

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

Seguridad y eficacia de la inyección transendocárdica de células progenitoras endoteliales autólogas CD 133+ para angiogénesis terapéutica en pacientes sin más opción

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Juan José González Ferrer

Directores

Pilar Jiménez-Quevedo
Carlos Macaya Miguel

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

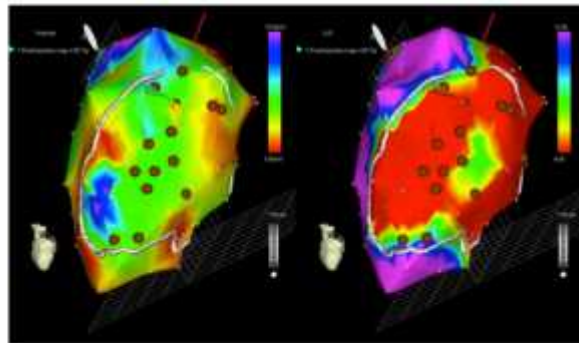
FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina

TESIS DOCTORAL



**SEGURIDAD Y EFICACIA DE LA INYECCIÓN
TRANSENDOCÁRDICA DE CÉLULAS PROGENITORAS
ENDOTELIALES AUTÓLOGAS CD 133 PARA LA
ANGIOGÉNESIS TERAPÉUTICA EN PACIENTES SIN
MÁS OPCIÓN.**



JUAN JOSÉ GONZÁLEZ FERRER
Madrid 2015

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

Bajo la dirección de los doctores:

- Pilar Jiménez Quevedo
- Carlos Macaya Miguel

TESIS UNIVERSITARIA

***Seguridad y eficacia de la inyección
transendocárdica de células
progenitoras CD133+ para la
angiogénesis terapéutica en pacientes
sin más opción.***

Autor

Juan José González Ferrer.

Directores

Dra. Pilar Jiménez-Quevedo.

Prof. Dr. Carlos Macaya Miguel.

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
SERVICIO DE CARDIOLOGÍA
HOSPITAL UNIVERSITARIO CLÍNICO SAN CARLOS**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

INFORME DE LOS DIRECTORES DE TESIS

Dña. Pila Jiménez Quevedo, Facultativo Especialista de Área de la Unidad de Hemodinámica del Hospital Clínico San Carlos y D. Carlos Macaya Miguel, Jefe de Servicio de Cardiología del Hospital Clínico San Carlos y Catedrático de la Universidad Complutense de Madrid, certifican:

Que Don Juan José González Ferrer, licenciado en Medicina y Cirugía y especialista en Cardiología, ha realizado bajo su dirección y supervisión la tesis titulada “Seguridad y eficacia de la inyección de células progenitoras CD133+ para la angiogénesis terapéutica en pacientes sin más opción” y que dicho trabajo reúne las condiciones de rigor y originalidad científica para ser presentado como Tesis Doctoral.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación en Madrid, a 15 de Octubre de 2015

Fdo. Dra. Pilar Jiménez Quevedo

DNI: 44039318-E

Fdo. Dr. Carlos Macaya Miguel

DNI: 41093737-M

AUTOR

Juan José González Ferrer, licenciado en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Especialista en Cardiología en el Hospital Clínico San Carlos. Master en Electrofisiología Cardíaca Diagnóstica y Terapéutica, UCM. Diplomado en Diseño y Estadística para las ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Barcelona.

DIRECTORES

Dr. Pilar Jiménez Quevedo médico adjunto del servicio de Cardiología del Hospital Clínico San Carlos. Unidad de Hemodinámica.

Dr. Carlos Macaya Miguel catedrático de Medicina. Departamento de Medicina de UCM. Jefe de servicio de Cardiología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

Agradecimientos y reconocimientos

- *A todos mis compañeros del Hospital Clínico San Carlos y en especial a todas las personas que trabajan conmigo en la unidad de arritmias porque, aunque no lo crean, me hacen ser mejor persona cada día.*

- *A todos los que me enseñaron, no hay mayor tesoro que se pueda desear que el conocimiento de las personas a las que admiras.*

- *A toda mi familia, mis padres, mi hermana, mis sobrinos... su cariño y comprensión me acompaña todos los días de mi vida.*

- *A Tania porque su amor me empuja a crecer y a creer que uno siempre puede ser mejor.*

- *Por último quiero reconocer y agradecer el tiempo y el trabajo que han dedicado tanto mis tutores de tesis como los miembros del tribunal y el departamento de medicina de la Universidad Complutense de Madrid para que esta tesis pueda ver la luz.*

“El éxito no es definitivo, el fracaso no es fatídico. Lo que cuenta es el valor para continuar.”

Winston Churchill

1874-1965

ÍNDICE

RESUMEN	11
SUMMARY	18
INTRODUCCIÓN	25
Pacientes con Cardiopatía Isquémica sin opción a revascularización	25
El manejo médico de los pacientes con angina refractaria sin opción a la revascularización	29
Concepto de <i>Cluster of Differentiation</i>	36
Las células endoteliales en las enfermedades cardiovasculares	38
Introducción a la terapia celular en el campo de la Cardiología	43
Terapia Celular mediante el trasplante de células madre procedentes de la Medula Ósea: selección de progenitores endoteliales	50
Inyección transendocárdica con un sistema de mapeo electromecánico (NOGA)	53
Estudios preclínicos en los que se ha utilizado el sistema NOGA como sistema de inyección celular	58
Estudios clínicos en los que se ha utilizado el sistema NOGA como sistema de guía para la liberación celular	60
Estudios Clínicos y Preclínicos en Terapia Celular realizados mediante la administración de la Fracción Mononucleada de la Médula Ósea	65
Estudio preclínicos	65
Estudios Clínicos	69
Estudio Preclínicos y Clínicos llevados a cabo mediante la administración de Progenitores Endoteliales Seleccionados	74
Estudios preclínicos	74
Estudios clínicos	76
OBJETIVOS Y VARIABLES PRINCIPALES DEL ESTUDIO	79
MATERIAL Y MÉTODOS	81
Tipo de estudio y diseño del mismo	81
Criterios de inclusión	81
Criterios de exclusión	82
Número de sujetos previstos y justificación del mismo	83
Criterios de finalización del estudio	83
Desarrollo del estudio y descripción de los procedimientos.	84

