio. T Protrombina: tiempo de protrombina. Col total: colesterol total. HDL: lipoproteína de alta densidad. LDL: lipoproteína de baja densidad.

El tratamiento al alta fue el convencional, con un 95.7% de pacientes tratados con AAS, un 99.1% tratado con clopidogrel, un 81.2% con IECAs, un 89.7% con betabloqueantes y un 96.6% tratados con estatinas.

## **II. Comparación de las variables no angiográficas**

El objetivo de este análisis es comprobar que los cuatro grupos de tratamiento presentan características homogéneas en cuanto a variables clínicas y analíticas se refiere. También analizamos diferencias en el manejo clínico hospitalario y en el tratamiento al alta sin hallazgos significativos (tabla 14).

No encontramos diferencias significativas entre los grupos de estudio salvo en el número de células implantadas (en millones de células) que fue mayor en el grupo que recibía previa estimulación frente al que no la recibía ( $751.6 \pm 671.8$  vs  $88.10 \pm 40.1$ ,  $p < 0.001$ ). En la figura 11 (página 162) mostramos la serie blanca que presenta diferencias que no alcanzaron la significación estadística en relación a la estimulación con el factor G-CSF. Se observó que el número de leucocitos fue mayor en los grupos sometidos a estimulación con G-CSF (estimulación aislada o combinada con implante de células). Las diferencias no alcanzaron la significación para el total de leucocitos ( $p = 0.13$ ), linfocitos ( $p = 0.16$ ) y monocitos ( $p = 0.48$ ). En cuanto a los neutrófilos (en azul en el gráfico), las diferencias no alcanzaron la significación estadística tras corregir el análisis para comparaciones múltiples.

Análisis de los efectos proliferativos de la terapia celular

Variable	Células	G-CSF	G-CSF +células	Control	Valor de p
Edad (años)	54±11	56±9	56±8	57±11	0.65
Varón (%)	29 (96.7)	25 (86.2)	25 (89.3)	28 (90.3)	0.57
DM (%)	4 (13.3)	2 (6.9)	6 (21.4)	3 (9.7)	0.38
Hipertensión (%)	8 (26.7)	12 (41.4)	8 (28.6)	14 (45.2)	0.35
Dislipemia (%)	17 (56.7)	14 (48.3)	11 (39.3)	11 (35.5)	0.35
Tabaquismo (%)	17 (56.7)	18 (62.1)	16 (57.1)	17 (54.8)	0.95
IMC	27±4	29±4	26±4	28±3	0.10
CK-MB (U/L)	337±262	307±188	350±223	328±209	0.92
Creatinina (mg/dl)	0.91±0.21	0.88±0.17	0.86±0.20	0.90±0.15	0.78
Col total (mg/dl)	183±46	169±47	179±40	160±38	0.20
HDL (mg/dl)	42±13	38±12	41±14	39±10	0.56
LDL(mg/dl)	114±40	104±38	111±33	93±27	0.13
Triglicéridos (mg/dl)	139±59	138±50	140±53	118±38	0.30
Hemoglobina (g/dl)	14.4±1.2	14.0±1.5	13.9±1.3	13.8±1.5	0.39
Nº plaquetas (x10 <sup>9</sup> )/L	218±65	204±37	217±67	209±59	0.90
T de protrombina (s)	20±24	19±17	21±21	19±18	0.14
Fibrinógeno (mg/dL)	506±130	460±127	452±115	466±126	0.51
Infarto anterior (%)	19 (63.3)	20 (69)	23 (82.1)	21 (67.7)	0.44
Longitud stent	23±6	21±5	21±6	20±7	0.52
Diámetro stent	3.3±0.3	3.4±0.4	3.3±0.3	3.3±0.3	0.72
ICP Primaria (%)	8 (26.7)	8 (27.6)	8 (27.6)	8 (25.8)	0.89
ICP Programada (%)	13 (43.3)	8 (27.6)	8 (27.6)	10 (32.3)	
ICP Rescate (%)	7 (23.3)	8 (27.6)	10 (34.5)	10 (32.3)	
ICP Tardía (%)	2 (6.7)	5 (17.2)	2 (6.9)	3 (9.7)	
Tratamiento alta (%):					
Aspirina	27 (90)	29 (100)	26 (96)	30 (97)	0.28
Clopidogrel	30 (100)	29 (100)	27 (100)	30 (97)	0.42
IECAs	25 (83)	24 (83)	23 (85)	23 (74)	0.70
B-bloq	28 (93)	24 (83)	24 (89)	29 (93)	0.48
Estatinas	28 (93)	28 (97)	27 (100)	30 (97)	0.59

**Tabla 14.** Características basales y datos de la infusión celular y la estimulación con factor en los pacientes según grupo de tratamiento. DM: diabetes mellitus. IMC: índice de masa corporal. G-CSF: Factor estimulador de colonias granulocíticas. CK-MB: creatinina-kinasa isoenzima específico de miocardio. HDL: lipoproteína de alta densidad. LDL: lipoproteína de baja densidad. ICP: intervencionismo coronario percutáneo. IECAs: inhibidores de la enzima convertasa de angiotensina.

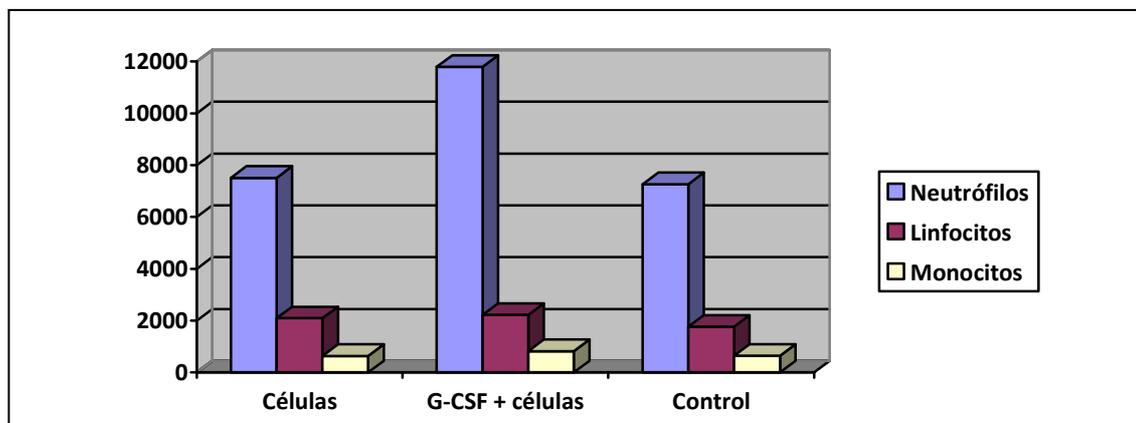


Figura 11. Comparación de la fórmula leucocitaria en valores absolutos ( $\times 10^6/L$ ) entre grupos de tratamiento.

## Variables cuantitativas del stent

### I. Situación basal de la arteria responsable

Los segmentos obstruidos antes de la revascularización no presentaron diferencias significativas y las variables angiográficas se muestran en la tabla 15.

Variable	Diámetro Referencia	Diámetro mínimo	% Estenosis
Células (n=30)	2.61 $\pm$ 0.54	0.77 $\pm$ 0.59	68.96 (54.30-100)
G-CSF (n=27)	2.86 $\pm$ 0.83	0.53 $\pm$ 0.59	100 (61.20-100)
G-CSF + células (n=26)	2.74 $\pm$ 0.54	0.60 $\pm$ 0.58	75.61 (57.92-100)
Control (n=27)	2.86 $\pm$ 0.82	0.77 $\pm$ 0.68	67.97 (54.55-100)
<b>Valor de p</b>	0.48	0.36	0.27

Tabla 15. Variables angiográficas analizadas en el momento previo a la angioplastia en los segmentos obstruidos en los cuatro grupos de tratamiento. G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos.

## II. Situación de la arteria responsable tras la revascularización

Los segmentos analizados a la semana de la revascularización tampoco presentaron diferencias significativas y las variables angiográficas se muestran en la tabla 16. En cuanto a la longitud del segmento analizado fue estadísticamente similar ( $p=0.55$ ), en el grupo de células se analizaron 39.5 mm (34.7-54.8), en el de estimulación 36.6 mm (33.3-46.3), en el combinado 33.6 mm (29.4-44.6) y en el control se analizaron 37.2 mm (26.0-49.3).

En conclusión, los segmentos analizados tras la revascularización son similares, homogéneos en cuanto a diámetro y longitud, sin diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos de tratamiento. Estos diámetros serán los utilizados como referencia para valorar la pérdida de luz y la reestenosis en el seguimiento a los 9 meses.

Variable	Diámetro Referencia	Diámetro mínimo	% Estenosis
Células (n=29)	2.89 ± 0.57	2.15 ± 0.52	25.11 (17.10-30.59)
G-CSF (n=29)	3.24 ± 0.72	2.38 ± 0.48	26.84 (16.61-31.09)
G-CSF + células (n=27)	2.89 ± 0.50	2.24 ± 0.55	22.33 (18.19-27.63)
Control (n=28)	3.03 ± 0.59	2.35 ± 0.58	18.92 (14.63-30.83)
Valor de p	0.12	0.37	0.82

**Tabla 16.** Variables angiográficas analizadas a la semana de la revascularización en los segmentos tratados en los cuatro grupos de tratamiento. G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos.

### **a. Análisis de subsegmentos en el implante**

Explicamos en el capítulo previo de material y métodos que en un segmento tratado con stent distinguíamos el subsegmento stentado, el borde o subsegmento distal (5 mm distal al stent) y el borde o subsegmento proximal (5 mm proximal) como se mostró en la figura 6 (ver página 147).

El análisis de los bordes es fundamental, ya que parte de la pérdida de luz tardía o reestenosis se produce en ellos y no en el segmento propiamente recubierto por stent.

Para profundizar en la búsqueda de diferencias entre los grupos de tratamiento, analizamos los segmentos a estudio en conjunto y en cada uno de sus subsegmentos, para confirmar que efectivamente se trata de segmentos similares en el momento del implante.

## Subsegmento distal en el implante

Las variables obtenidas del análisis cuantitativo angiográfico de los 5 mm distales al stent no mostraron diferencias significativas entre los cuatro grupos de tratamiento (tabla 17). Estos diámetros nos servirán de referencia para la determinación de pérdida de luz tardía en el subsegmento distal a los 9 meses tras la angioplastia.

La longitud real analizada fue cercana a los 5 mm teóricos en todos los grupos de tratamiento, sin diferencias significativas ( $p=0.71$ ). Así, se analizaron 4.92 mm (4.85-4.97) distales al stent en el de grupo de células, 4.92 mm (4.85-5.00) en el de estimulación, 4.87 mm (4.79-4.96) en el grupo combinado y 4.86 mm (4.77-4.95) en el grupo control.

En conclusión, los subsegmentos distales en el momento del implante, eran similares en diámetro y longitud entre los cuatro grupos de tratamiento.

Variable	Diámetro Referencia	Diámetro mínimo	% Estenosis
Células (n=29)	2.66 ± 0.51	2.21 ± 0.58	14.86 (10.24-23.57)
G-CSF (n=29)	2.90 ± 0.62	2.33 ± 0.57	17.08 (13.67-26.37)
G-CSF + células (n=27)	2.64 ± 0.38	2.20 ± 0.51	14.51 (9.89-23.07)
Control (n=28)	2.78 ± 0.51	2.38 ± 0.65	15.29 (3.09-21.38)
<b>Valor de p</b>	0.22	0.59	0.81

**Tabla 17.** Variables angiográficas analizadas a la semana de la revascularización en los 5 mm distales al stent en los cuatro grupos de tratamiento. G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos.

## Subsegmento proximal en el implante

Las variables obtenidas del análisis cuantitativo angiográfico de los 5 mm proximales al stent no mostraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento (tabla 18).

La longitud del segmento proximal analizado fue cercana a los 5 mm teóricos en todos los grupos, sin diferencias significativas ( $p=0.53$ ). Se analizaron 4.85 mm (2.73-4.93) proximales al stent en el grupo de células, 4.87 mm (3.67-4.96) en el de estimulación, 4.83 mm (3.72-4.94) en el combinado y 4.85 mm (3.98-4.95) en el control.

En conclusión, los subsegmentos proximales en el momento del implante, eran similares en diámetro y longitud entre los cuatro grupos de tratamiento.

<b>Variable</b>	<b>Diámetro Referencia</b>	<b>Diámetro mínimo</b>	<b>% Estenosis</b>
Células (n=29)	3.33 ± 0.40	2.91 ± 0.56	11.21 (4.76-22.28)
G-CSF (n=29)	3.40 ± 0.55	2.93 ± 0.58	12.35 (5.57-24.56)
G-CSF + células (n=27)	3.26 ± 0.45	2.83 ± 0.54	14.25 (5.38-19.87)
Control (n=28)	3.46 ± 0.48	3.07 ± 0.59	9.61 (5.06-16.81)
<b>Valor de p</b>	0.43	0.48	0.59

**Tabla 18.** Variables angiográficas analizadas a la semana de la revascularización en los 5 mm proximales al stent en los cuatro grupos de tratamiento. G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos.

## Subsegmento stentado en el implante

Los subsegmentos recubiertos por stent analizados a la semana de la revascularización no presentaban diferencias significativas (tabla 19).

No se apreciaron tampoco diferencias estadísticamente significativas al comparar la longitud tratada con stent en los diferentes grupos ( $p=0.52$ ). El análisis mostró una longitud analizada de 24.24 mm (16.53-29.79) en el de células, 18.03 mm (15.82-21.23) en el de estimulación, 17.43 mm (14.21-28.02) en el grupo combinado y 20.86 mm (12.23-29.32) en el grupo control.

En conclusión, los subsegmentos recubiertos de stent en el momento del implante, eran similares en diámetro y longitud entre los cuatro grupos de tratamiento.

<b>Variable</b>	<b>Diámetro Referencia</b>	<b>Diámetro mínimo</b>	<b>% Estenosis</b>
Células (n=29)	3.02 ± 0.40	2.65 ± 0.43	12.52 (9.00-15.42)
G-CSF (n=29)	3.17 ± 0.55	2.86 ± 0.53	10.35 (7.62-12.10)
G-CSF + células (n=27)	3.05 ± 0.38	2.70 ± 0.35	11.59 (7.29-14.38)
Control (n=28)	3.20 ± 0.42	2.79 ± 0.41	11.83 (7.88-14.30)
<b>Valor de p</b>	0.37	0.27	0.10

**Tabla 19.** Variables angiográficas analizadas a la semana de la revascularización en el subsegmento recubierto por stent en los cuatro grupos de tratamiento. G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos.

## **b. Acute gain o ganancia aguda**

Con las variables previamente determinadas de MLD basal (antes de la revascularización) y el MLD tras la dilatación, se puede obtener la ganancia aguda expresada en milímetros o "acute gain", es decir, el diámetro luminal ganado tras la dilatación, que no es otra cosa que la diferencia de dichos valores.

La ganancia aguda (expresada como media  $\pm$  SD) fue de:  $1.90 \pm 0.66$ mm en el grupo celular,  $2.38 \pm 0.78$ mm en el de estimulación aislada con G-CSF,  $2.10 \pm 0.71$ mm en el combinado y de  $2.03 \pm 0.75$ mm en el control, sin diferencias significativas entre ellos ( $p=0.10$ ).

A estas alturas, hemos descartado razonablemente diferencias angiográficas significativas entre los cuatro grupos de tratamiento de nuestro estudio en el momento basal.

### III. Situación de la arteria responsable a los 9 meses

Los segmentos tratados de los cuatro grupos de tratamiento no presentan diferencias significativas en el seguimiento (tabla 20).