Desarrollo del ensayo	84
Procedimientos	87
Análisis estadístico	103
RESULTADOS	105
Descripción de la muestra.....	105
Resultados inmediatos del procedimiento	112
Eficacia evaluada por la entrevista clínica y el cuestionario de Seattle	113
Eficacia evaluada por las pruebas.	118
Perfusión miocárdica evaluada por SPECT.	118
Cambios ecocardiográficos.....	121
Cambios en la capacidad funcional valorada con ergometría	122
Evolución de los mapas de voltaje y acortamiento lineal	123
Variaciones analíticas, electrocardiográficas y angiográficas.....	124
Complicaciones en el seguimiento	127
DISCUSIÓN.....	129
Limitaciones	137
CONCLUSIONES	139
PUBLICACIONES DEL ESTUDIO Y FUENTES DE FINANCIACIÓN.....	155

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP Adenina difosfato

AP Anatomía Patológica

CCS Sociedad Canadiense de Cardiología

CFR Reserva de Flujo Coronario

CMMO Células madre derivadas de la médula ósea

CD Cluster of Differentiation

DAI Desfibrilador automático implantable

EC Célula endotelial

EPC Célula madre o progenitora endotelial

FFR Reserva Fraccional de Flujo

FGF Factor de Crecimiento derivada de fibroblastos

FE Fracción de eyección del ventrículo izquierdo

FV Fibrilación ventricular

G-CSF Factor estimulante de colonias de granulocitos

H Hidrogenión

HCS Células madre hematopoyéticas

HGF Factor de crecimiento hepatocitario

IMR Índice de Resistencia Microcirculatoria

I_f Funny current

IL-1B Interleuquina 1B

IGF-1 Factor de Crecimiento tipo Insulínico 1

K Potasio

KV Kilovoltios

LLS Acortamiento Lineal Local

MO Médula Ósea

mA Miliamperios

NAD Nicotinamida Adenina Dinucleótido

O₂ Oxígeno

PBS Tampón fosfato-salino

PET Tomografía por emisión de positrones

RM Resonancia Magnética

RIQ Rango intercuartílico

RT-PCR Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SD Desviación estándar

SPECT Tomografía por emisión de fotón único

TV Taquicardia Ventricular

TAC Tomografía Axial Computarizada

VEGF Factor de crecimiento derivado del endotelio vascular

V Voltios

VI Ventrículo izquierdo

WMSI Índice de motilidad parietal

RESUMEN

Introducción:

La cardiopatía isquémica no sólo es la enfermedad cardiovascular con mayor mortalidad en el mundo sino que además determina una extraordinaria morbilidad especialmente cuando degeneran en insuficiencia cardiaca o angina refractaria. Lamentablemente el arsenal terapéutico para estos escenarios es limitado y no son pocos los pacientes que no responden. En este escenario el cardiólogo asiste impotente al progresivo deterioro de la calidad de vida de los pacientes hasta su inexorable final. Por otro lado se genera una gran demanda sanitaria donde la sociedad alienta incansablemente a la comunidad científica a conseguir más y mejores resultados. En este contexto la terapia celular se ha alzado como una terapia prometedora en base a los buenos resultados obtenidos en los estudios experimentales tanto con pequeños como con grandes mamíferos. Los estudios clínicos pioneros fueron realmente ilusionantes pero la consolidación de los mismos en ensayos clínicos de mayor tamaño muestral se enfrentó con incongruencias y limitaciones que han llevado a replantearse hasta los conocimientos más fundamentales. Sin embargo este paso atrás no ha significado un abandono de la terapia, más bien ha permitido que la comunidad científica exija unas bases más robustas, un mejor diseño de los estudios y una homogenización en la forma de evaluar los resultados.

Así pues Takayuki Ashara publicó en 1997 un artículo donde demostraba la existencia en sangre periférica de progenitores endoteliales circulantes. Estudios posteriores confirmaron que la médula ósea es la fuente fundamental de renovación de las células endoteliales. Este hallazgo constituye el pilar científico en el que se han apoyado diversas líneas de investigación

sobre terapia celular en el tratamiento de la isquemia tisular y es el que fundamenta la hipótesis de nuestro trabajo.

Actualmente sabemos que la población identificada por Ashara y sus colaboradores contenía progenitores endoteliales pero también células endoteliales maduras y células hematológicas por lo que ha sido necesario mejorar la identificación de los progenitores endoteliales prematuros. A este respecto la identificación del antígeno CD133, sin función biológica conocida, permite obtener células madre endoteliales precoces que en estudios in vitro han mostrado una gran capacidad secretora y proliferativa.

Por otro lado gran parte del grueso de pacientes con angina refractaria sin opción de revascularización presentan oclusiones crónicas con lo que las células no pueden ser liberadas por vía intracoronaria y la inoculación directa quirúrgica conlleva por lo general una considerable morbimortalidad. Por lo tanto la liberación mediante inyección transendocárdica parece el método más adecuado y además viene avalado por estudios previos tanto preclínicos como clínicos, principalmente en el tratamiento paliativo de la insuficiencia cardíaca. Además la utilización del sistema de integración electroanatómica NOGA, al incrementar la seguridad y mejorar la discriminación entre áreas viables de las áreas de infarto, mejora notablemente las posibilidades de la terapia.

Hasta la fecha no se había conjugado el potencial de las células CD133 + con la precisión del sistema de liberación apoyado por NOGA para tratar a pacientes con angina refractaria sin más opción revascularizadora y que persistían sintomáticos pese a la medicación. Nuestro grupo se planteó esta hipótesis, es decir la terapia puede realizarse de forma práctica en humanos, que no sobrepasa los estándares de seguridad de los procedimientos intervencionistas de similar magnitud y que es efectiva. Por lo que el objetivo principal del estudio fue evaluar la seguridad y la factibilidad de la inyección de progenitores endoteliales

CD133+ en pacientes con angina refractaria a la terapéutica convencional. El objetivo secundario fue evaluar la eficacia analizando las variables que otros estudios en este ámbito habían previamente evaluado.

Metodología:

Para satisfacer los objetivos marcados se diseñó un estudio aleatorio, multicéntrico, doble ciego y controlado con placebo, que fue bautizado como estudio PROGENITOR (The endothelial PROGENITOR cells and Refractory angina trial). Los pacientes incluidos debían presentar angina al menos clase II de la CCS a pesar de la mejor terapia posible y sin posibilidad de someterse de nuevo a un procedimiento de revascularización, con isquemia inducible o zonas de viabilidad demostradas por SPECT. Se excluyeron de forma específica a pacientes con fibrilación auricular permanente, infarto agudo de miocardio reciente (menos de 3 meses), la presencia de trombo intraventricular, que presentasen un espesor parietal en la zona objetivo menor de 8 mm o cualquier condición que a juicio de los investigadores podría poner en un riesgo excesivo a los pacientes. La fórmula de aleatorización fue computerizada y diseñada para generar una asignación 2:1 favorable al tratamiento. En todos los pacientes se estimuló la médula ósea con G-CSF durante 4 días sometiéndoles al quinto día a un proceso de leucoaféresis. Sólo en los pacientes asignados al brazo terapéutico se seleccionaron y aislaron las células CD133+. El día del procedimiento a todos los pacientes se les realizó un mapeo electroanatómico identificándose las zonas objetivo y reconfirmándose su viabilidad al presentar un voltaje unipolar mayor de 6,9 mV y un acortamiento lineal menor de 12. Sólo a los pacientes asignados al tratamiento se le inyectó la dosis objetivo (20 a 30 millones de células) practicándose una simulación en pacientes control. Todos los pacientes fueron supervisados en la unidad coronaria en las siguientes 24 horas realizándose un nuevo control

clínico a la semana, al mes, a los 3, 6, 12 y 24 meses. A los seis meses se repitió la coronariografía y el mapeo electroanatómico, la perfusión sería reevaluada con SPECT a los 6, 12 y 24 meses. Las variables principales del estudio fueron la seguridad de la terapia evaluada como la incidencia de eventos cardiovasculares mayores (muerte cardiovascular, infarto de miocardio no fatal, ictus no fatal, necesidad de revascularización urgente) y de eventos relacionados con el procedimiento (derrame pericárdico/taponamiento, complicaciones vasculares, taquicardias ventriculares sostenidas y el desarrollo de un infarto de miocardio tipo 4). Por otro lado se evaluó la eficacia terapéutica en función de los cambios de perfusión evaluados en el SPECT, los cambios en la capacidad funcional evaluados con la ergometría y clínicamente por los cambios en los episodios anginosos mensuales, en el uso de medicación de rescate, de la clase CCS o en el cuestionario de Seattle. El análisis estadístico se dividió en dos partes, una parte clásica descriptiva donde las variables continuas se expresaron como media o mediana y las categóricas como porcentaje o número absoluto. La parte analítica empleó de forma general pruebas no paramétricas, en varias ocasiones los resultados se muestran como diferencia absoluta entre los valores a los 6 meses y los basales con su correspondiente intervalo de confianza al 95%. En el análisis de las diferencias terapéuticas entre grupos se empleó el análisis de la covarianza con ajuste por el valor basal y otras covariables. En el análisis de la incidencia de eventos adversos se calculó la probabilidad de evento en el grupo terapéutico empleando el grupo control como referencia bajo una distribución binomial. Al considerarse un estudio piloto el tamaño muestral no fue calculado a priori. Todos los análisis se realizaron con intención de tratar empleándose el paquete estadístico SPSS 15.0 o STATA 9.0. En este trabajo se indica sólo el valor exacto de la p (2 colas) cuando esta es menor de 0,05. Por razones metodológicas sólo se mostraran los resultados de los primeros 6 meses.

Resultados:

De 237 pacientes evaluados un total de 28 pacientes fueron incluidos, 19 al grupo terapéutico y 9 al control. La edad mediana de la muestra fue de 64,4 años (58,0-73,1), un 85,7% eran hombres y el 71,4% de los pacientes presentaban una clase funcional de la CCS \geq III. Las características basales entre grupos fueron similares excepto la edad que fue significativamente mayor en el grupo terapéutico y el consumo de antagonistas del calcio que fue mayor en el grupo control. Todos los pacientes recibieron 30 millones de células CD133+ en la zona objetiva excepto uno que recibió 24 millones. Durante el procedimiento un paciente del grupo terapéutico presentó un episodio de fibrilación ventricular precedido de una taquicardia ventricular polimórfica mecánicamente inducida que fue resuelto sin complicaciones. También en este grupo se produjo un taponamiento cardiaco con parada cardiaca que aunque fue evacuado inmediatamente lamentablemente desencadenó el fallecimiento del paciente en las siguientes 24 horas por un shock cardiogénico refractario. Por último en el grupo terapéutico un paciente presentó una elevación considerable de los marcadores de necrosis pero no asociado a nuevos trastornos de la contractilidad y ninguna clínica sugerente, al ser relacionado con un procedimiento percutáneo, quizás una microembolización, se catalogó como un infarto tipo 4a. En el seguimiento clínico de los primeros 6 meses un paciente del grupo control presentó un episodio de FV a las 24 horas del procedimiento que fue desfibrilado sin complicaciones y se sometió al implante de un DAI antes del alta. Este paciente falleció a los 3 meses y medio de manera súbita sin registrarse eventos en el dispositivo pero sin conocerse de forma precisa la causa de la muerte por haberse denegado la autopsia. Dos pacientes en el grupo control y dos en el grupo terapéutico