Se considera reestenosis angiográfica como variable categórica dicotómica (con únicos valores posibles "sí" o "no") cuando el valor del porcentaje de estenosis supera el 50%. Esto sucedió en tres pacientes. Uno de ellos del grupo control con un 63.96% en el subsegmento stentado, otro en el grupo de células con un 53.27% también en el subsegmento stentado y otro en el grupo de estimulación con un 53.45% en el subsegmento proximal. No se realizó ICP a ninguno de ellos.

En cuanto a la longitud del segmento analizado fue estadísticamente similar ( $p=0.56$ ). En el grupo de células el segmento total analizado medía 38.31 mm (33.25-52.75), en el de estimulación 35,48 mm (29.25-42.62), en el combinado 33.74 mm (30.19-46.76) y en el control 35.80 mm (27.44-51.71).

Variable	Diámetro Referencia	Diámetro mínimo	% Estenosis
Células (n=30)	3.01 ± 0.65	2.12 ± 0.53	26.93 (19.97-37.04)
G-CSF (n=25)	3.10 ± 0.52	2.28 ± 0.52	23.51 (17.26-31.59)
G-CSF + células (n=27)	2.78 ± 0.58	2.05 ± 0.48	25.94 (14.89-34.85)
Control (n=25)	3.04 ± 0.58	2.16 ± 0.75	28.05 (18.59-35.46)
<b>Valor de p</b>	0.23	0.52	0.69

**Tabla 20.** Variables angiográficas analizadas en el total del segmento tratado a los 9 meses de seguimiento en los cuatro grupos de tratamiento. G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos.

## **a. Análisis de subsegmentos a los 9 meses**

### **Subsegmento distal a los 9 meses**

Los diámetros obtenidos del análisis de los 5 mm distales al stent en los cuatro grupos de tratamiento a los 9 meses de seguimiento fueron similares (tabla 21).

El análisis mostró una longitud analizada cercana a los 5 mm teóricos en todos los grupos de tratamiento, sin diferencias significativas ( $p=0.95$ ). Se analizaron 4.92 mm (4.83-4.97) en el grupo de células, 4.89 mm (4.83-4.94) en el de estimulación, 4.92 mm (4.83-4.98) en el grupo combinado y 4.91 mm (4.81-4.98) en el grupo control.

En conclusión, los subsegmentos distales analizados a los 9 meses de seguimiento eran similares en diámetro y longitud entre los cuatro grupos de tratamiento.

<b>Variable</b>	<b>Diámetro Referencia</b>	<b>Diámetro mínimo</b>	<b>% Estenosis</b>
Células (n=30)	2.55 ± 0.53	2.20 ± 0.54	14.07 (9.29-17.34)
G-CSF (n=25)	2.81 ± 0.47	2.37 ± 0.42	16.78 (9.11-20.85)
G-CSF + células (n=27)	2.55 ± 0.36	2.16 ± 0.45	11.22 (8.54-18.85)
Control (n=25)	2.66 ± 0.50	2.28 ± 0.52	12.37 (9.05-19.02)
<b>Valor de p</b>	0.16	0.41	0.64

**Tabla 21.** Variables angiográficas analizadas en los 5 mm distales al stent a los 9 meses de seguimiento en los cuatro grupos de tratamiento. G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos.

## Subsegmento proximal a los 9 meses

Los diámetros obtenidos del análisis de los 5 mm proximales al stent en los cuatro grupos de tratamiento a los 9 meses de seguimiento fueron similares (tabla 22).

El análisis mostró una longitud analizada cercana a los 5 mm teóricos en todos los grupos de tratamiento, sin diferencias significativas ( $p=0.62$ ). Se analizaron 4.83 mm (2.45-4.97) proximales al stent en el grupo de células, 4.89 mm (3.80-4.93) en el de estimulación, 4.83 mm (3.35-4.93) en el grupo combinado y 4.87 mm (3.54-4.97) en el grupo control.

En conclusión, los subsegmentos proximales al stent analizados a los nueve meses eran similares en longitud y diámetro al comparar los cuatro grupos de tratamiento.

Variable	Diámetro Referencia	Diámetro mínimo	% Estenosis
Células (n=30)	3.11 ± 0.43	2.60 ± 0.58	14.29 (4.81-24.87)
G-CSF (n=25)	3.18 ± 0.45	2.61 ± 0.63	12.73 (7.69-24.39)
G-CSF + células (n=27)	3.22 ± 0.50	2.70 ± 0.59	10.48 (6.76-21.71)
Control (n=25)	3.32 ± 0.47	2.95 ± 0.61	8.43 (3.99-15.34)
<b>Valor de p</b>	0.39	0.13	0.58

**Tabla 22.** Variables angiográficas analizadas en los 5 mm proximales al stent a los 9 meses de seguimiento en los cuatro grupos de tratamiento. G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos.

## Subsegmento stentado a los 9 meses

Los diámetros obtenidos del análisis del subsegmento recubierto de stent en los cuatro grupos a los 9 meses de seguimiento fueron similares (tabla 23).

No se apreciaron tampoco diferencias estadísticamente significativas al comparar la longitud del segmento recubierto de stent en los diferentes grupos ( $p=0.70$ ) que fue de 22.47 mm (15.62-30.53) en el grupo de células, 17.03 mm (15.23-25.37) en el de estimulación, 15.88 mm (15.01-25.94) en el grupo combinado y 22.02 mm (14.69-26.02) en el grupo control.

En conclusión, los subsegmentos propiamente recubiertos de stent analizados a los nueve meses eran similares en longitud y diámetro al comparar los cuatro grupos de tratamiento.

<b>Variable</b>	<b>Diámetro Referencia</b>	<b>Diámetro mínimo</b>	<b>% Estenosis</b>
Células (n=30)	2.85 ± 0.45	2.36 ± 0.57	16.64 (8.85-23.55)
G-CSF (n=25)	3.00 ± 0.46	2.59 ± 0.44	12.31 (9.54-15.97)
G-CSF + células (n=27)	2.98 ± 0.46	2.64 ± 0.43	10.44 (7.94-13.68)
Control (n=25)	3.09 ± 0.47	2.65 ± 0.61	12.32 (8.77-16.57)
<b>Valor de p</b>	0.27	0.13	0.21

**Tabla 23.** Variables angiográficas analizadas en el subsegmento recubierto de stent a los 9 meses de seguimiento en los cuatro grupos de tratamiento. G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos.

**b. Pérdida de luz tardía**

Hemos analizado la situación de los segmentos y subsegmentos a los nueve meses de seguimiento y no hemos hallado diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, vamos a comparar ahora la evolución de los cuatro grupos de tratamiento, utilizando para ello el diámetro luminal mínimo al inicio y a los nueve meses, determinando con ellos la pérdida de luz tardía (“late lumen loss” o LLL) en el segmento coronario tratado. La pérdida de luz tardía en el segmento total a los 9 meses fue similar ( $p=0.74$ ).

La similar evolución del diámetro luminal desde el MLD inicial al MLD en el seguimiento en los cuatro grupos se muestra en la tabla 24.

Variable	Células	G-CSF	G-CSF + células	Control	Valor p
MLD preICP	0.77±0.59	0.53±0.59	0.60±0.58	0.77±0.68	0.36
Ganancia aguda	+1.90±0.66	+2.38±0.78	+2.10±0.71	+2.03±0.75	0.10
MLD postICP	2.15±0.52	2.38±0.48	2.23±0.55	2.35±0.58	0.37
LLL	-0.03±0.51	-0.10±0.52	-0.19±0.41	-0.11±0.72	0.74
MLD 9 meses	2.12±0.53	2.28±0.52	2.05±0.48	2.16±0.75	0.52

**Tabla 24.** Evolución del diámetro mínimo luminal (MLD) desde la angioplastia hasta los 9 meses de seguimiento en el conjunto del segmento tratado. Valores expresados en milímetros con signo positivo si son ganancias y negativo si son pérdidas. ICP: intervencionismo coronario percutáneo. LLL: pérdida de luz tardía.

Se analizó también la pérdida luminal por subsegmentos sin hallarse tampoco diferencias significativas ni en el subsegmento stentado ( $p=0.06$ ), ni en el proximal ( $p=0.25$ ) ni en el subsegmento distal ( $p=0.67$ ). La evolución angiográfica se recoge en la tabla 25. Se descartan diferencias significativas entre grupos de tratamiento en pérdida de luz tardía tanto analizando el conjunto del segmento stentado, como por subsegmentos.

Variable	Células	G-CSF	G-CSF + células	Control	Valor p
Distal MLD postICP	2.21±0.58	2.33±0.57	2.20±0.51	2.38±0.65	0.59
Distal MLD 9 ms	2.20±0.55	2.37±0.42	2.16±0.45	2.28±0.52	0.41
LLL distal	-0.01±0.5	+0.07±0.4	-0.04±0.3	-0.06±0.4	0.67
Stent MLD postICP	2.65±0.43	2.86±0.53	2.70±0.35	2.79±0.41	0.27
Stent MLD 9 ms	2.36±0.57	2.59±0.44	2.64±0.43	2.65±0.61	0.13
LLL stent	-0.29±0.4	-0.26±0.3	-0.06±0.4	-0.10±0.4	0.06
Proximal MLD postICP	2.91±0.56	2.93±0.58	2.83±0.54	3.07±0.60	0.48
Proximal MLD 9 meses	2.60±0.58	2.61±0.63	2.70±0.59	2.95±0.61	0.13
LLL proximal	-0.29±0.5	-0.35±0.7	-0.13±0.38	-0.11±0.48	0.25

**Tabla 25.** Evolución del diámetro luminal por subsegmentos. Valores expresados en milímetros. LLL: pérdida luminal tardía. MLD: diámetro mínimo luminal. ICP: intervencionismo coronario percutáneo. G-CSF: Factor estimulador de colonias.

## Variables cuantitativas de la progresión de la enfermedad

Presentamos los resultados del análisis angiográfico cuantitativo de segmentos coronarios no tratados para objetivar si existe aceleración de la enfermedad aterosclerótica con las distintas terapias en nueve meses de seguimiento. Para ello hemos decidido analizar segmentos localizados distalmente al stent implantado en la arteria responsable y segmentos localizados en otra arteria coronaria principal distinta a la responsable, preferentemente con enfermedad moderada no tratada.

El objetivo del primer análisis es estudiar el posible efecto local (distal al sitio de implante celular) sobre la aterosclerosis. El objetivo del segundo análisis es estudiar el posible efecto deletéreo de la terapia celular sobre lesiones coronarias no tratadas y que no reciben infusión de células de forma directa, más especialmente, del factor estimulador. En ambos casos, basaremos nuestro análisis en la evolución de los diámetros lumbinales mínimos y de referencia en esos segmentos.

Los requisitos angiográficos para el análisis fueron: segmentos de al menos 20 mm de longitud (siempre que fue posible), con un calibre mayor o igual a 1.5 mm de diámetro luminal medio y al menos 5 mm distales al stent.

## I. En la arteria responsable y tratada con stent

Iniciamos el análisis con 103 pacientes. Diecisiete pacientes no presentaban estudio basal o de seguimiento o no presentaban segmentos distales subsidiarios de estudio. A continuación, se excluyeron para el análisis aquellos pacientes cuyo diámetro luminal medio fuera menor de 1.5 mm. Finalmente, los resultados que se muestran son de aquellos pacientes que cumplían los requisitos de análisis, un total de 84 pacientes (19 células, 23 estimulación, 21 combinada y 21 control).

### a. Situación al implante del segmento distal de la ARI

Empezamos el análisis confirmando la homogeneidad de los cuatro grupos en el momento del implante. En la tabla 26 se recogen los diámetros luminales mínimos y de referencia, así como la estenosis en porcentaje, en los segmentos distales al punto de infusión en el momento basal, una semana después de la angioplastia.

Variable	Diámetro Referencia	Diámetro mínimo	% Estenosis
Células (n=19)	1.89 ± 0.40	1.32 ± 0.27	24.35 ± 8.15
G-CSF (n=23)	2.05 ± 0.42	1.57 ± 0.33	20.96 ± 6.89
G-CSF + células (n=21)	2.05 ± 0.37	1.51 ± 0.37	22.43 ± 10.23
Control (n=21)	1.98 ± 0.35	1.51 ± 0.29	20.14 ± 6.71
Valor de p	0.48	0.09	0.37

**Tabla 26.** Variables angiográficas basales del segmento distal de la ARI en los cuatro grupos de tratamiento. G-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos.

### **b. Situación a los 9 meses del segmento distal de la ARI**

En la tabla 27 se recogen los diámetros lumbales mínimos y de referencia de los segmentos distales al punto de infusión a los 9 meses de seguimiento y se comprueba que no existen diferencias significativas. En un paciente del grupo control se objetivó una obstrucción total distal al stent (más allá de los 5 mm).

### **c. Pérdida de diámetro luminal y de referencia**

Más allá de no haber encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento en la situación de los segmentos en el momento inicial y a los nueve meses, se quiso analizar si existían diferencias en la progresión, entendida como pérdida de diámetro luminal mínimo o de referencia en el seguimiento. En la tabla 28 aparece el análisis de la varianza de las variables evolutivas en este segmento distal de la arteria responsable del infarto.

El hallazgo de un valor de p estadísticamente significativo en el análisis de la varianza supuso un análisis posterior con el test de Tukey (tabla 29), que descartó significación respecto del grupo control.

Con todo ello, concluimos que la terapia celular aplicada en pacientes tras sufrir un infarto agudo de miocardio no produce una aceleración de la enfermedad distal a la arteria responsable del infarto.

Variable	Diámetro Referencia	Diámetro mínimo	% Estenosis
Células (n=19)	2.00 ± 0.41	1.45 ± 0.29	21.55 ± 8.24
G-CSF (n=23)	2.13 ± 0.44	1.49 ± 0.30	23.10 ± 12.47
G-CSF + células (n=21)	1.94 ± 0.34	1.44 ± 0.35	22.56 ± 8.02
Control (n=21)	1.51 ± 0.26	1.51 ± 0.27	21.34 ± 8.60
<b>Valor de p</b>	0.35	0.84	0.92

**Tabla 27.** Variables angiográficas en el seguimiento del segmento distal de la ARI en los cuatro grupos de tratamiento. G-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos.

Variable	Células	G-CSF	G-CSF +Células	Control	Valor de p
Δ MLD	0.12±0.22	-0.08±0.26	-0.07±0.26	0.00±0.19	0.03
Δ Diám Referencia	0.11±0.43	0.08±0.34	-0.11±0.34	0.01±0.26	0.18
Δ Estenosis (%)	2.81±8.66	2.14±13.13	0.12±9.20	1.20±6.77	0.41

**Tabla 28.** Cambios en diámetros mínimos y de referencia a los 9 meses respecto de los valores basales expresados en milímetros, así como de porcentaje de estenosis. Con signo positivo aparecen los incrementos de luz y en negativo las pérdidas. MLD: diámetro luminal mínimo. Diám Referencia: diámetro de referencia. G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos.

Grupo I	Grupo J	I-J	Error Standard	Valor de P
Control	Células	-0.12	0.075	0.36
Control	G-CSF	0.08	0.071	0.67
Control	G-CSF + Células	0.07	0.072	0.76

**Tabla 29.** HSD de Tukey del incremento de diámetro luminal mínimo. HSD: Diferencia honestamente significativa. G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos.

## **II. En una arteria principal diferente a la tratada (contralateral)**

Presentamos los resultados del análisis de una arteria diferente a la tratada y no responsable del infarto. Se ha optado por una arteria coronaria nacida del tronco coronario izquierdo (es decir, DA o CX) en caso de que la arteria responsable fuera la coronaria derecha y al revés, la CD cuando la ARI era la DA o la CX, y se la ha llamado "contralateral".