tuvieron un ingreso hospitalario por causas cardiovasculares, en el grupo control se debió a inestabilización de la angina y en el grupo terapéutico por agravamiento de la insuficiencia cardiaca previa. De forma global no se registraron diferencias estadísticamente significativas en las variables principales de seguridad.

La viabilidad de las células inyectadas fue excelente siendo mayor del 97% al igual que su pureza que superó el 94%. En cultivo mostraron una buena capacidad proliferativa adquiriendo capacidades de células endoteliales adultas tales como formar microtúbulos o captar la LDL acetilada.

Clínicamente en el grupo terapéutico se observó a los 6 meses un menor número de episodios de angina con un promedio de 8,5 episodios mensuales menos (-15 a -4), un menor consumo de nitratos de acción rápida [3,5 unidades menos (-5,2 a 0,0)] y una mejoría en la clase Canadiense de la angina CCS, con una disminución promedio de un orden en la escala (2,0 a 0,0). Estos cambios significativos no se registraron en el grupo control sin embargo la comparación directa entre grupos con ajuste de las posibles covariables no mostró diferencias significativas. El cuestionario de Seattle también mostró una evolución favorable en el grupo terapéutico y no en el control, si bien de nuevo la comparación entre grupos no fue significativa. Pruebas más objetivas como la ergometría o la evaluación de la perfusión con SPECT demostraron que aunque el grupo terapéutico presentó un mayor tiempo de ejercicio hasta la angina y unos mejores índices sumatorios de perfusión a los 6 meses, estos cambios no fueron significativamente diferentes a los obtenidos por el grupo control. Finalmente no se observó progresión de la enfermedad coronaria en ambos grupos, en el grupo terapéutico se registró un incremento del acortamiento lineal en los segmentos previamente tratados, fenómeno no observado en el grupo control. De nuevo la comparación entre grupos no mostró diferencias significativas.

Conclusiones:

En este ensayo clínico se demuestra por primera vez en humanos que la inyección transendocárdica de progenitores endoteliales CD133+ para el tratamiento de la angina refractaria es segura y factible. Se pudo realizar en todos los pacientes y no se documentaron efectos adversos más allá de los esperables para el grado de complejidad terapéutica y de la evolución de la enfermedad cardiaca. Aunque el estudio no fue diseñado específicamente para explorar estadísticamente muchos de los parámetros estudiados se pudo afirmar que los pacientes tratados mostraron mejoría clínica durante los primeros 6 meses de seguimiento.

SUMMARY

Rationale and objectives:

Ischemic heart disease is not only the cardiovascular disease with the highest mortality in the world but also determines an extraordinary morbidity especially related to heart failure or refractory angina. Unfortunately, the therapeutic arsenal for these scenarios is limited and there are many patients who do not respond. Cardiology attends helplessly to the progressive deterioration of the quality of life of patients until its inexorable end. On the other hand it generates a great health demand and society tirelessly encourages the scientific community to achieve more and better treatments. In this context, cell therapy has risen as a promising therapy based on the good results obtained in experimental studies with both small and large mammals. The pioneering clinical studies were really exciting but the results have not been consolidated in clinical trials with larger sample sizes showing inconsistencies and limitations, which make us reconsider even the most basic knowledge. However, this setback has not led to forget the therapy rather it has allowed the scientific community to demand a more robust basis, better study design and homogenization on how to evaluate the results.

Takayuki Ashara disclosed in 1997 the existence of endothelial progenitors in peripheral blood. Subsequent studies have confirmed that the bone marrow is the fundamental source of adult endothelial cells. This finding is the scientific pillar of several research works regarding cell therapy in the treatment of tissue ischemia and it is certainly the trail of our work.

Currently it is known that the cell population identified by Ashara and colleagues consists of not only endothelial progenitors but also mature endothelial cells and other blood cells. Thus

it was necessary to improve the identification of immature cells. In this regard the identification CD133 antigen, nowadays without known biological function, allows harvesting immature endothelial stem cells that in vitro studies have shown a large secretory and proliferative capacity.

On the other hand much of the bulk of patients with refractory angina without revascularization option have chronic occlusions so that therapy cannot be released by intracoronary direct inoculation. In addition other techniques such as an epicardial surgical approach usually involves a considerable morbidity and mortality. Therefore the release by transendocardial injection has been judged the most suitable method and came backed by both previous preclinical and clinical studies, mainly in the palliative treatment of heart failure. Furthermore the use of electroanatomical NOGA system increases the security and improves the discrimination between viable areas of necrotic areas improving the successful chances of the therapy.

So far the potential of CD133 + cells combined with the accuracy of the NOGA delivery system to treat patients with refractory angina without a revascularization option and frequent symptoms despite optimal medical treatment have not been evaluated. Our group intends to defend this hypothesis, namely this therapy can be performed in humans, does not exceed the safety standards of the interventional procedures of similar magnitude and it is effective. Thus our main objective was to evaluate the safety and feasibility of injecting CD133 + endothelial progenitor cells in patients with refractory angina to conventional therapy. The secondary objective was to evaluate the efficacy using the same variables analyzed in previously studies.

Methods:

A randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled study, PROGENITOR (The endothelial PROGENITOR cells and Refractory angina trial) study, was designed. Patients included had at least a class II for angina (Canadian Cardiovascular Society) despite the best medical therapy with coronary anatomy not amenable for surgical or percutaneous revascularization and inducible ischemia or viability zones demonstrated by SPECT. Exclusion criteria were: permanent atrial fibrillation, recent acute myocardial infarction (within 3 months), presence of intraventricular thrombus, left ventricular wall thickness < 8 mm in the target zone or any condition that the trial researchers considered an unreasonable risk for the patients. Centralized telephonic randomization was performed and designed to generate a 2:1 ratio favorable to treatment arm. All patients were treated with G-CSF for 4 days, the fifth day all patients underwent leukapheresis to isolate the mononuclear fraction from peripheral blood. Only those patients allocated to the cell group CD133+ progenitor cells were isolated by immunomagnetic selection (CliniMacs). The day of the procedure all patients underwent an electroanatomic mapping with the NOGA XP platform, identifying again the target areas by assessing the viability with unipolar voltage and lower linear shortening values [unipolar voltage >6,9 mV associated with decreased mechanical activity (LLS) <12 respectively]. Only patients allocated to the treatment arm underwent to transmyocardial delivery of CD133+ progenitors cells (dose 20 to 30 million cells). Patients allocated to control arm a phantom injection was performed. All patients were monitored in the coronary care unit for 24 h. Clinical follow up was scheduled at 1 week, 1, 3, 6, 12 and 24 months. At six months, a coronary angiography and electroanatomic mapping were repeated. SPECT follow up was scheduled at 6, 12 and 24 months. The primary end point of the study was the safety of the therapy evaluated

by recording the incidence of major cardiovascular events (cardiovascular death, nonfatal myocardial infarction, nonfatal stroke, need for urgent revascularization) and events related to the procedure (pericardial effusion / tamponade , vascular complications, sustained ventricular tachycardias and the development of myocardial infarction type 4). On the other hand the effectiveness was assessed by evaluating the changes in perfusion, changes in functional capacity and clinical status (number of angina episodes per month, number of nitroglycerin-tablet consumption per month, CCS class and by Seattle test). Statistical analysis was divided in two parts, one classic descriptive where continuous variables were expressed as mean or median and categorical variables as percentage or absolute number. In the analytical study nonparametric tests were generally used. Some results were expressed by absolute difference between the values at 6 months and baseline values, 95% confidence interval was added. To assess the treatment effect between groups the covariance analysis was used and adjusted by baseline value and other covariables. To contrast the difference in the probability of major adverse cardiovascular and cerebrovascular event between groups, the probability of an event was estimated using the probability of the control group as a reference under a binomial distribution. This is a pilot study and therefore no specific sample was calculated. All statistical analyses were performed according to the intention to treat principle using SPSS (version 15.0) or STATA (version 9.0) software, all reported P values were 2-sided and statistical significance was set at $P < 0,05$. For methodological reasons only the first six months results are showed.

Results:

237 patients were evaluated, only 28 patients were included. 19 patients were allocated to the treatment group and 9 to the control arm. The median age of the sample was 64.4 years (58.0 to 73.1), 85.7% were men and 71.4% of patients had functional class CCS \geq III. Baseline characteristics were similar between groups except age that was significantly higher in the treatment group and the consumption of calcium antagonists that was higher in the control group. All patients received 30 million CD133 + cells in the target area except one patient that received 24 million CD133+ cells. During the procedure, one patient in the treatment group had an episode of ventricular fibrillation preceded by a mechanically induced polymorphic ventricular tachycardia that was resolved without complications. Also in this group another patient had a cardiac arrest due to a cardiac tamponade that was immediately evacuated although the patient regrettably died within 24 hours after a refractory cardiogenic shock. Finally in the treatment group a significant increase in markers of necrosis was document in one patient but it was not associated with new contractile dysfunction or new symptoms, possibly related to the percutaneous procedure, perhaps a microembolization event, a type 4a myocardial infarction was recognized. In the clinical follow up one patient in the control group had an episode of VF after 24 hours of the procedure, it was defibrillated without complications and the patient underwent a defibrillator implant. This patient died suddenly 3.5 months after the procedure, his ICD was assessed without arrhythmic events but precise etiology of the death is unknown because the autopsy was denied. Two patients in the control group and two in the treatment group were admitted to hospital for cardiovascular causes. In the control group it was due to a destabilization of their angina and in the therapeutic group

for worsening heart failure. Globally no statistically significant differences between groups in the primary end point were recorded.

The viability of the injected cells was excellent being greater than 97% and purity exceeded 94%. In culture these cells showed a good proliferative profile and acquired capabilities of adult endothelial cells such as microtubules formation or attachment of acetylated LDL. Clinically in the treatment group the number of episodes of angina at 6 month follow up decreased with an average of 8.5 fewer episodes per month (-15 to -4), in addition less consumption of fast-acting nitrates [3.5 units less (-5.2 to 0.0)] and an improvement in CCS angina class [1,0 class less (2.0 to 0.0)] were noted. In the control arm no significant changes occurred however direct comparison between groups with adjustment by covariates did not show significant differences. Seattle Angina questionnaire also showed a favorable trend in the therapeutic group and not in control while comparison between groups was again not significant. More objective tests such as treadmill test or SPECT showed that although patients in cell group took more time to the onset of angina and an improvement in the perfusion evaluated by SPECT (summed scores) at 6 months in the treatment group was noted, these changes were not significantly different with those obtained by the control group. Finally, no progression of coronary disease was observed in both groups, in the treatment group an increase in the linear shortening on previously treated segments was noted, this was not observed in the control group. Comparison between groups showed no differences.