### **a. Situación basal del segmento contralateral**

Nuestro objetivo inicial fue confirmar que los segmentos a estudio eran similares en los cuatro grupos de tratamiento y que presentaban un calibre apropiado para una cuantificación fiable.

En la tabla 30 se muestran los diámetros luminal mínimo y de referencia del segmento de la arteria no responsable que escogemos para estudio y en el momento del implante, que no presentaron diferencias significativas y que eran, por tanto, similares.

## **b. Situación a los 9 meses del segmento contralateral**

En la tabla 31 se muestran los diámetros luminal mínimo y de referencia del segmento de la arteria no responsable que habíamos escogido a los 9 meses de seguimiento, que tampoco presentaron diferencias significativas.

<b>Variable</b>	<b>Diámetro Referencia</b>	<b>Diámetro mínimo</b>	<b>% Estenosis</b>
Células (n=29)	2.52 ± 0.66	1.89 ± 0.61	23.68 ± 12.38
G-CSF (n=25)	2.68 ± 0.73	1.91 ± 0.67	24.03 ± 11.81
G-CSF + células (n=25)	2.56 ± 0.77	1.90 ± 0.55	23.07 ± 8.02
Control (n=19)	2.65 ± 0.77	2.02 ± 0.65	23.21 ± 11.00
<b>Valor de p</b>	0.48	0.89	0.99

**Tabla 30.** Variables angiográficas basales del segmento a estudio de la arteria contralateral en los cuatro grupos de tratamiento. G-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos.

<b>Variable</b>	<b>Diámetro Referencia</b>	<b>Diámetro mínimo</b>	<b>% Estenosis</b>
Células (n=29)	2.65 ± 0.64	1.83 ± 0.66	28.81 ± 13.94
G-CSF (n=25)	2.66 ± 0.63	1.95 ± 0.58	24.02 ± 10.74
G-CSF + células (n=25)	2.85 ± 0.91	2.04 ± 0.73	20.96 ± 7.95
Control (n=19)	2.61 ± 0.91	1.91 ± 0.72	24.76 ± 12.03
<b>Valor de p</b>	0.71	0.74	0.0.10

**Tabla 31.** Variables angiográficas de seguimiento del segmento a estudio de la arteria contralateral distal en los cuatro grupos de tratamiento. G-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos.

### **c. Pérdida de diámetro luminal y de referencia**

Del mismo modo que antes, estudiamos la evolución del diámetro luminal y de referencia en la arteria contralateral no tratada. En la tabla 32 aparece el análisis de la varianza de las variables evolutivas en este segmento distal de la arteria responsable del infarto. El hallazgo de un valor de p significativo en el primer análisis con ANOVA supuso un análisis posterior con el test de Tukey (tabla 33) que descartó significación respecto del grupo control.

<b>Variable</b>	<b>Células</b>	<b>G-CSF</b>	<b>G-CSF +Células</b>	<b>Control</b>	<b>Valor p</b>
$\Delta$ MLD	-0.05±0.28	0.04±0.39	0.14±0.37	-0.11±0.36	0.09
$\Delta$ Diám referencia	0.13±0.40	-0.02±0.45	0.29±0.57	-0.04±0.34	0.05
$\Delta$ Estenosis (%)	5.13±8.21	-0.01±7.95	-2.11±7.07	1.55±10.17	0.02

**Tabla 32.** Cambios en diámetros mínimos y de referencia a los 9 meses respecto de los valores basales expresados en milímetros, así como de porcentaje de estenosis. Con signo positivo aparecen los incrementos de luz y en negativo las pérdidas. MLD: diámetro luminal mínimo. Diám referencia: diámetro de referencia. G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos.

<b>Grupo I</b>	<b>Grupo J</b>	<b>I-J</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Valor P</b>
Control	Células	-3.59	2.45	0.46
Control	G-CSF	1.55	2.52	0.93
Control	G-CSF + Células	3.65	2.52	0.47

**Tabla 33.** HSD de Tukey del incremento de diámetro luminal mínimo. HSD: Diferencia honestamente significativa.

### III. Subanálisis del efecto del factor estimulador de colonias

Decidimos estudiar con mayor profundidad si existía un efecto proaterosclerótico con la administración subcutánea de G-CSF sobre segmentos no tratados ni sometidos a la infusión directa de células progenitoras. Para ello realizamos un subanálisis formando dos grupos: aquellos que recibieron terapia convencional frente a aquellos que recibieron factor estimulador (en este último grupo se incluyeron los pacientes que recibieron únicamente G-CSF y aquellos que recibieron terapia combinada). Luego comparamos la evolución de los segmentos de la arteria contralateral de los dos grupos formados. No se apreciaron diferencias entre los grupos que recibían estimulación frente a los controles (tabla 34).

Variable	G-CSF	Control	Valor p
N	50	19	
Δ Diámetro luminal mínimo	+0.09±0.38	-0.11±0.36	0.06
Δ Diámetro referencia	+0.13±0.53	-0.04±0.34	0.19
Δ Estenosis (%)	-1.06±7.52	1.55±10.17	0.25

**Tabla 34.** Cambios en diámetros mínimos y de referencia a los 9 meses respecto de los valores basales expresados en milímetros, así como de porcentaje de estenosis. Con signo positivo aparecen los incrementos de luz y en negativo las pérdidas.

## DISCUSIÓN

---



# Exposición del fundamento del estudio

## **I. El prometedor futuro de la terapia celular y el temido “fenómeno de Jano”**

La evidencia de que el corazón tiene capacidad regenerativa ha despertado el entusiasmo de los investigadores. En una sociedad donde el infarto de miocardio y sus secuelas suponen más de la mitad de las muertes de origen cardiovascular, la posibilidad de reparar el tejido dañado, aunque sea lejana, es, y ha de ser, de interés general<sup>84</sup>.

Ahora sabemos que existen células residentes precursoras en el tejido cardíaco y que tras el síndrome coronario agudo también se produce una movilización de progenitores procedentes de médula ósea, lo que se interpreta como un intento de reparación insuficiente<sup>79</sup>. Existen diferentes formas de aumentar el número de precursores que llegan al miocardio. Una de ellas es la administración intracoronaria directa de la fracción mononuclear del aspirado de médula ósea. Además, para que el aspirado sea más rico en células progenitoras, podemos administrar factores estimuladores del crecimiento como el G-CSF antes de su extracción. Otra opción es movilizar las células progenitoras al torrente sanguíneo y

confiar en que el aumento sistémico de células en sangre periférica alcanzará de forma suficiente al tejido diana<sup>237</sup>.

Los estudios con terapia celular tras el infarto agudo de miocardio se centran en analizar los beneficios en la perfusión y en la contractilidad global y regional. Sin embargo, estos mismos precursores a los que se les presupone una capacidad reparadora del tejido lesionado están implicados en la endotelización del stent y en la aterosclerosis. El equilibrio que finalmente se establezca entre el potencial proaterogénico y antiaterogénico es difícil de prever. Es decir, potencialmente estas células pueden no sólo no ser beneficiosas para el buen resultado de la angioplastia con stent y para las placas de ateroma, sino dañinas. Este es el conocido como efecto de Jano o de las dos caras<sup>73</sup>.

En el trabajo que presentamos se pretende analizar este aspecto a veces ignorado. Pero, ¿cómo vigilar el temido efecto proaterogénico de las células precursoras sin añadir un riesgo significativo al paciente? Nuestro planteamiento parte de que la hiperplasia intimal del stent se relaciona con una pérdida de diámetro luminal. Del mismo modo entendemos que la progresión de la aterosclerosis puede ser valorada por esta misma pérdida de luz y de diámetro de referencia.

Basándonos en nuestra propia experiencia, con los estudios previamente publicados por Villa y col acerca de la reestenosis intrastent<sup>238</sup> y por Arnold y col

acerca de la enfermedad coronaria distal al stent implantado<sup>235</sup> nos pareció oportuno aplicar a este nuevo estudio aleatorizado los conocimientos adquiridos por nuestro grupo para el seguimiento de la reestenosis y la aterosclerosis.

## **II. El análisis cuantitativo angiográfico**

La coronariografía fue introducida en 1958. Se presentó como el procedimiento definitivo para estudiar la distribución y la severidad de la enfermedad coronaria en sujetos vivos. Se estudió y se concluyó que el mayor determinante del impacto hemodinámico de una lesión era su diámetro mínimo. Rafflenbeul y col determinaron que lesiones de más del 90% eran más propensas a ocluirse que lesiones menores en un estudio coronariográfico de control anual en pacientes con angina inestable<sup>239</sup>.

Durante algunas décadas los cardiólogos interpretaron estos estudios de forma subjetiva o semicuantitativa. La variabilidad entre cardiólogos experimentados a la hora de cuantificar la mayor estenosis se estimaba en un 25%. En 1971, Gensini y col presentaron la angiografía cuantitativa. Los estudios para determinar la eficacia de medidas contra la aterosclerosis coronaria dejaron de basarse únicamente en el seguimiento clínico para hacerlo también con angiografía cuantitativa<sup>239</sup>.

El software informático de autodetección de bordes y análisis ha ido perfeccionándose hasta nuestros días. Así, la primera generación de programas

(CAAS, ARTREK) que magnificaban los diámetros de los vasos, sobre todo en los más pequeños, dejaron paso a la segunda generación (CMS, CAAS II, AWOS, Cardio 500) que corregían este defecto y se mostraban más fiables en lesiones complejas. La tercera generación utiliza detectores con panel digital e incluso existen reconstrucciones tridimensionales a partir de dos imágenes<sup>240</sup>.

Cierto es que la angiografía sólo nos muestra la luz del vaso y que, sin embargo, la aterosclerosis es la enfermedad de la pared del vaso. Sabemos que la placa de ateroma crece mucho antes de que la luz comience a estrecharse. De hecho, la mayor parte de los síndromes coronarios agudos son desencadenados por la rotura de una placa sin estenosis significativa. Es una realidad que la coronariografía no cuenta la historia entera. Otras técnicas, como la tomografía óptica, la ecografía intravascular y más recientemente el TCMD coronario, aportan información complementaria acerca de la composición de la placa coronaria y su vulnerabilidad<sup>241, 242</sup>.

Sin embargo, la obtención de imágenes angiográficas es un procedimiento sencillo y accesible, con un riesgo de muerte excepcional estimado en 1-2/1000. El análisis cuantitativo posterior permite obtener conclusiones acerca de la seguridad de la terapia celular sin riesgo añadido. La realización de un IVUS añade un riesgo de complicaciones que varía de 1.5 a 3.9%. La mayoría se deben a espasmo coronario inducido por la guía o el catéter y es reversible con nitroglicerina intracoronaria. Otras complicaciones derivadas del procedimiento (disección,

oclusión aguda, trombosis coronaria, IAM, necesidad de cirugía urgente) son excepcionales, pero existen. No parece por tanto justificado el uso habitual de IVUS en los estudios de terapia celular con objeto de garantizar la seguridad. El TCMD supone una radiación absorbida por el paciente comparable a 700-1000 radiografías de tórax, lo que al menos dobla la cantidad estimada para la realización de una coronariografía diagnóstica (155-555 radiografías de tórax).

### **III. La pérdida de luz tardía**

El seguimiento del fenómeno de la hiperplasia intimal intrastent fue objeto de debate hace años<sup>243</sup>. Con la aparición de las angioplastias con implante de stent se realizaron estudios angiográficos de control que intentaban determinar la reestenosis en el seguimiento de los segmentos tratados. Existían muchas definiciones para la reestenosis de acuerdo al porcentaje de estenosis: un aumento del 30% respecto del estudio basal, estenosis de más del 70% en el seguimiento, una pérdida del 50%... Además, el porcentaje de estenosis era una variable dependiente de otras dos, el diámetro mínimo y de referencia.

En 1988 Serruys y col abogaron por el uso de valores absolutos, es decir, el diámetro mínimo, y no porcentajes para facilitar la comparación de los distintos estudios. Se impuso la angiografía cuantitativa y apareció el concepto de pérdida de luz tardía<sup>244</sup>. Se comprobó la mayor reproducibilidad de esta última medida que se fue abriendo paso en los estudios de seguimiento de los stents. En definitiva,

parece claro a día de hoy que la pérdida de luz en el seguimiento nos informa adecuadamente de la hiperplasia intimal y de la reestenosis del stent.

Hemos presentado la reestenosis como un tipo especial de aterosclerosis, en el que el daño inicial al que se somete el endotelio (ya de por sí enfermo) es mecánico. En nuestro estudio se utiliza del mismo modo el diámetro luminal mínimo y el diámetro de referencia como medidas factibles, sencillas y reproducibles para el seguimiento de la aterosclerosis. De hecho, el porcentaje de estenosis de la luz de un vaso ya ha sido relacionado tiempo atrás con los eventos clínicos. Esta pérdida de luz también se ha utilizado en anteriores estudios de terapia celular para vigilar la progresión de la enfermedad aterosclerótica<sup>166, 233</sup>.

#### **IV. Desarrollo del modelo de análisis angiográfico**

El seguimiento angiográfico realizado por los distintos grupos de trabajo con células madre ha evolucionado desde los primeros estudios publicados.

El grupo de Kang y col (Hospital Universitario Nacional de Seúl) comienza a trabajar en el año 2003<sup>100</sup> con células madre periféricas movilizadas con factor G-CSF en el estudio MAGIC. La ICP tras la estimulación se realizó con stent convencional. Realizaban una coronariografía de control a los 6 meses mediante un analista independiente y detuvieron el estudio por objetivar en los pacientes que recibían G-CSF una tasa de reestenosis intrastent mayor de lo esperado. Como

variables de análisis utilizaron la pérdida diámetro mínimo luminal y el aumento de volumen de placa en el segmento recubierto de stent, además de la variable binaria de reestenosis. Considerando que la hiperplasia intimal intrastent podía haberse exacerbado con la estimulación con factor se decidieron a utilizar sólo stents recubiertos. Así, años después, en el 2006 <sup>166</sup>, publican su estudio MAGIC Cell 3 DES. Rectificando errores previos, se administra a los pacientes el G-CSF tras la ICP y se utiliza stent recubierto. Realizan un control angiográfico a los 6 meses. Como variables de análisis se utiliza la pérdida de luz tardía en los segmentos tratados (incluyendo los bordes) y la variable binaria de reestenosis sin encontrar diferencias significativas. Además, incluyen el análisis de la pérdida de diámetro luminal en el segmento distal en la ARI, en relación a estudios publicados por otros grupos de trabajo acerca del riesgo de acelerar la aterosclerosis, y concluyen que la infusión celular intracoronaria y el uso de G-CSF tras la ICP con stent recubierto son seguros. Finalmente, en el año 2008<sup>245</sup>, presentaron un subestudio con IVUS. Se analizaron tanto el segmento stentado (incluyendo bordes) como segmentos de referencia proximales y distales y no encontraron diferencias, pero refieren una tendencia a mayor hiperplasia intimal en los bordes del stent, sobre todo en relación a los stents recubiertos de paclitaxel.

También en el año 2003<sup>169</sup>, el grupo de Ripa y col (Ringshospitalet, Copenhague) inician el STEMMI trial, que consistía en la administración de G-CSF tras un infarto con angioplastia primaria. Se realizó una coronariografía de control a los 6 meses, analizando la zona de lesión y la zona stentada y no encontraron diferencias

significativas en los diámetros mínimos o de referencia ni tampoco en las pérdidas lumbales. En el año 2010<sup>246</sup>, publicaron un subestudio con IVUS sin evidenciar diferencias en la pérdida de luz tardía (expresada como volumen de neoíntima ni como área luminal mínima intrastent) a los 6 meses. Finalmente, en 2013<sup>247</sup>, publican los resultados clínicos del estudio a los 5 años de seguimiento y no encuentran mayor incidencia de eventos cardiovasculares en el grupo que recibe G-CSF.