Conclusions:

This first-in-man study confirms that injection of selected CD133+ cells in ischemic myocardium identified with electroanatomical mapping is feasible and safe. The study is essentially negative from the standpoint of objective measures of ischemia. However, the results derived from serial analyses in terms of improvement of angina symptoms and some SPECT-derived ischemia parameters in no candidates for myocardial revascularization are encouraging and should be confirmed in a large randomized trial.

INTRODUCCIÓN

Pacientes con Cardiopatía Isquémica sin opción a revascularización

Las enfermedades cardiovasculares en su conjunto constituyen la principal causa de muerte en los países occidentales. Dentro de este conjunto la enfermedad coronaria es la más prevalente y sin duda con mayor mortalidad¹.

La insuficiencia cardíaca representa el estadio final de múltiples enfermedades cardíacas como: la hipertensión arterial, la enfermedad valvular o las miocardiopatías, pero entre ellas la cardiopatía isquémica es su principal responsable. Así pues, actualmente unos 4,6 millones de americanos sufren este síndrome, estimándose que aparecerán 550.000 nuevos casos cada año². La insuficiencia cardíaca es la única categoría dentro de las enfermedades cardiovasculares en la que la prevalencia, la incidencia y la mortalidad se han incrementado a lo largo de estos últimos 25 años. Además con el envejecimiento de la población y el descenso en la mortalidad por otro tipo de enfermedades es más que probable que la insuficiencia cardíaca continúe siendo un problema sanitario de primer orden y que se magnifique en los años venideros.

La angioplastia luminal percutánea y la cirugía de revascularización miocárdica son técnicas de revascularización coronaria con capacidad de eliminar o reducir los síntomas y mejorar, en ciertos escenarios, el pronóstico de los pacientes con enfermedad coronaria. Sin embargo a pesar de los avances en el tratamiento médico y en las técnicas de revascularización, existe un grupo de pacientes con isquemia miocárdica sintomática que no es candidato para ningún tipo de técnica de revascularización. Este grupo de pacientes podría

ser de hasta un 12 % de aquellos que son remitidos para un cateterismo cardiaco diagnóstico³ y se está incrementando por las mismas razones que se esgrimían en el párrafo anterior.

Los pacientes sin opción son aquellos con enfermedad coronaria difusa, con lesiones en vasos pequeños, lesiones localizadas en los segmentos distales, con reestenosis intrastent, oclusiones totales crónicas o con comorbilidades que contraindican cualquier modalidad convencional de revascularización. Estos pacientes constituyen un grupo heterogéneo, con dos patrones tanto clínicos como pronósticos identificables. Un subgrupo de pacientes presentaría una gran cantidad de miocardio viable y su síntoma predominante sería la angina de pecho. En estos pacientes, se ha demostrado que el aumento de la perfusión miocárdica puede mejorar los síntomas, la fracción de eyección, revertir el remodelado ventricular⁴ e incrementar la supervivencia⁵. Por el contrario, el otro subgrupo incluiría pacientes con una viabilidad limitada, en los que predominarían los síntomas de insuficiencia cardiaca. Este subgrupo de pacientes presentaría una pobre respuesta al incremento de la perfusión miocárdica⁶.

Cuando se produce una reducción de la perfusión miocárdica, espontáneamente se desarrolla circulación colateral que intenta suplir al área en isquemia. La severidad de la isquemia residual dependerá, por tanto, de la capacidad individual para la neoangiogénesis, con menores posibilidades a mayor número de factores de riesgo cardiovascular. Este proceso estaría principalmente limitado en pacientes diabéticos, con insuficiencia renal o en los ancianos⁷. La capacidad neovascularizadora tiene implicaciones tanto clínicas como pronósticas; así por ejemplo, en el seno de un infarto agudo de miocardio, la presencia y potenciación (arteriogénesis) de colaterales limita el tamaño de infarto y preserva la viabilidad, reduciendo la mortalidad a largo plazo⁸⁻¹⁰. En los pacientes con angina estable el

desarrollo de colaterales se asocia a una menor frecuencia de episodios de angina y a una mejor capacidad funcional sin angina. Por último la presencia de colaterales tras una intervención coronaria percutánea se asocia a una disminución de los eventos a largo plazo ¹¹. Estudios previos han mostrado que la circulación colateral es visible por angiografía en menos de 10 días tras una oclusión coronaria aguda persistente ¹². Sin embargo el tiempo exacto para el desarrollo de colaterales en humanos no se puede estimar con precisión puesto que se desconoce, por lo general, el estado de desarrollo que presentaban previo a la oclusión. En estudios animales el desarrollo de la circulación colateral comenzaría en las primeras 24 horas y se completaría en la primera semana¹³, siendo la maduración funcional final hacia las 12 semanas¹⁴⁻¹⁵ **(Figura 1)**.

Por todo ello la investigación en el campo de la génesis vascular ha cobrado una relevancia clínica significativa al entender que el desarrollo terapéutico de la misma puede constituirse en un elemento esencial en el arsenal terapéutico de este tipo de pacientes, quizás la última esperanza. En este sentido la terapia celular mediante el trasplante de células madre autólogas representa un área prometedora^{16, 17}.