En el año 2005<sup>180</sup>, Bartunek y col (Aalst, Bélgica) publican sus resultados con la administración intracoronaria de células seleccionadas CD 133+ tras un IAM con ICP. Objetivan una mayor tasa de reestenosis a los 4 meses de seguimiento que relacionan con los inflados repetidos de balón para el implante celular. En el año 2006<sup>233</sup>, publican los resultados de analizar el efecto de la infusión celular en el segmento stentado, en el segmento distal y en una arteria diferente a la ARI, a la que llaman contralateral. Veintiún pacientes recibieron terapia celular, y 17 fueron controles, no aleatorizados. La ICP se realizó con stent convencional. Analizan FFR y diámetros lumbales y de referencia, así como pérdida luminal expresada en milímetros y objetivan una mayor pérdida luminal intrastent y aceleración de la aterosclerosis en los segmentos distales. No se apreciaron diferencias en la contralateral. En 2007<sup>248</sup>, publican un estudio con 24 pacientes que recibieron células seleccionadas CD 133+ en la primera semana tras el IAM o meses después. Se realiza un estudio angiográfico y de FFR en los segmentos distales de ARI y en una arteria no ARI o contralateral (que llaman control) a los 4 meses y a los 8

meses. Concluyen que la administración precoz en la primera semana tras un IAM puede acelerar la aterosclerosis en la ARI distal al punto de infusión.

Sin embargo, en 2011<sup>249</sup>, Mansour y col publican sus resultados con células seleccionadas CD 133+ en el COMPARE-AMI, aleatorizado y prospectivo, placebo-control, con control angiográfico y FFR a los 4 meses, con control de la arteria contralateral, esta vez sin hallazgos.

En 2001<sup>250</sup>, el grupo de Frankfurt (Assmus, Zeiher) inició el estudio TOPCARE-AMI con células progenitoras de médula ósea o periféricas. No reportaron un aumento inesperado de reestenosis en el control angiográfico a los 4 meses. En 2006<sup>234</sup>, presentan un subestudio enfocado a vigilar la progresión de la aterosclerosis y la reestenosis con un control histórico. Se analizaron los diámetros lumbinales y la pérdida a los 4 meses así como las lesiones de novo distales al stent. No hubo diferencias significativas. Finalmente, en 2010<sup>152</sup>, realizan un nuevo estudio, esta vez aleatorizado, donde no objetivan ni mayor reestenosis ni progresión de la aterosclerosis ni diferencias en eventos cardiovasculares.

Finalmente, la experiencia de nuestro grupo comienza en el año 2002<sup>181</sup> con la infusión de células progenitoras no seleccionadas de médula ósea. Se publicaron los resultados frente a un grupo control no aleatorizado y no se objetivó mayor pérdida luminal ni reestenosis como variable binaria. En 2009<sup>238</sup>, Villa y col publicaron un subestudio comparando pacientes sometidos a terapia celular y que

recibían un stent recubierto frente a los que lo recibían convencional y confirmaba la persistencia del efecto beneficioso en términos de menor hiperplasia intimal en los pacientes que recibían stent recubierto, lo que animaba al uso de este tipo de stents como sugerían desde Corea. El estudio coronariográfico se complementó con un subestudio con IVUS. En 2010<sup>235</sup>, Arnold y col publicaron los resultados del análisis de la ARI distal y la arteria contralateral, de acuerdo al grupo belga, sin evidenciar diferencias entre el grupo que recibía células frente al control. También se realizó IVUS con similares hallazgos en un subgrupo de pacientes.

En el trabajo actual, se ha recogido la experiencia de los diferentes grupos, con el objetivo de vigilar la seguridad de la terapia celular. Hemos introducido en nuestro estudio la rutina del análisis por subsegmentos dado el diferente comportamiento de los territorios limítrofes al stent en los estudios de seguimiento (el conocido como efecto borde) y tras los resultados publicados por Kang y col en relación al stent de paclitaxel<sup>245</sup>. Hemos realizado controles angiográficos más tardíos (a los 9 en vez de a los 6 meses) que parecen recomendables en relación al fenómeno de reestenosis tardía o "late catch-up" de los stents recubiertos. Hemos analizado segmentos diferentes a la arteria tratada para vigilar la progresión de la aterosclerosis, así como segmentos distales a la infusión, en relación a los riesgos publicados por el grupo de Bartunek y col. Además, la presencia de diferentes grupos de tratamiento nos ha permitido valorar por separado el efecto de la terapia celular en tres modalidades: estimulación sistémica de progenitores e infusión celular directa con o sin estimulación previa.

El deseo de dar una solución a nuestros pacientes tras haber sufrido las consecuencias de un infarto de miocardio no puede hacernos olvidar la seguridad como criterio previo y fundamental. Las células progenitoras tienen un potencial no del todo conocido y sus mecanismos de acción, directos y paracrinos, escapan a nuestro conocimiento a día de hoy. Es obligada la realización de controles que descarten un efecto paralelo dañino de la angiogénesis, tan beneficiosa para el tejido isquémico pero potencialmente deleterea para la progresión de la placa de ateroma y para la hiperplasia intimal.

## **V. Características de nuestro estudio**

Hemos analizado, de forma centralizada y ciega, las grabaciones de los estudios coronariográficos y hemos determinado la pérdida de calibre de los segmentos stentados y de segmentos no tratados. Todo ello lo hemos comparado con un grupo de pacientes sometido a terapia convencional y que son sujetos controles que añaden fiabilidad a nuestras conclusiones.

## **Nuestros resultados en contexto**

Como presentamos en el capítulo previo, nuestros resultados apoyan la seguridad de la terapia celular. No se ha evidenciado una mayor pérdida de luz tardía intrastent en los pacientes que recibieron infusión celular intracoronaria directa ni

en los pacientes que recibieron estimulación con G-CSF ni terapia combinada. Del mismo modo, no se ha objetivado una aceleración de la aterosclerosis en la arteria responsable del infarto, distalmente al segmento tratado, ni en otra arteria diferente a la que se llamó contralateral.

El análisis se inició estableciendo la homogeneidad de los cuatro grupos de tratamiento en el momento basal, sobre todo en aquellas variables que pudieran falsear nuestras conclusiones finales. Ya dijimos que las células progenitoras ven modificado su número y actividad según la edad, sexo, fármacos y factores de riesgo cardiovascular<sup>78</sup>, y que la reestenosis se relaciona clásicamente con la longitud del stent, el diámetro de referencia del vaso, los factores de riesgo cardiovascular como diabetes mellitus, o con la estenosis residual. Todos estos predictores fueron analizados sin hallar diferencias significativas.

## **I. Estudios con factor estimulador de colonias**

En el contexto del infarto agudo de miocardio se han realizado varios estudios con administración aislada de G-CSF con el objeto de prolongar farmacológicamente la movilización de células madre de la médula ósea.

Algunos de ellos se han preocupado por vigilar el resultado del stent a largo plazo y han realizado estudios angiográficos de control. Sin embargo, el posible efecto sobre segmentos no tratados mecánicamente ha sido menos estudiado.

### **a. Pérdida de luz tardía en vasos tratados con stent**

Sobre este aspecto encontramos bastantes antecedentes en la literatura. Nuestro estudio viene a reafirmar los hallazgos y descarta que la estimulación con G-CSF en la fase aguda del infarto pueda aumentar la pérdida luminal del stent implantado.

La preocupación por el incremento de reestenosis se presentó con la publicación del estudio MAGIC<sup>100</sup> en el que los pacientes tras la angioplastia con stent convencional y que eran sometidos a estimulación con G-CSF parecían presentar mayor reestenosis. Estudios posteriores arrojaron resultados tranquilizadores. Así, un año después, en 2005, dos estudios rechazaron el aumento de reestenosis. Por un lado, Valgimigli y col<sup>172</sup> presentaban sus resultados con un pequeño grupo de 20 pacientes, aleatorizados a recibir G-CSF a dosis algo menores de 5 µgr/kg/día y durante 4 días o grupo control. El 60% de pacientes recibió stent convencional. El perfil clínico y angiográfico de la muestra era muy similar a nuestro estudio. En este caso, analizan pérdida de luz tardía y la variable binaria de reestenosis y concluyen que no existen diferencias y que el G-CSF se muestra seguro en este aspecto. Ese mismo año 2005, Ince y col<sup>101</sup> publican su estudio FIRSTLINE-AMI con 50 pacientes con IAM sometidos a angioplastia con stent convencional y G-CSF y analizan a los 6 meses pérdida de luz tardía sin hallar tampoco diferencias.

En el año 2006, Ripa y col<sup>169</sup> presentan el STEMMI trial, quizás el más cercano a nuestro método de análisis. Presentamos más en detalle ambos estudios en la tabla 35.

La conclusión a la que llegan, como nosotros, es que la terapia con G-CSF no incrementa la pérdida de luz tardía.

Estudio	TECAM G-CSF	TECAM Control	STEMMI G-CSF	STEMMI Control
N pacientes	30	31	39	39
Edad	56,8	57,4	57,4	54,7
Varón	86,2%	90,3%	72%	87%
DM	6,9%	9,7%	8%	10%
HTA	41,4%	45,2%	33%	26%
Dosis	10 µg/kg/d	-	10 µg/kg/d	-
Días admon	5	-	6	-
Angio control	9 meses	9 meses	6 meses	6 meses
BMS	0%	0%	64%	67%
LLL in-segment	0,10±0,52	0,11±0,72	0,43±0,59	0,69±0,64
LLL in-stent	0,26±0,33	0,1±0,38	0,45±0,50	0,63±0,64
Software	CMS 6.0 (Medis)	CMS 6.0 (Medis)	CMS 5.3 (Medis)	CMS 5.3 (Medis)
Mayor LLL	No	No	No	No

**Tabla 35.** Análisis comparativo de nuestros datos en relación al estudio STEMMI. DM: diabetes mellitus. HTA: hipertensión arterial. BMS: bare metal stent o stent convencional. LLL: Late lumen loss o pérdida de luz tardía.

Los análisis cuantitativos angiográficos fueron realizados por un laboratorio de imagen centralizado, como en nuestro estudio. Las dosis utilizadas de G-CSF fueron similares. EL mayor porcentaje de uso de stent convencional en el estudio STEMMI se relaciona probablemente con sus peores resultados de pérdida de luz tardía. En todo caso, no existieron diferencias significativas con los controles respectivos.

Nuestro estudio incorporó el análisis por subsegmentos que confirmó la ausencia de diferencias significativas. Además el control angiográfico fue posterior, a los 9 meses de la angioplastia. Esto sería más cercano a los estudios de eficacia y seguridad del stent<sup>52</sup>.

#### **b. Pérdida de luz tardía en vasos no tratados**

Son pocos los estudios con factor estimulador que muestran su preocupación acerca de la progresión de la enfermedad coronaria en los segmentos no tratados. En relación a la infusión intracoronaria de células progenitoras sí se había referido una progresión de la aterosclerosis<sup>180 233</sup>, pero no existen muchos datos con factor estimulador.

Por ejemplo, en el trabajo de Takano<sup>167</sup> se hace una referencia a esta preocupación. Para ello analizaron los segmentos proximales coronarios de los pacientes que recibían factor estimulador y no apreciaron aumento del grado de

estenosis valorado en porcentaje. Pero no se valoró el cambio en diámetro mínimo y de referencia de los vasos.

Tampoco en los estudios con G-CSF aplicados a enfermedad coronaria crónica<sup>218</sup> y estable, hemos encontrado un protocolo sistemático de valoración de calibre luminal en relación al tratamiento con factor estimulador. A diferencia de esto, sí se ha estudiado la formación de colaterales tras un tratamiento con G-CSF durante dos semanas con resultados positivos<sup>217, 251</sup>, lo que nosotros no valoramos.

Para evaluar el efecto del G-CSF sobre la aterosclerosis en términos de pérdida luminal angiográfica nosotros estudiamos un segmento de la ARI (distal al punto de obstrucción del infarto) y un segmento de una arteria principal diferente (no obstruida en ningún momento). En nuestro análisis del segmento distal de la arteria responsable no hubo diferencias en la pérdida de calibre mínimo o de referencia. Ni tampoco en la arteria contralateral. Concluimos que no existía progresión de la aterosclerosis.

## **II. Estudios con infusión intracoronaria de células**

La preocupación por un aumento de la hiperplasia intraluminal en relación a la infusión de células comenzó con el ya mencionado estudio MAGIC en 2004<sup>100</sup>. En este estudio la infusión se combinaba con estimulación con G-CSF y se relacionó con éste último. Pero dos años después, Mansour<sup>233</sup> volvía a llamar a la prudencia

con sus resultados con implante de células progenitoras sobre stent convencional al evidenciar una mayor pérdida de luz tardía intrastent. Sin embargo otros autores, como veremos más adelante, no objetivaron mayor reestenosis ni con stent convencional ni con recubierto.

Haremos aquí mención al trabajo de Villa y col<sup>238</sup>, que presentó los resultados comparativos (no aleatorizado) de pacientes que recibieron terapia celular y un stent convencional (37 pacientes) frente al stent recubierto (22 pacientes) con control coronariográfico a los 6-9 meses. Los análisis se realizaron con software CMS 6.0 y a un subgrupo de 30 pacientes se le realizó IVUS. La pérdida de luz tardía fue de  $0,35\pm 0,66$  en los stents recubiertos y de  $0,71\pm 0,38$  en los convencionales, confirmando que el efecto beneficioso de los stents recubiertos se mantenía en pacientes que recibían infusión de células progenitoras. Los resultados de IVUS (12 BMS, 18 DES) confirmaron los hallazgos.

En el contexto del infarto agudo de miocardio se han realizado varios estudios con administración intracoronaria de células progenitoras extraídas de médula ósea. Hemos seleccionado aquellos que presentan datos sobre la pérdida luminal, ya sea del stent o de otros vasos enfermos no tratados.

### **a. Pérdida de luz tardía en segmentos tratados con stent**

En la tabla 36 recogemos los valores obtenidos por dos estudios no aleatorizados con stent convencional y resultados contradictorios, así como los valores de stent convencional extraídos del estudio SIRIUS<sup>52</sup>. La diferencia en pérdida luminal detectada por Mansour<sup>233</sup> alcanzó la significación. Sin embargo, el estudio de Assmus<sup>234</sup> no mostró diferencias.

<b>Estudio</b>	<b>Mansour CD133</b>	<b>Mansour Control</b>	<b>Assmus CMMO</b>	<b>Assmus Control</b>	<b>SIRIUS</b>
N	21	17	83	83	525
Angio control	4-8 mss	4-8 mss	4 mss	4 mss	8 mss
LLL	0.42±0.07	0.22±0.06	0.9±0.7	0.9±0.8	0.81±0.67

**Tabla 36.** Pérdida de luz tardía recogida en dos estudios realizados con stent convencional y resultados contradictorios y el valor de referencia del stent convencional recogido del estudio SIRIUS. CMMO: células madre de médula ósea. LLL: Late lumen loss o pérdida de luz tardía.

En la tabla podemos observar la reducida pérdida de luz tardía tanto de los pacientes tratados como no tratados con células de la muestra de Mansour. No conocemos las características clínicas de los pacientes que nos permita establecer una hipótesis con estos resultados.

En la tabla 37 mostramos nuestros resultados frente al estudio aleatorizado FINCELL<sup>149</sup> muy similar al nuestro. Las principales diferencias fueron que el stent recubierto elegido fue de paclitaxel y los diámetros mínimos determinados por IVUS.

Ambos estudios concluyen la ausencia de diferencias en pérdida de luz tardía en los grupos que reciben células progenitoras frente a los controles.

Estudio	TECAM CMMO	TECAM Control	FINCELL CMMO	FINCELL Control
N	30	31	40	40
Edad	56.8	57.4	60	59
Varón	86.2%	90.3%	90%	85%
DM	6.9%	9.7%	13%	8%
HTA	41.4%	45.2%	40%	33%
Angio control	9 mss	9 mss	6 mss	6 mss
LLL	0.03±0.51	0.11±0.72	0.23±0.51	0.31±0.6
Software	CMS 6.0	CMS 6.0	Galaxy	Galaxy

**Tabla 37.** Presentación de nuestros resultados en comparación con el estudio FINCELL. CMMO: células madre de médula ósea. LLL: Late lumen loss o pérdida de luz tardía.

## **b. Pérdida de luz en segmentos no tratados**

De forma menos frecuente se ha analizado la repercusión que pudiera tener la infusión celular sobre segmentos no tratados. Especial interés se ha mostrado por los segmentos distales al punto de infusión, sobre todo el grupo belga de Bartunek y col. En el año 2005<sup>180</sup> comunicaron un caso de progresión distal al stent farmacoactivo con infusión de células de médula ósea seleccionadas.

Posteriormente en el año 2006<sup>233</sup>, reportaron también en un estudio no aleatorizado, una mayor pérdida luminal distal al stent pero no objetivaron progresión en una arteria coronaria diferente a la ARI. Es este grupo el que introduce el término de "contralateral" para referirse a esta arteria diferente a la del infarto. En este último estudio al que nos referimos, de Mansour y col, merece la pena destacar que los diámetros de referencia y mínimos de los segmentos distales de la ARI que se estudian, presentan ya basalmente diferencias significativas, siendo menores los diámetros en el grupo que recibe la terapia celular. Así los diámetros de referencia son de  $2.03 \pm 0.08$  y  $2.38 \pm 0.11$  respectivamente, con  $p < 0.05$ . Los diámetros mínimos son  $1.70 \pm 0.07$  y  $2.06 \pm 0.11$ , con  $p < 0.05$ . Esta falta de homogeneidad puede hacer desconfiar de la conclusión de una mayor pérdida de calibre distal.

Finalmente, otros estudios con más pacientes, como el de Assmus y col<sup>234</sup> con células no seleccionadas de médula ósea, no observaron diferencias en la aparición de lesiones de novo o mayor incidencia de eventos cardiovasculares en el grupo tratado. Sin embargo, no realiza un estudio sistemático de calibre luminal. Más reciente, Kang y col, en su estudio MAGIC Cell-3-DES aleatorizado<sup>166</sup> con terapia combinada con estimulación con G-CSF sí analizó la pérdida luminal distal al stent y no objetivó diferencias.

De nuestro grupo, Arnold y col<sup>235</sup> presentaron los resultados de 37 pacientes (59% DES) que recibieron células frente a un grupo control no aleatorizado

analizando segmentos distales a la infusión y en una arteria contralateral. No hubo diferencias en la pérdida de calibre mínimo o de referencia en la ARI ni en la contralateral. Se realizó un subanálisis con IVUS que confirmó los resultados.

En nuestro análisis, con pacientes aleatorizados, se confirmó la ausencia de diferencias significativas.

### **III. Estudios con terapia combinada**

En el contexto del infarto agudo de miocardio se han realizado varios estudios con administración intracoronaria de células progenitoras tras la estimulación con factor estimulador. Sin embargo, la obtención de las células suele ser por aféresis y no por punción directa de médula ósea.

#### **a. Pérdida de luz tardía en segmentos tratados con stent**

En 2006, Steinwender y col<sup>179</sup> con 22 pacientes con terapia combinada, sin grupo control, reportaron una alta tasa de reestenosis (como variable binaria) del 40% en el seguimiento a los 6 meses. Ninguna de las reestenosis fue con stent recubierto.

Sin embargo, ese mismo año, Kang y col<sup>166</sup> presentaron los resultados de un estudio aleatorizado con stent recubierto y bastantes similitudes al nuestro. Aunque en este caso, las células madre no se extraían directamente de la médula ósea,

sino que se movilizaban previamente a sangre periférica y de ahí se extraían mediante aféresis. Estudiaron a 50 pacientes con infarto agudo de miocardio, aunque también a 32 pacientes con infarto pasadas las dos semanas. Si comparamos nuestros resultados con los de los pacientes con infarto agudo del MAGIC Cell-3-DES nos encontramos con la tabla 38.

<b>Estudio</b>	<b>MAGIC Cell3DES AMI CP</b>	<b>MAGIC Cell3DES AMI Control</b>	<b>TECAM C+G-CSF</b>	<b>TECAM Control</b>
N pacientes	25	25	28	31
Dosis	10 µg/kg/d	10 µg/kg/d	10 µg/kg/d	10 µg/kg/d
Días admon	3 días	3 días	5 días	5 días
Edad	60.6	59.4	56.8	57.4
Varones	80%	80%	86.2%	90.3%
DM	20%	28%	6.9%	9.7%
HTA	60%	36%	41.4%	45.2%
Angio control	6 meses	6 meses	9 meses	9 meses
BMS	0%	0%	0%	0%
Pérdida luminal	0.27±0.34	0.30±0.49	0.19±0.41	0.11±0.72
Software	Quantcor V4.0	Quantcor V4.0	CMS 6.0	CMS 6.0
Mayor LLL	No	No	No	No

**Tabla 38.** Comparación de nuestros resultados en relación a los pacientes con infarto agudo del estudio MAGIC Cell-3-DES. C+G-CSF: células madre de médula ósea más factor estimulador. LLL: late lumen loss o pérdida de luz tardía.

Ambos estudios parecen confirmar la ausencia de mayor pérdida luminal tras la terapia combinada.

Hemos de comentar también el estudio que realizó Choi y col<sup>177</sup> en 2007 con 10 pacientes que recibieron estimulación con G-CSF, aféresis e implante celular intracoronario frente a dos grupos controles, con ICP primaria y tardía. Se analizó cuantitativamente la reestenosis como variable binaria y no se obtuvieron diferencias significativas.

#### **b. Pérdida de luz en segmentos no tratados**

No existe ningún estudio con terapia combinada que analice segmentos en una arteria contralateral. Este análisis, de una arteria diferente a la ARI, se había realizado con terapia celular aislada.

Sí existen resultados del análisis distal al punto de infusión celular en el estudio MAGIC Cell-3-DES, con terapia combinada. Este estudio presenta una pérdida de luz distal de  $0.14 \pm 0.84$  en sujetos tratados (engloba los resultados de AMI y OMI) y  $0.01 \pm 0.34$  en control, sin presentar diferencias significativas.

Llama la atención que, siendo la estimulación con G-CSF de administración sistémica, no exista un control de otros segmentos enfermos aunque no reciban infusión directa celular.

En nuestro análisis del segmento distal de la arteria responsable tampoco hubo diferencias en la pérdida de calibre o de referencia. Tampoco las hubo en la arteria contralateral.

## Limitaciones de nuestro estudio

### **Es un subestudio:**

Nuestro análisis presenta la limitación de ser un subestudio. El tamaño de muestra es pequeño y no fue estimado para valorar los cambios en pérdida luminal. No se puede concluir por ello la ausencia de efecto deletéreo de la administración de progenitores sobre la proliferación intimal o la progresión de la aterosclerosis.

### **Existen pérdidas:**

Si consideramos que se precisa de una coronariografía en el implante y otra en el seguimiento para la valoración de la disminución de calibre, ya sea de los segmentos tratados como de aquellos que no lo fueron, hemos considerado pérdida a aquellos pacientes en que no contáramos con ambos estudios. Las pérdidas fueron homogéneas entre grupos de tratamiento y supusieron un 12,5% en el análisis de los segmentos stentados (15 pacientes), un 14,17% en el análisis

del segmento distal (17 pacientes) y un 18,33% en el análisis de la arteria contralateral. Estas pérdidas se explican por tratarse de un subestudio, alejado del objetivo principal, y por su carácter multicéntrico.

### **No permite el estudio de la placa:**

El fenómeno de la aterosclerosis es muy complejo para reducirlo a una pérdida de diámetro luminal. La angiografía cuantitativa valora únicamente calibres y no composiciones de placa.

### **Limitaciones del método de cuantificación:**

El análisis requiere un calibre luminal adecuado, con lo que segmentos muy distales no son cuantificables con esta técnica.

## **Futuras propuestas**

### **I. Estudios dirigidos a la reparación endotelial**

La posibilidad de reparar el endotelio se presenta cercana y factible. Encontramos múltiples estudios que pretenden la recuperación funcional del miocardio perdido, pero también sería de enorme utilidad lograr la reparación de la placa de ateroma complicada o la endotelización precoz de los stents.

Las células mononucleares de médula ósea se diferencian in vitro a células endoteliales<sup>79</sup>. Muchos estudios se han realizado con células de médula ósea sin seleccionar, como el que se trata en este trabajo<sup>147-149,153,154,161</sup> o bien seleccionadas, con mayor proporción de EPCs, como células CD133+<sup>180</sup> o células CD34+<sup>150</sup>. Las células seleccionadas serían células más comprometidas con el linaje endotelial<sup>252</sup>.

Las células progenitoras endoteliales nos permiten imaginar un manejo diferente del síndrome coronario agudo sin elevación persistente del ST. La placa de ateroma erosionada está desencadenando la inflamación y activando la cascada de la coagulación. Encontrar la forma de que estos precursores administrados sistémicamente llegaran a la placa vulnerable y que ésta se reparara, supondría la estabilización hasta la reparación mecánica.

Del mismo modo, si la administración de estas células tras la angioplastia supusiera una reendotelización más precoz, la necesidad de doble antigregación, con la morbimortalidad que esto conlleva, sería mucho menor.

## **II. Estudios con otras técnicas de imagen**

El IVUS y la OCT no parecen buenas opciones para la vigilancia de la progresión de la aterosclerosis y la reestenosis a largo plazo en los estudios de terapia celular,

ya que suponen un abordaje invasivo y no exentos de complicaciones. Sin embargo, permiten estudiar las características de la placa de ateroma.

La posibilidad de usar el TC multidetector coronario es atractiva y estudios con esta técnica podrían plantearse, aunque ya dijimos que la radiación absorbida por el paciente no es despreciable. El TCMD no sólo estima el diámetro luminal sino que permite caracterizar el núcleo lipídico de forma equiparable al IVUS<sup>242</sup>. En un futuro, quizás la resonancia magnética capaz ahora de valorar la íntima de las arterias carótidas permita un acercamiento más inocuo a la aterosclerosis coronaria<sup>253</sup>.

### **III. Estandarización de análisis angiográficos**

Analizando los estudios de terapia celular en su conjunto se adivina la intención por parte de todos los grupos de vigilar la seguridad, en cuanto al grado de pérdida de diámetro luminal intrastent como a la progresión de la aterosclerosis no tratada. Sin embargo, cada uno difiere en su metodología.

Entendemos que el análisis angiográfico cuantitativo posterior centralizado y ciego no supone ningún riesgo adicional para el paciente y, sin embargo, sí supone una herramienta accesible y eficaz para vigilar la seguridad de esta terapia.

Creemos que la estandarización de las variables recogidas en estos estudios angiográficos permitiría alcanzar una mayor potencia estadística en los posteriores análisis de seguridad.

## CONCLUSIONES

---



1. La infusión intracoronaria de células progenitoras no seleccionadas procedentes de la fracción mononuclear de médula ósea, la estimulación mediante administración subcutánea de G-CSF o la combinación de ambas terapias no produce una mayor pérdida de luz tardía intrastent que la terapia convencional.
2. La infusión intracoronaria de células progenitoras no seleccionadas procedentes de la fracción mononuclear de médula ósea, la estimulación mediante administración subcutánea de G-CSF o la combinación de ambas terapias no produce una mayor aceleración de la aterosclerosis en el segmento distal al stent respecto de la terapia convencional.
3. La infusión intracoronaria de células progenitoras no seleccionadas procedentes de la fracción mononuclear de médula ósea, la estimulación mediante administración subcutánea de G-CSF o la combinación de ambas terapias no produce una mayor aceleración de la aterosclerosis en un segmento diferente a la arteria responsable del infarto respecto de la terapia convencional.



## BIBLIOGRAFÍA

---



1. Libby P. The vascular biology of atherosclerosis. In: Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E, editors. Braunwald's heart disease. A textbook of cardiovascular medicine. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p. 921-938.
2. Rudd JH, Davies JR, Weissberg PL. Atherosclerotic biology and epidemiology of disease. In: Topol EJ, editor. Topol's textbook of cardiovascular medicine. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2-12.
3. Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31(1):61-74.
4. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation.* 2002;105(5):546-9.
5. Thorne S, Mullen MJ, Clarkson P, Donald AE, Deanfield JE. Early endothelial dysfunction in adults at risk from atherosclerosis: different responses to L-arginine. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32(1):110-6.
6. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999;34(6):879-86.
7. Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, Guo JP, Lefer AM. Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(10):1652-9.
8. Tsao PS, Buitrago R, Chan JR, Cooke JP. Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation.* 1996;94(7):1682-9.
9. Tsao PS, Wang B, Buitrago R, Shyy JY, Cooke JP. Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1. *Circulation.* 1997;96(3):934-40.
10. Cardona-Sanclemente LE, Born GV. Effect of inhibition of nitric oxide synthesis on the uptake of LDL and fibrinogen by arterial walls and other organs of the rat. *Br J Pharmacol.* 1995;114(7):1490-4.
11. Inoue T, Saniabadi AR, Matsunaga R, Hoshi K, Yaguchi I, Morooka S. Impaired endothelium-dependent acetylcholine-induced coronary artery relaxation in patients with high serum remnant lipoprotein particles. *Atherosclerosis.* 1998;139(2):363-7.

12. Stroes ES, Koomans HA, de Bruin TW, Rabelink TJ. Vascular function in the forearm of hypercholesterolaemic patients off and on lipid-lowering medication. *Lancet*. 1995;346(8973):467-71.
13. Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, Johnstone MT, Creager MA. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27(3):567-74.
14. Heitzer T, Just H, Munzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation*. 1996;94(1):6-9.
15. Panza JA, García CE, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Cannon RO, 3rd. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. *Circulation*. 1995;91(6):1732-8.
16. Quilley J, Fulton D, McGiff JC. Hyperpolarizing factors. *Biochem Pharmacol*. 1997;54(10):1059-70.
17. Kelly JJ, Whitworth JA. Endothelin-1 as a mediator in cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999;26(2):158-61.
18. Rong JX, Rangaswamy S, Shen L, Dave R, Chang YH, Peterson H, et al. Arterial injury by cholesterol oxidation products causes endothelial dysfunction and arterial wall cholesterol accumulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(12):1885-94.
19. Poon M, Zhang X, Dunsky KG, Taubman MB, Harpel PC. Apolipoprotein(a) induces monocyte chemotactic activity in human vascular endothelial cells. *Circulation*. 1997;96(8):2514-9.
20. Loscalzo J, Weinfeld M, Fless GM, Scanu AM. Lipoprotein(a), fibrin binding, and plasminogen activation. *Arteriosclerosis*. 1990;10(2):240-5.
21. Xia P, Vadas MA, Rye KA, Barter PJ, Gamble JR. High density lipoproteins (HDL) interrupt the sphingosine kinase signaling pathway. A possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL. *J Biol Chem*. 1999;274(46):33143-7.
22. Murry CE, Gipaya CT, Bartosek T, Benditt EP, Schwartz SM. Monoclonality of smooth muscle cells in human atherosclerosis. *Am J Pathol*. 1997;151(3):697-705.