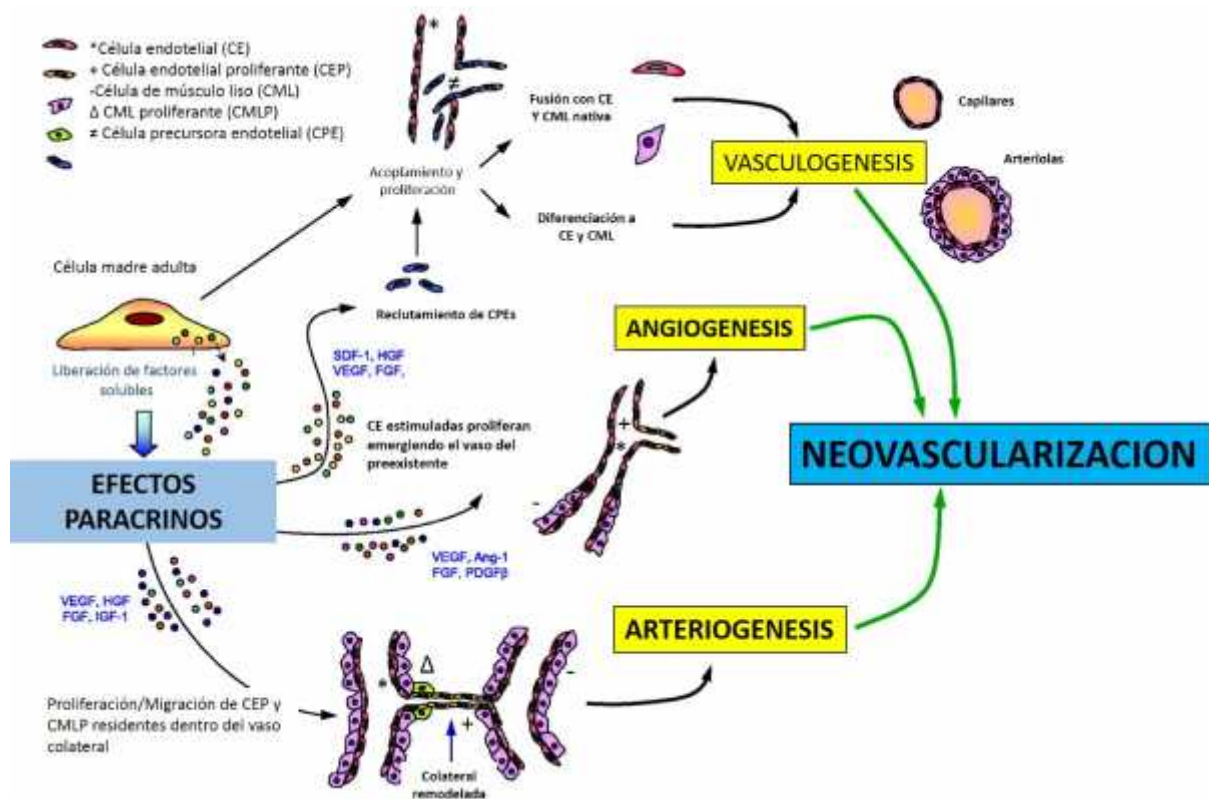


Figura 1. Mecanismos implicados en la neovascularización cardíaca. Los vasos de un corazón adulto (postembrionario) se mantienen quiescentes y sólo ante una situación de estrés tisular o en condiciones patológicas, como se darían en la hipoxia tisular mantenida o en un infarto de miocardio, el lecho vascular podría proliferar. Se distinguen tres mecanismos diferentes: la vasculogénesis sería el procedimiento de formación de nuevos vasos a partir de células madre endoteliales procedentes de la médula ósea y células madre adultas residentes. La angiogénesis consiste en la proliferación de vasos a partir de los preexistentes a modo de brotes debido a la replicación de células endoteliales adultas. Por último la arteriogénesis consiste en el crecimiento y el desarrollo muscular de las colaterales preexistentes. Obsérvese que aparte de la participación de células madre su capacidad paracrina y autocrina son claves para este proceso.¹⁷

El manejo médico de los pacientes con angina refractaria sin opción a la revascularización

El corazón es un órgano aeróbico que basa su producción de energía casi exclusivamente en la oxidación de sustratos. La circulación coronaria consta de tres sistemas vasculares conectados en serie (arterial, capilar y venoso). El sistema arterial presenta una porción proximal constituida por las arterias coronarias epicárdicas (diámetro mayor de 500 μm) de baja resistencia. La porción media la representan las prearteriolas (entre 500 μm y 100 μm) y la distal las arteriolas (menor de 100 μm), ambas responsables de un 70% de la caída de presión de perfusión¹⁸⁻¹⁹. Durante la sístole las arterias coronarias aumentan su contenido sanguíneo en un 25% adquiriendo energía elástica. En diástole esta energía se transforma en energía cinética que determina la reapertura de los vasos distales. Las prearteriolas serían las encargadas de mantener una presión de perfusión dentro de unos límites adecuados y las arteriolas, a su vez, determinarían el flujo en función de las demandas metabólicas. Así pues la perfusión miocárdica está limitada a la diástole, donde la presión de perfusión es la diferencia de presión entre la raíz de la aorta y la del seno coronario (o intraventricular en las venas de Tebesio); cuando esta presión está por debajo de 50 mmHg cesa la circulación coronaria (presión de flujo cero). Aunque en el corazón parado la conductancia de los vasos subendocárdicos es mayor, en el corazón latiendo se invierte debido a la presión intraventricular y a una mayor compresión de la masa ventricular. Sin embargo el ajuste vasomotor de los vasos subendocárdicos permite satisfacer las necesidades metabólicas que en este estrato son siempre mayores. El estrato subepicárdico tiene una función reguladora

sobre el subendocardio, de modo que la vasoconstricción selectiva mejoraría la perfusión subendocárdica²⁰.

El tono de las arterias coronarias es dinámico y responde a múltiples factores. Uno de ellos sería los cambios de flujo coronario en las arterias coronarias y en las prearteriolas proximales donde es fundamental mantener constante la tensión de cizallamiento (shear stress) ²¹. En este mecanismo participarían múltiples sustancias pero la principal sería el óxido nítrico con una menor participación de las prostaciclina. Otro factor sería los cambios de presión de perfusión. Así pues para un determinado nivel de consumo metabólico miocárdico, se mantendría el flujo adecuado en un rango amplio de presiones, de forma general entre 60 a 140 mmHg. Este mecanismo de autorregulación es principalmente miogénico donde estaría implicado probablemente un canal catiónico no selectivo ²².