23. Gimbrone MA, Jr., Resnick N, Nagel T, Khachigian LM, Collins T, Topper JN. Hemodynamics, endothelial gene expression, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;811:1-10; discussion 10-1.
24. Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, et al. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res.* 1999;85(2):199-207.
25. Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1998;102(1):145-52.
26. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell.* 1998;2(2):275-81.
27. Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, et al. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest.* 1999;104(8):1041-50.
28. Miller YI, Chang MK, Binder CJ, Shaw PX, Witztum JL. Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14(5):437-45.
29. Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(9):1370-80.
30. Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med.* 2002;8(11):1218-26.
31. Manabe I, Nagai R. Regulation of smooth muscle phenotype. *Curr Atheroscler Rep.* 2003;5(3):214-22.
32. Moreno PR, Purushothaman KR, Sirol M, Levy AP, Fuster V. Neovascularization in human atherosclerosis. *Circulation.* 2006;113(18):2245-52.
33. Groszek E, Grundy SM. The possible role of the arterial microcirculation in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Chronic Dis.* 1980;33(11-12):679-84.

34. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989;246(4935):1306-9.
35. Asleh R, Guetta J, Kalet-Litman S, Miller-Lotan R, Levy AP. Haptoglobin genotype- and diabetes-dependent differences in iron-mediated oxidative stress in vitro and in vivo. *Circ Res*. 2005;96(4):435-41.
36. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation*. 2003;108(14):1664-72.
37. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation*. 2003;108(15):1772-8.
38. Lafont A. Basic aspects of plaque vulnerability. *Heart*. 2003;89(10):1262-7.
39. Davies MJ, Thomas A. Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Engl J Med*. 1984;310(18):1137-40.
40. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(5):1262-75.
41. Waxman S, Ishibashi F, Muller JE. Detection and treatment of vulnerable plaques and vulnerable patients: novel approaches to prevention of coronary events. *Circulation*. 2006;114(22):2390-411.
42. Koenig W, Khuseyinova N. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(1):15-26.
43. Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, Joffre F, Kappenberger L. Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *N Engl J Med*. 1987;316(12):701-6.
44. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med*. 1994;331(8):489-95.

45. Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, et al. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med.* 1994;331(8):496-501.
46. Vázquez-González N, Vázquez-Rodríguez J, Calviño R, Salgado J. El largo camino hacia la solución de la reestenosis. ¿Se ha alcanzado la meta? In: Hernández JM, editor. *Manual de cardiología intervencionista: Sociedad Española de Cardiología*; 2005. p. 13-36.
47. Sousa JE, Costa MA, Abizaid AC, Rensing BJ, Abizaid AS, Tanajura LF, et al. Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up. *Circulation.* 2001;104(17):2007-11.
48. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, et al. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med.* 2002;346(23):1773-80.
49. Subbotin VM. Analysis of arterial intimal hyperplasia: review and hypothesis. *Theor Biol Med Model.* 2007;4:41.
50. Mitra AK, Agrawal DK. In stent restenosis: bane of the stent era. *J Clin Pathol.* 2006;59(3):232-9.
51. Sheiban I, Villata G, Bollati M, Sillano D, Lotrionte M, Biondi-Zoccai G. Next-generation drug-eluting stents in coronary artery disease: focus on everolimus-eluting stent (Xience V). *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4(1):31-8.
52. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, et al. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med.* 2003;349(14):1315-23.
53. Grube E, Silber S, Hauptmann KE, Mueller R, Buellesfeld L, Gerckens U, et al. TAXUS I: six- and twelve-month results from a randomized, double-blind trial on a slow-release paclitaxel-eluting stent for de novo coronary lesions. *Circulation.* 2003;107(1):38-42.
54. Colombo A, Drzewiecki J, Banning A, Grube E, Hauptmann K, Silber S, et al. Randomized study to assess the effectiveness of slow- and moderate-release polymer-based paclitaxel-eluting stents for coronary artery lesions. *Circulation.* 2003;108(7):788-94.

55. Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O'Shaughnessy C, Mann JT, et al. One-year clinical results with the slow-release, polymer-based, paclitaxel-eluting TAXUS stent: the TAXUS-IV trial. *Circulation*. 2004;109(16):1942-7.
56. Diego A, Miguel A, Cuellas C, Pérez A, Fernández F. Angioplastia con stent convencional y stent de fármaco. In: Martín-Moreiras J, Cruz I, editors. *Manual de hemodinámica e intervencionismo coronario*: Ediciones Pulso; 2008. p. 179-208.
57. Sehgal SN, Baker H, Vezina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)*. 1975;28(10):727-32.
58. Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, Marx S, Roque M, Adelman S, et al. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation*. 1999;99(16):2164-70.
59. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2002;8(11):1249-56.
60. Baim DS. Coronary stenting. In: Grossman W, Baim DS, editors. *Grossman's Cardiac Catheterization, Angiography and Intervention*. 7th ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
61. Lemos PA, Serruys PW, van Domburg RT, Saia F, Arampatzis CA, Hoye A, et al. Unrestricted utilization of sirolimus-eluting stents compared with conventional bare stent implantation in the "real world": the Rapamycin-Eluting Stent Evaluated At Rotterdam Cardiology Hospital (RESEARCH) registry. *Circulation*. 2004;109(2):190-5.
62. Inoue T, Node K. Molecular basis of restenosis and novel issues of drug-eluting stents. *Circ J*. 2009;73(4):615-21.
63. Windecker S, Meier B. Late coronary stent thrombosis. *Circulation*. 2007;116(17):1952-65.
64. Yao ZH, Matsubara T, Inada T, Suzuki Y, Suzuki T. Neointimal coverage of sirolimus-eluting stents 6 months and 12 months after implantation: evaluation by optical coherence tomography. *Chin Med J (Engl)*. 2008;121(6):503-7.
65. Goldschmidt-Clermont PJ, Creager MA, Losordo DW, Lam GK, Wassef M, Dzau VJ. Atherosclerosis 2005: recent discoveries and novel hypotheses. *Circulation*. 2005;112(21):3348-53.

66. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-7.
67. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 1998;92(2):362-7.
68. Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, Chen X, Buhring HJ, Niethammer D, et al. Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;996:141-51.
69. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*. 2000;105(1):71-7.
70. Schmeisser A, Garlich CD, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, et al. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res*. 2001;49(3):671-80.
71. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004;95(4):343-53.
72. Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(2):288-93.
73. George J, Afek A, Abashidze A, Shmilovich H, Deutsch V, Kopolovich J, et al. Transfer of endothelial progenitor and bone marrow cells influences atherosclerotic plaque size and composition in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(12):2636-41.
74. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000;95(3):952-8.
75. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2002;105(25):3017-24.
76. Hillebrands JL, Klatter FA, van Dijk WD, Rozing J. Bone marrow does not contribute substantially to endothelial-cell replacement in transplant arteriosclerosis. *Nat Med*. 2002;8(3):194-5.

77. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med.* 2000;342(9):626-33.
78. Leone AM, Valgimigli M, Giannico MB, Zaccone V, Perfetti M, D'Amario D, et al. From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells. *Eur Heart J.* 2009;30(8):890-9.
79. Zenovich AG, Taylor DA. Atherosclerosis as a disease of failed endogenous repair. *Front Biosci.* 2008;13:3621-36.
80. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet.* 2003;362(9385):697-703.
81. Fujiyama S, Amano K, Uehira K, Yoshida M, Nishiwaki Y, Nozawa Y, et al. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res.* 2003;93(10):980-9.
82. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003;348(7):593-600.
83. Sata M. Role of circulating vascular progenitors in angiogenesis, vascular healing, and pulmonary hypertension: lessons from animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(5):1008-14.
84. Sánchez PL, San Román JA, Villa A, Fernández ME, Fernández-Avilés F. Contemplating the bright future of stem cell therapy for cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006;3 Suppl 1:S138-51.
85. Anversa P, Leri A, Kajstura J. Cardiac regeneration. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(9):1769-76.
86. Torella D, Ellison GM, Mendez-Ferrer S, Ibanez B, Nadal-Ginard B. Resident human cardiac stem cells: role in cardiac cellular homeostasis and potential for myocardial regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006;3 Suppl 1:S8-13.

87. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*. 2002;346(1):5-15.
88. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114(6):763-76.
89. Urbanek K, Quaini F, Tasca G, Torella D, Castaldo C, Nadal-Ginard B, et al. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(18):10440-5.
90. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(24):8692-7.
91. Behfar A, Faustino RS, Arrell DK, Dzeja PP, Perez-Terzic C, Terzic A. Guided stem cell cardiopoiesis: discovery and translation. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;45(4):523-9.
92. Kastrup J, Jorgensen E, Ruck A, Tagil K, Glogar D, Ruzyllo W, et al. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(7):982-8.
93. Seeger FH, Zeiher AM, Dimmeler S. Cell-enhancement strategies for the treatment of ischemic heart disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007;4 Suppl 1:S110-3.
94. Aicher A, Heeschen C, Sasaki K, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. Low-energy shock wave for enhancing recruitment of endothelial progenitor cells: a new modality to increase efficacy of cell therapy in chronic hind limb ischemia. *Circulation*. 2006;114(25):2823-30.
95. Mazhari R, Hare JM. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007;4 Suppl 1:S21-6.
96. Barile L, Chimenti I, Gaetani R, Forte E, Miraldi F, Frati G, et al. Cardiac stem cells: isolation, expansion and experimental use for myocardial regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007;4 Suppl 1:S9-S14.

97. Ince H, Nienaber CA. Future investigations in stem cell activation with granulocyte-colony-stimulating factor after myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007;4 Suppl 1:S119-22.
98. Ripa RS. Granulocyte-colony stimulating factor therapy to induce neovascularization in ischemic heart disease. *Dan Med J.* 2012;59(3):B4411.
99. Valgimigli M, Biondi-Zoccai G, Malagutti P, Leone AM, Abbate A. Autologous bone marrow stem cell activation with granulocyte-colony stimulating factor after myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2008;10(Suppl K):27-34.
100. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet.* 2004;363(9411):751-6.
101. Ince H, Petzsch M, Kleine HD, Eckard H, Rehders T, Burska D, et al. Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI) Trial. *Circulation.* 2005;112(9 Suppl):I73-80.
102. Leone AM, Galiuto L, Garramone B, Rutella S, Giannico MB, Brugaletta S, et al. Usefulness of granulocyte colony-stimulating factor in patients with a large anterior wall acute myocardial infarction to prevent left ventricular remodeling (the rigenera study). *Am J Cardiol.* 2007;100(3):397-403.
103. Ince H, Nienaber CA. Granulocyte-colony-stimulating factor in acute myocardial infarction: future perspectives after FIRSTLINE-AMI and REVIVAL-2. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007;4 Suppl 1:S114-8.
104. Abdel-Latif A, Bolli R, Zuba-Surma EK, Tleyjeh IM, Hornung CA, Dawn B. Granulocyte colony-stimulating factor therapy for cardiac repair after acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am Heart J.* 2008;156(2):216-226 e9.
105. Tacchi HH. Aplicaciones clínicas de stem cells en terapia cardiovascular. *Insuficiencia Cardiaca.* 2006;1(4):190-9.

106. Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol.* 1985;87:27-45.
107. Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2004;22(10):1282-9.
108. Fraidenraich D, Benezra R. Embryonic stem cells prevent developmental cardiac defects in mice. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006;3 Suppl 1:S14-7.
109. Mummery CL. Cardiology: solace for the broken-hearted? *Nature.* 2005;433(7026):585-7.
110. Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A, et al. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *Faseb J.* 2002;16(12):1558-66.
111. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-7.
112. Drukker M, Benvenisty N. The immunogenicity of human embryonic stem-derived cells. *Trends Biotechnol.* 2004;22(3):136-41.
113. Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL, Nelson M, Sanger WG, Gokhale S, et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature.* 2007;450(7169):497-502.
114. Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol.* 2001;11(19):1553-8.
115. Geoghegan E, Byrnes L. Mouse induced pluripotent stem cells. *Int J Dev Biol.* 2008;52(8):1015-22.
116. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001;410(6829):701-5.
117. Hamano K, Li TS, Kobayashi T, Hirata K, Yano M, Kohno M, et al. Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. *Ann Thorac Surg.* 2002;73(4):1210-5.

118. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004;428(6983):664-8.
119. Sánchez PL, Sánchez-Guijo FM, Villa A, del Canizo C, Arnold R, San Román JA, et al. Launching a clinical program of stem cell therapy for cardiovascular repair. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007;4 Suppl 1:S123-9.
120. Serafini M, Dylla SJ, Oki M, Heremans Y, Tolar J, Jiang Y, et al. Hematopoietic reconstitution by multipotent adult progenitor cells: precursors to long-term hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2007;204(1):129-39.
121. Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation*. 2003;107(7):1024-32.
122. Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966;16(3):381-90.
123. Fukuda K, Yuasa S. Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes. *Circ Res*. 2006;98(8):1002-13.
124. Wu X, Huang L, Zhou Q, Song Y, Li A, Jin J, et al. Mesenchymal stem cells participating in ex vivo endothelium repair and its effect on vascular smooth muscle cells growth. *Int J Cardiol*. 2005;105(3):274-82.
125. Ball SG, Shuttleworth AC, Kielty CM. Direct cell contact influences bone marrow mesenchymal stem cell fate. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(4):714-27.
126. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105(1):93-8.
127. Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif Organs*. 2001;25(3):187-93.

128. Pelacho B, Aranguren XL, Mazo M, Abizanda G, Gavira JJ, Clavel C, et al. Plasticity and cardiovascular applications of multipotent adult progenitor cells. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007;4 Suppl 1:S15-20.
129. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest.* 2001;107(11):1395-402.
130. Gavira JJ, Abizanda G, Pérez-Illzarbe M, Martínez-Caro D, Nasarre E, Pérez-Ruiz A, et al. Skeletal myoblasts for cardiac repair in animal models. *Eur Heart J.* 2008;10(Suppl K):11-15.
131. Marelli D, Desrosiers C, el-Alfy M, Kao RL, Chiu RC. Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant.* 1992;1(6):383-90.
132. Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Woitowicz V, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, et al. Simultaneous autologous transplantation of cocultured mesenchymal stem cells and skeletal myoblasts improves ventricular function in a murine model of Chagas disease. *Circulation.* 2006;114(1 Suppl):120-4.
133. Murtuza B, Suzuki K, Bou-Gharios G, Beauchamp JR, Smolenski RT, Partridge TA, et al. Transplantation of skeletal myoblasts secreting an IL-1 inhibitor modulates adverse remodeling in infarcted murine myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(12):4216-21.
134. Gavira JJ, Pérez-Illzarbe M, Abizanda G, García-Rodríguez A, Orbe J, Páramo JA, et al. A comparison between percutaneous and surgical transplantation of autologous skeletal myoblasts in a swine model of chronic myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2006;71(4):744-53.
135. Winitsky SO, Gopal TV, Hassanzadeh S, Takahashi H, Gryder D, Rogawski MA, et al. Adult murine skeletal muscle contains cells that can differentiate into beating cardiomyocytes in vitro. *PLoS Biol.* 2005;3(4):e87.
136. Leobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT, Audinat E, Charpak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(13):7808-11.
137. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 2007;100(9):1249-60.

138. Rodbell M, Jones AB. Metabolism of isolated fat cells. 3. The similar inhibitory action of phospholipase C (*Clostridium perfringens* alpha toxin) and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophylline. *J Biol Chem.* 1966;241(1):140-2.
139. Parker AM, Katz AJ. Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. *Expert Opin Biol Ther.* 2006;6(6):567-78.
140. Strem BM, Zhu M, Alfonso Z, Daniels EJ, Schreiber R, Beygui R, et al. Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury. *Cytotherapy.* 2005;7(3):282-91.
141. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med.* 2006;12(4):459-65.
142. Song YH, Gehmert S, Sadat S, Pinkernell K, Bai X, Matthias N, et al. VEGF is critical for spontaneous differentiation of stem cells into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354(4):999-1003.
143. Bartunek J, Wijns W, Heyndrickx GR, Vanderheyden M. Timing of intracoronary bone-marrow-derived stem cell transplantation after ST-elevation myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006;3 Suppl 1:S52-6.
144. Perin EC, López J. Methods of stem cell delivery in cardiac diseases. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006;3 Suppl 1:S110-3.
145. Beeres SL, Bengel FM, Bartunek J, Atsma DE, Hill JM, Vanderheyden M, et al. Role of imaging in cardiac stem cell therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(11):1137-48.
146. Zhou R, Acton PD, Ferrari VA. Imaging stem cells implanted in infarcted myocardium. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(10):2094-106.
147. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet.* 2004;364(9429):141-8.

148. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355(12):1210-21.
149. Huikuri HV, Kervinen K, Niemela M, Ylitalo K, Saily M, Koistinen P, et al. Effects of intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells on left ventricular function, arrhythmia risk profile, and restenosis after thrombolytic therapy of acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2008;29(22):2723-32.
150. Tendera M, Wojakowski W, Ruzyllo W, Chojnowska L, Kepka C, Tracz W, et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial. *Eur Heart J.* 2009;30(11):1313-21.
151. Dill T, Schachinger V, Rolf A, Mollmann S, Thiele H, Tillmanns H, et al. Intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells improves left ventricular function in patients at risk for adverse remodeling after acute ST-segment elevation myocardial infarction: results of the Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction study (REPAIR-AMI) cardiac magnetic resonance imaging substudy. *Am Heart J.* 2009;157(3):541-7.
152. Assmus B, Rolf A, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, et al. Clinical outcome 2 years after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *Circ Heart Fail.* 2010;3(1):89-96.
153. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 2006;367(9505):113-21.
154. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355(12):1199-209.
155. van der Laan A, Hirsch A, Nijveldt R, van der Vleuten PA, van der Giessen WJ, Doevendans PA, et al. Bone marrow cell therapy after acute myocardial infarction: the HEBE trial in perspective, first results. *Neth Heart J.* 2008;16(12):436-9.

156. Traverse JH, Henry TD, Ellis SG, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DX, et al. Effect of intracoronary delivery of autologous bone marrow mononuclear cells 2 to 3 weeks following acute myocardial infarction on left ventricular function: the LateTIME randomized trial. *JAMA*. 2011;306(19):2110-9.
157. Traverse JH, Henry TD, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DX, Ellis SG, et al. Effect of the use and timing of bone marrow mononuclear cell delivery on left ventricular function after acute myocardial infarction: the TIME randomized trial. *JAMA*. 2012;308(22):2380-9.
158. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2004;94(1):92-5.
159. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(24):2277-86.
160. Nyolczas N, Gyongyosi M, Beran G, Dettke M, Graf S, Sochor H, et al. Design and rationale for the Myocardial Stem Cell Administration After Acute Myocardial Infarction (MYSTAR) Study: a multicenter, prospective, randomized, single-blind trial comparing early and late intracoronary or combined (percutaneous intramyocardial and intracoronary) administration of nonselected autologous bone marrow cells to patients after acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 2007;153(2):212 e1-7.
161. Cao F, Sun D, Li C, Narsinh K, Zhao L, Li X, et al. Long-term myocardial functional improvement after autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: 4 years follow-up. *Eur Heart J*. 2009;30(16):1986-94.
162. Herbots L, D'Hooge J, Eroglu E, Thijs D, Ganame J, Claus P, et al. Improved regional function after autologous bone marrow-derived stem cell transfer in patients with acute myocardial infarction: a randomized, double-blind strain rate imaging study. *Eur Heart J*. 2009;30(6):662-70.
163. Suárez de Lezo J, Herrera C, Pan M, Romero M, Pavlovic D, Segura J, et al. [Regenerative therapy in patients with a revascularized acute anterior myocardial infarction and depressed ventricular function]. *Rev Esp Cardiol*. 2007;60(4):357-65.
164. Meluzin J, Mayer J, Groch L, Janousek S, Hornacek I, Hlinomaz O, et al. Autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction:

- the effect of the dose of transplanted cells on myocardial function. *Am Heart J.* 2006;152(5):975 e9-15.
165. Ge J, Li Y, Qian J, Shi J, Wang Q, Niu Y, et al. Efficacy of emergent transcatheter transplantation of stem cells for treatment of acute myocardial infarction (TCT-STAMI). *Heart.* 2006;92(12):1764-7.
166. Kang HJ, Lee HY, Na SH, Chang SA, Park KW, Kim HK, et al. Differential effect of intracoronary infusion of mobilized peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor on left ventricular function and remodeling in patients with acute myocardial infarction versus old myocardial infarction: the MAGIC Cell-3-DES randomized, controlled trial. *Circulation.* 2006;114(1 Suppl):I145-51.
167. Takano H, Hasegawa H, Kuwabara Y, Nakayama T, Matsuno K, Miyazaki Y, et al. Feasibility and safety of granulocyte colony-stimulating factor treatment in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2007;122(1):41-7.
168. Engelmann MG, Theiss HD, Theiss C, Henschel V, Huber A, Wintersperger BJ, et al. G-CSF in patients suffering from late revascularised ST elevation myocardial infarction: final 1-year-results of the G-CSF-STEMI Trial. *Int J Cardiol.* 2009;144(3):399-404.
169. Ripa RS, Jorgensen E, Wang Y, Thune JJ, Nilsson JC, Sondergaard L, et al. Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial. *Circulation.* 2006;113(16):1983-92.
170. Ellis SG, Penn MS, Bolwell B, Garcia M, Chacko M, Wang T, et al. Granulocyte colony stimulating factor in patients with large acute myocardial infarction: results of a pilot dose-escalation randomized trial. *Am Heart J.* 2006;152(6):1051 e9-14.
171. Zohlnhofer D, Ott I, Mehilli J, Schomig K, Michalk F, Ibrahim T, et al. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2006;295(9):1003-10.
172. Valgimigli M, Rigolin GM, Cittanti C, Malagutti P, Curello S, Percoco G, et al. Use of granulocyte-colony stimulating factor during acute myocardial infarction to enhance bone marrow stem cell mobilization in humans: clinical and angiographic safety profile. *Eur Heart J.* 2005;26(18):1838-45.

173. Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(8):1690-9.
174. Krause K, Jaquet K, Schneider C, Haupt S, Lioznov MV, Otte KM, et al. Percutaneous intramyocardial stem cell injection in patients with acute myocardial infarction: first-in-man study. *Heart*. 2009;95(14):1145-52.
175. Yousef M, Schannwell CM, Kosterling M, Zeus T, Brehm M, Strauer BE. The BALANCE Study: clinical benefit and long-term outcome after intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(24):2262-9.
176. Hirsch A, Nijveldt R, van der Vleuten PA, Tio RA, van der Giessen WJ, Marques KM, et al. Intracoronary infusion of autologous mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction treated with primary PCI: Pilot study of the multicenter HEBE trial. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2008;71(3):273-81.
177. Choi JH, Choi J, Lee WS, Rhee I, Lee SC, Gwon HC, et al. Lack of additional benefit of intracoronary transplantation of autologous peripheral blood stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Circ J*. 2007;71(4):486-94.
178. Li ZQ, Zhang M, Jing YZ, Zhang WW, Liu Y, Cui LJ, et al. The clinical study of autologous peripheral blood stem cell transplantation by intracoronary infusion in patients with acute myocardial infarction (AMI). *Int J Cardiol*. 2007;115(1):52-6.
179. Steinwender C, Hofmann R, Kammler J, Kypka A, Pichler R, Maschek W, et al. Effects of peripheral blood stem cell mobilization with granulocyte-colony stimulating factor and their transcronary transplantation after primary stent implantation for acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 2006;151(6):1296 e7-13.
180. Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P, et al. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. *Circulation*. 2005;112(9 Suppl):I178-83.
181. Fernández-Avilés F, San Román JA, García-Frade J, Fernández ME, Penarrubia MJ, de la Fuente L, et al. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res*. 2004;95(7):742-8.

182. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002;106(15):1913-8.
183. Kueth F, Figulla HR, Herzau M, Voth M, Fritzenwanger M, Opfermann T, et al. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor for mobilization of bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 2005;150(1):115.
184. Suárez de Lezo J, Torres A, Herrera I, Pan M, Romero M, Pavlovic D, et al. [Effects of stem-cell mobilization with recombinant human granulocyte colony stimulating factor in patients with percutaneously revascularized acute anterior myocardial infarction]. *Rev Esp Cardiol*. 2005;58(3):253-61.
185. Lai VK, Ang KL, Rathbone W, Harvey NJ, Galinanes M. Randomized controlled trial on the cardioprotective effect of bone marrow cells in patients undergoing coronary bypass graft surgery. *Eur Heart J*. 2009;30(19):2354-9.
186. Ang KL, Chin D, Leyva F, Foley P, Kubal C, Chalil S, et al. Randomized, controlled trial of intramuscular or intracoronary injection of autologous bone marrow cells into scarred myocardium during CABG versus CABG alone. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008;5(10):663-70.
187. Menasche P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, et al. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*. 2008;117(9):1189-200.
188. Dib N, Dinsmore J, Lababidi Z, White B, Moravec S, Campbell A, et al. One-year follow-up of feasibility and safety of the first U.S., randomized, controlled study using 3-dimensional guided catheter-based delivery of autologous skeletal myoblasts for ischemic cardiomyopathy (CAuSMIC study). *JACC Cardiovasc Interv*. 2009;2(1):9-16.
189. Tse HF, Thambar S, Kwong YL, Rowlings P, Bellamy G, McCrohon J, et al. Prospective randomized trial of direct endomyocardial implantation of bone marrow cells for treatment of severe coronary artery diseases (PROTECT-CAD trial). *Eur Heart J*. 2007;28(24):2998-3005.
190. Erbs S, Linke A, Adams V, Lenk K, Thiele H, Diederich KW, et al. Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study. *Circ Res*. 2005;97(8):756-62.

191. Kovacic JC, Macdonald P, Feneley MP, Muller DW, Freund J, Dodds A, et al. Safety and efficacy of consecutive cycles of granulocyte-colony stimulating factor, and an intracoronary CD133+ cell infusion in patients with chronic refractory ischemic heart disease: the G-CSF in angina patients with IHD to stimulate neovascularization (GAIN I) trial. *Am Heart J.* 2008;156(5):954-63.
192. Assmus B, Fischer-Rasokat U, Honold J, Seeger FH, Fichtlscherer S, Tonn T, et al. Transcoronary transplantation of functionally competent BMCs is associated with a decrease in natriuretic peptide serum levels and improved survival of patients with chronic postinfarction heart failure: results of the TOPCARE-CHD Registry. *Circ Res.* 2007;100(8):1234-41.
193. Boyle AJ, Whitbourn R, Schlicht S, Krum H, Kocher A, Nandurkar H, et al. Intra-coronary high-dose CD34+ stem cells in patients with chronic ischemic heart disease: a 12-month follow-up. *Int J Cardiol.* 2006;109(1):21-7.
194. Gao LR, Wang ZG, Zhu ZM, Fei YX, He S, Tian HT, et al. Effect of intracoronary transplantation of autologous bone marrow-derived mononuclear cells on outcomes of patients with refractory chronic heart failure secondary to ischemic cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2006;98(5):597-602.
195. Katritsis DG, Sotiropoulou PA, Karvouni E, Karabinos I, Korovesis S, Perez SA, et al. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2005;65(3):321-9.
196. Kuethe F, Richartz BM, Kasper C, Sayer HG, Hoeffken K, Werner GS, et al. Autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in chronic ischemic cardiomyopathy in humans. *Int J Cardiol.* 2005;100(3):485-91.
197. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Bartsch T, Schannwell C, Antke C, et al. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(9):1651-8.
198. Stamm C, Kleine HD, Choi YH, Dunkelmann S, Lauffs JA, Lorenzen B, et al. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;133(3):717-25.
199. Dib N, Michler RE, Pagani FD, Wright S, Kereiakes DJ, Lengerich R, et al. Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: four-year follow-up. *Circulation.* 2005;112(12):1748-55.

200. Archundia A, Aceves JL, López-Hernández M, Alvarado M, Rodríguez E, Díaz Quiroz G, et al. Direct cardiac injection of G-CSF mobilized bone-marrow stem-cells improves ventricular function in old myocardial infarction. *Life Sci.* 2005;78(3):279-83.
201. Chachques JC, Herreros J, Trainini J, Juffe A, Rendal E, Prosper F, et al. Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty. *Int J Cardiol.* 2004;95 Suppl 1:S29-33.
202. Galiñanes M, Loubani M, Davies J, Chin D, Pasi J, Bell PR. Autotransplantation of unmanipulated bone marrow into scarred myocardium is safe and enhances cardiac function in humans. *Cell Transplant.* 2004;13(1):7-13.
203. Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, Jerzykowska O, Rzezniczak J, Rozwadowska N, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J.* 2004;148(3):531-7.
204. Stamm C, Kleine HD, Westphal B, Petzsch M, Kittner C, Nienaber CA, et al. CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;52(3):152-8.
205. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(7):1078-83.
206. Herreros J, Prosper F, Pérez A, Gavira JJ, García-Velloso MJ, Barba J, et al. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2003;24(22):2012-20.
207. Hamano K, Nishida M, Hirata K, Mikamo A, Li TS, Harada M, et al. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ J.* 2001;65(9):845-7.
208. Perin EC, Willerson JT, Pepine CJ, Henry TD, Ellis SG, Zhao DX, et al. Effect of transendocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: the FOCUS-CCTRN trial. *JAMA.* 2012;307(16):1717-26.
209. Duckers HJ, Houtgraaf J, Hehrlein C, Schofer J, Waltenberger J, Gershlick A, et al. Final results of a phase IIa, randomised, open-label trial to evaluate the percutaneous intramyocardial

- transplantation of autologous skeletal myoblasts in congestive heart failure patients: the SEISMIC trial. *EuroIntervention*. 2011;6(7):805-12.
210. Losordo DW, Henry TD, Davidson C, Sup Lee J, Costa MA, Bass T, et al. Intramyocardial, autologous CD34+ cell therapy for refractory angina. *Circ Res*. 2011;109(4):428-36.
211. van Ramshorst J, Bax JJ, Beeres SL, Dibbets-Schneider P, Roes SD, Stokkel MP, et al. Intramyocardial bone marrow cell injection for chronic myocardial ischemia: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2009;301(19):1997-2004.
212. Ripa RS, Wang Y, Jorgensen E, Johnsen HE, Hesse B, Kastrup J. Intramyocardial injection of vascular endothelial growth factor-A165 plasmid followed by granulocyte-colony stimulating factor to induce angiogenesis in patients with severe chronic ischaemic heart disease. *Eur Heart J*. 2006;27(15):1785-92.
213. Siminiak T, Fiszer D, Jerzykowska O, Grygielska B, Rozwadowska N, Kalmucki P, et al. Percutaneous trans-coronary-venous transplantation of autologous skeletal myoblasts in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment: the POZNAN trial. *Eur Heart J*. 2005;26(12):1188-95.
214. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*. 2003;107(18):2294-302.
215. Smits PC, van Geuns RJ, Poldermans D, Bountiukos M, Onderwater EE, Lee CH, et al. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(12):2063-9.
216. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*. 2003;361(9351):47-9.
217. Meier P, Gloekler S, de Marchi SF, Indermuehle A, Rutz T, Traupe T, et al. Myocardial salvage through coronary collateral growth by granulocyte colony-stimulating factor in chronic coronary artery disease: a controlled randomized trial. *Circulation*. 2009;120(14):1355-63.

218. Suzuki K, Nagashima K, Arai M, Uno Y, Misao Y, Takemura G, et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment at a low dose but for a long duration in patients with coronary heart disease. *Circ J*. 2006;70(4):430-7.
219. Wang Y, Tagil K, Ripa RS, Nilsson JC, Carstensen S, Jorgensen E, et al. Effect of mobilization of bone marrow stem cells by granulocyte colony stimulating factor on clinical symptoms, left ventricular perfusion and function in patients with severe chronic ischemic heart disease. *Int J Cardiol*. 2005;100(3):477-83.
220. Hill JM, Syed MA, Arai AE, Powell TM, Paul JD, Zalos G, et al. Outcomes and risks of granulocyte colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(9):1643-8.
221. Ribeiro Dos Santos R, Rassi S, Feitosa G, Grecco OT, Rassi A, Jr., da Cunha AB, et al. Cell Therapy in Chagas Cardiomyopathy (Chagas Arm of the Multicenter Randomized Trial of Cell Therapy in Cardiopathies Study): A Multicenter Randomized Trial. *Circulation*. 2012;125(20):2454-2461.
222. Chen Y, Gao EM, Gao CY, Xu Y, Huang KJ, Niu ZM, et al. [Effects of intracoronary autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in patients with dilated cardiomyopathy]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2008;36(12):1087-91.
223. Seth S, Narang R, Bhargava B, Ray R, Mohanty S, Gulati G, et al. Percutaneous intracoronary cellular cardiomyoplasty for nonischemic cardiomyopathy: clinical and histopathological results: the first-in-man ABCD (Autologous Bone Marrow Cells in Dilated Cardiomyopathy) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(11):2350-1.
224. Huang RC, Yao K, Li YL, Zhang YQ, Xu SK, Shi HY, et al. [Transplantation of autologous bone marrow mononuclear cells on patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: early results on effect and security]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2006;34(2):111-3.
225. Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MB, Mota A, Pinho-Filho JA, Almeida AJ, et al. [Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease]. *Arq Bras Cardiol*. 2006;87(2):159-66.
226. Wang JA, Xie XJ, He H, Sun Y, Jiang J, Luo RH, et al. [A prospective, randomized, controlled trial of autologous mesenchymal stem cells transplantation for dilated cardiomyopathy]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2006;34(2):107-10.

227. Bartunek J, Vanderheyden M, Wijns W, Timmermans F, Vandekerckhove B, Villa A, et al. Bone-marrow-derived cells for cardiac stem cell therapy: safe or still under scrutiny? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007;4 Suppl 1:S100-5.
228. Epstein SE, Stabile E, Kinnaird T, Lee CW, Clavijo L, Burnett MS. Janus phenomenon: the interrelated tradeoffs inherent in therapies designed to enhance collateral formation and those designed to inhibit atherogenesis. *Circulation*. 2004;109(23):2826-31.
229. Silvestre JS, Gojova A, Brun V, Potteaux S, Esposito B, Duriez M, et al. Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells in ischemic apolipoprotein E-knockout mice accelerates atherosclerosis without altering plaque composition. *Circulation*. 2003;108(23):2839-42.
230. Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*. 2002;8(4):403-9.
231. Hu Y, Davison F, Zhang Z, Xu Q. Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. *Circulation*. 2003;108(25):3122-7.
232. Vanderheyden M, Mansour S, Bartunek J. Accelerated atherosclerosis following intracoronary haematopoietic stem cell administration. *Heart*. 2005;91(4):448.
233. Mansour S, Vanderheyden M, De Bruyne B, Vandekerckhove B, Delrue L, Van Haute I, et al. Intracoronary delivery of hematopoietic bone marrow stem cells and luminal loss of the infarct-related artery in patients with recent myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(8):1727-30.
234. Assmus B, Walter DH, Lehmann R, Honold J, Martin H, Dimmeler S, et al. Intracoronary infusion of progenitor cells is not associated with aggravated restenosis development or atherosclerotic disease progression in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2006;27(24):2989-95.
235. Arnold R, Villa A, Gutiérrez H, Sánchez PL, Gimeno F, Fernández ME, et al. Absence of accelerated atherosclerotic disease progression after intracoronary infusion of bone marrow derived mononuclear cells in patients with acute myocardial infarction--angiographic and intravascular ultrasound--results from the TERapia Celular Aplicada al Miocardio Pilot study. *Am Heart J*. 2010;159(6):1154 e1-8.

236. Cho HJ, Kim TY, Cho HJ, Park KW, Zhang SY, Kim JH, et al. The effect of stem cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor on neointimal hyperplasia and endothelial healing after vascular injury with bare-metal versus paclitaxel-eluting stents. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(2):366-74.
237. Jujo K, Li M, Losordo DW. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;45(4):530-44.
238. Villa A, Arnold R, Sánchez PL, Gimeno F, Ramos B, Cantero T, et al. Comparison of neointimal hyperplasia with drug-eluting stents versus bare metal stents in patients undergoing intracoronary bone-marrow mononuclear cell transplantation following acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2009;103(12):1651-6.
239. Brown BG, Bolson EL, Dodge HT. Arteriographic assessment of coronary atherosclerosis. Review of current methods, their limitations, and clinical applications. *Arteriosclerosis.* 1982;2(1):2-15.
240. Ng VG, Lansky AJ. Novel QCA methodologies and angiographic scores. *Int J Cardiovasc Imaging.* 2011;27(2):157-65.
241. Schoenhagen P, White RD, Nissen SE, Tuzcu EM. Coronary imaging: angiography shows the stenosis, but IVUS, CT, and MRI show the plaque. *Cleve Clin J Med.* 2003;70(8):713-9.
242. Voros S, Rinehart S, Qian Z, Vazquez G, Anderson H, Murrieta L, et al. Prospective validation of standardized, 3-dimensional, quantitative coronary computed tomographic plaque measurements using radiofrequency backscatter intravascular ultrasound as reference standard in intermediate coronary arterial lesions: results from the ATLANTA (assessment of tissue characteristics, lesion morphology, and hemodynamics by angiography with fractional flow reserve, intravascular ultrasound and virtual histology, and noninvasive computed tomography in atherosclerotic plaques) I study. *JACC Cardiovasc Interv.* 2011;4(2):198-208.
243. Beatt KJ, Serruys PW, Hugenholtz PG. Restenosis after coronary angioplasty: new standards for clinical studies. *J Am Coll Cardiol.* 1990;15(2):491-8.
244. Serruys PW, Luijten HE, Beatt KJ, Geuskens R, de Feyter PJ, van den Brand M, et al. Incidence of restenosis after successful coronary angioplasty: a time-related phenomenon. A quantitative angiographic study in 342 consecutive patients at 1, 2, 3, and 4 months. *Circulation.* 1988;77(2):361-71.

245. Kang HJ, Kim YS, Koo BK, Park KW, Lee HY, Sohn DW, et al. Effects of stem cell therapy with G-CSF on coronary artery after drug-eluting stent implantation in patients with acute myocardial infarction. *Heart*. 2008;94(5):604-9.
246. Jorgensen E, Baldazzi F, Ripa RS, Friis T, Wang Y, Helqvist S, et al. Instant neointimal hyperplasia after percutaneous intervention for ST-elevation myocardial infarction and treatment with granulocyte-colony stimulating factor. Results from the stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial. *Int J Cardiol*. 2010;139(3):269-75.
247. Ripa RS, Jorgensen E, Kastrup J. Clinical outcome after stem cell mobilization with granulocyte-colony-stimulating factor after acute ST-elevation myocardial infarction: 5-year results of the STEMMI trial. *Scand J Clin Lab Invest*. 2013 Mar;73(2):125-9.
248. Vanderheyden M, Vercauteren S, Mansour S, Delrue L, Vandekerckhove B, Heyndrickx GR, et al. Time-dependent effects on coronary remodeling and epicardial conductance after intracoronary injection of enriched hematopoietic bone marrow stem cells in patients with previous myocardial infarction. *Cell Transplant*. 2007;16(9):919-25.
249. Mansour S, Roy DC, Bouchard V, Stevens LM, Gobeil F, Rivard A, et al. One-Year Safety Analysis of the COMPARE-AMI Trial: Comparison of Intracoronary Injection of CD133 Bone Marrow Stem Cells to Placebo in Patients after Acute Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction. *Bone Marrow Res*. 2011:385124.
250. 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(24):3009-17.
251. Seiler C, Pohl T, Wustmann K, Hutter D, Nicolet PA, Windecker S, et al. Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation*. 2001;104(17):2012-7.
252. Tongers J, Losordo DW, Landmesser U. Stem and progenitor cell-based therapy in ischaemic heart disease: promise, uncertainties, and challenges. *Eur Heart J*. 2011;32(10):1197-206.
253. Corti R. Noninvasive imaging of atherosclerotic vessels by MRI for clinical assessment of the effectiveness of therapy. *Pharmacol Ther*. 2006;110(1):57-70.

## Listado de tablas

<i>Tabla 1 y 2. Relación establecida entre algunos factores clínicos y fármacos con las células precursoras endoteliales .....</i>	<i>58</i>
<i>Tabla 3. Estudios clínicos aleatorizados con implante de células madre. ....</i>	<i>92</i>
<i>Tabla 4. Estudios aleatorizados realizados con G-CSF exclusivamente. ....</i>	<i>93</i>
<i>Tabla 5. Estudios no aleatorizados con implante de células en contexto de un IAM. ....</i>	<i>94</i>
<i>Tabla 6. Estudios clínicos con implante celular intracoronario. ....</i>	<i>97</i>
<i>Tabla 7. Estudios clínicos realizados con administración de células mediante inyección intramiocárdica directa.....</i>	<i>98</i>
<i>Tabla 8. Estudios con administración intramiocárdica de células mediante técnica percutánea.. ....</i>	<i>99</i>
<i>Tabla 9. Estudios con G-CSF en cardiopatía isquémica crónica.....</i>	<i>100</i>
<i>Tabla 10. Estudios con infusión celular intracoronaria en otras miocardiopatías.....</i>	<i>101</i>
<i>Tabla 11. Eventos cardiovasculares recogidos en algunos estudios de terapia celular.....</i>	<i>103</i>
<i>Tabla 12. Segmentos coronarios según la AHA.....</i>	<i>145</i>
<i>Tabla 13. Variables de laboratorio analizadas.....</i>	<i>159</i>
<i>Tabla 14. Características basales y datos de la infusión celular y la estimulación con factor en los pacientes según grupo de tratamiento .....</i>	<i>161</i>
<i>Tabla 15. Variables angiográficas analizadas en el momento previo a la angioplastia en los segmentos obstruidos en los cuatro grupos de tratamiento. ....</i>	<i>162</i>
<i>Tabla 16. Variables angiográficas analizadas a la semana de la revascularización en los segmentos tratados en los cuatro grupos de tratamiento. ....</i>	<i>163</i>

<i>Tabla 17. Variables angiográficas analizadas a la semana de la revascularización en los 5 mm distales al stent en los cuatro grupos de tratamiento.</i>	165
<i>Tabla 18. Variables angiográficas analizadas a la semana de la revascularización en los 5 mm proximales al stent en los cuatro grupos de tratamiento.</i>	166
<i>Tabla 19. Variables angiográficas analizadas a la semana de la revascularización en el subsegmento recubierto por stent en los cuatro grupos de tratamiento.</i>	167
<i>Tabla 20. Variables angiográficas analizadas en el total del segmento tratado a los 9 meses de seguimiento en los cuatro grupos de tratamiento.</i>	169
<i>Tabla 21. Variables angiográficas analizadas en los 5 mm distales al stent a los 9 meses de seguimiento en los cuatro grupos de tratamiento.</i>	170
<i>Tabla 22. Variables angiográficas analizadas en los 5 mm proximales al stent a los 9 meses de seguimiento en los cuatro grupos de tratamiento.</i>	171
<i>Tabla 23. Variables angiográficas analizadas en el subsegmento recubierto de stent a los 9 meses de seguimiento en los cuatro grupos de tratamiento.</i>	172
<i>Tabla 24. Evolución del diámetro mínimo luminal (MLD) desde la angioplastia hasta los 9 meses de seguimiento en el conjunto del segmento tratado.</i>	173
<i>Tabla 25. Evolución del diámetro luminal por subsegmentos.</i>	174
<i>Tabla 26. Variables angiográficas basales del segmento distal de la ARI en los cuatro grupos de tratamiento.</i>	176
<i>Tabla 27. Variables angiográficas en el seguimiento del segmento distal de la ARI en los cuatro grupos de tratamiento.</i>	178
<i>Tabla 28. Cambios en diámetros mínimos y de referencia a los 9 meses respecto de los valores basales así como de porcentaje de estenosis.</i>	178
<i>Tabla 29. HSD de Tukey del incremento de diámetro luminal mínimo.</i>	178

<i>Tabla 30. Variables angiográficas basales del segmento a estudio de la arteria contralateral en los cuatro grupos de tratamiento.....</i>	<i>180</i>
<i>Tabla 31. Variables angiográficas de seguimiento del segmento a estudio de la arteria contralateral distal en los cuatro grupos de tratamiento. ....</i>	<i>180</i>
<i>Tabla 32. Cambios en diámetros mínimos y de referencia a los 9 meses respecto de los valores basales expresados en milímetros, así como de porcentaje de estenosis. ....</i>	<i>181</i>
<i>Tabla 33. HSD de Tukey del incremento de diámetro luminal mínimo.....</i>	<i>181</i>
<i>Tabla 34. Cambios en diámetros mínimos y de referencia a los 9 meses respecto de los valores basales así como de porcentaje de estenosis. ....</i>	<i>182</i>
<i>Tabla 35. Análisis comparativo de nuestros datos en relación al estudio STEMMI.....</i>	<i>198</i>
<i>Tabla 36. Pérdida de luz tardía recogida en dos estudios realizados con stent convencional y resultados contradictorios y el valor de referencia del stent convencional recogido del estudio SIRIUS.....</i>	<i>202</i>
<i>Tabla 37. Presentación de nuestros resultados en comparación con el estudio FINCELL.....</i>	<i>203</i>
<i>Tabla 38. Comparación de nuestros resultados con los pacientes del estudio MAGIC Cell3DES.....</i>	<i>206</i>



## Listado de figuras

<i>Figura 1 . Estructura de la arteria sana. ....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 2. Primera fase de la aterosclerosis. La formación de la estría grasa. ....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 3. Evolución de la placa de ateroma.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 4. Placa de ateroma complicada. La rotura de la placa. ....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 5. Esquema del protocolo del estudio TECAM aleatorizado. ....</i>	<i>124</i>
<i>Figura 6. Dibujo esquemático del segmento coronario analizado .....</i>	<i>147</i>
<i>Figura 7. Distribución de los pacientes de acuerdo al número de factores de riesgo acumulados. ....</i>	<i>156</i>
<i>Figura 8. Segmentos arteriales coronarios relacionados con el infarto. ....</i>	<i>157</i>
<i>Figura 9. Distribución del tipo de terapia de reperfusión. ....</i>	<i>158</i>
<i>Figura 10. Día de implante celular desde el momento de la angioplastia.....</i>	<i>159</i>
<i>Figura 11. Comparación de la fórmula leucocitaria entre grupos de tratamiento.....</i>	<i>162</i>