La circulación coronaria es capaz de adaptar rápidamente el flujo sanguíneo, mediante cambios en el tono vascular, satisfaciendo cualquier demanda metabólica (pudiendo incrementar el aporte de O₂ hasta en cinco veces el consumo basal). Así pues a medida que las demandas metabólicas aumentan, el tono vascular disminuye, respuesta denominada hiperemia funcional. La hiperemia es máxima en situaciones donde el flujo no es capaz de satisfacer las demandas metabólicas produciendo isquemia. En esta respuesta el principal responsable es la adenosina, producto de la degradación del monofosfato de adenosina cuando no es posible sintetizar más ATP, a través del receptor A₂ ²³.

Los determinantes fundamentales del consumo de oxígeno miocárdico son: la frecuencia cardíaca, la postcarga, el estado de inotropismo cardíaco y la precarga. De estos cuatro los más importantes son la frecuencia cardíaca y la postcarga, por lo que la primera derivada del

doble producto de la frecuencia cardiaca por la tensión arterial sistólica es un indicador fiable del nivel de consumo miocárdico ²⁴.

La reserva de flujo coronario ²⁵, cociente entre el flujo coronario cuasi máximo y el flujo en reposo, es un indicador fiable de la función de la circulación coronaria y depende del flujo sanguíneo basal, el área vascular por unidad de volumen miocárdico, la resistencia y la presión de perfusión. De forma general se admite que la reserva de flujo coronario normal se establecería por encima de 2 a 2,5. Así por ejemplo la reducción del diámetro de una arteria coronaria añadiría un aumento de resistencia en serie al flujo coronario. Los mecanismos de preservación del flujo compensarían la caída de la presión de perfusión hasta que se alcanzase una reducción del calibre en un 50%. A partir de dicha cifra se reduciría la reserva de flujo coronario hasta una reducción del calibre de al menos 80% donde la reserva de flujo coronario sería de 1 ²⁶. Además de la reducción fija del diámetro luminal de las arterias coronarias epicárdicas habría otros factores que podrían contribuir a la reducción del flujo tal como serían el vasoespasmio sobre placa (no oclusivo, a diferencia de la angina vasoespástica), la disfunción de la microcirculación coronaria, el incremento de la presión telediastólica o la reducción del contenido de oxígeno en la sangre²⁷.

Es por todo ello que para el tratamiento óptimo de la cardiopatía isquémica son necesarios más elementos de juicio que la mera evaluación de la reducción del calibre de un vaso coronario. Así pues se han desarrollado varias técnicas diagnósticas para evaluar la reserva de flujo coronario y así revascularizar sólo las lesiones que originan un deterioro funcional más que anatómico. Entre ellas se encontraría la reserva fraccional de flujo (FFR), la reserva de flujo coronario (CFR) y el índice de resistencia microcirculatoria (IMR). La técnica de evaluación de la FFR es la más sencilla de todas y resulta del cociente entre la presión distal a

la estenosis y la presión en la raíz aórtica en hiperemia máxima obtenida generalmente mediante la administración de adenosina.

Las otras dos determinaciones requieren de la cuantificación del flujo coronario mediante una técnica de termodilución (tiempo de tránsito) donde la CFR resultaría del cociente del flujo hiperémico máximo y el basal y el IMR del cociente de la presión distal a la estenosis entre la inversa del flujo en hiperemia máxima ²⁸.

La isquemia produciría cambios estructurales y funcionales en el miocito que finalizarían con la necrosis cuando ésta es intensa y prolongada. Cuando la isquemia es reversible y de breve duración la región afecta va a ser más resistente a subsecuentes episodios, fenómeno conocido como preconditionamiento isquémico ²⁹. Cuando los episodios son de más duración, la normalidad de la función tarda en recuperarse indefectiblemente en un tiempo variable (aturdimiento) ³⁰ mientras que cuando la isquemia es mantenida pero no de suficiente magnitud para conducir a la necrosis, como por ejemplo en una estenosis coronaria crítica, la recuperación funcional tras la revascularización es posible (miocardio hibernado) ³¹.

Como se comentaba con anterioridad el desarrollo de colaterales es un mecanismo fisiológico que intenta mitigar los efectos deletéreos de la isquemia miocárdica. Hay tres procesos principales en el desarrollo vascular (neoangiogénesis) ¹⁷: la arteriogénesis, la vasculogénesis y la angiogénesis. De los tres, la arteriogénesis es el más importante y consiste en la potenciación de las pequeñas colaterales (de 20 a 100 μm) que se encuentran en el corazón humano, al igual que en otras especies. Esta potenciación estaría estimulada por el desarrollo de gradientes de presión así como por factores químicos derivados de la isquemia y

comenzaría en las primeras horas tras la isquemia, finalizando en un plazo de unas 12 semanas con la presencia de colaterales que pueden alcanzar hasta 1 mm de diámetro. En la arteriogénesis habría una proliferación celular con el fin de incrementar tanto el diámetro luminal como la resistencia del vaso a diferencia de los otros dos procesos donde se desarrollarían nuevos vasos ³².

Las consecuencias clínicas de la isquemia aparecen en una secuencia bastante predecible conocida como “cascada isquémica” y comenzaría con los efectos metabólicos observándose precozmente un aumento en la concentración de H⁺ y K⁺ extracelular. Se continuaría con los efectos funcionales con pérdida de la relajación-contractilidad en el territorio donde el flujo se viese comprometido, le seguiría las alteraciones eléctricas y finalizaría con la estimulación nociceptiva ³³.

El diagnóstico de la cardiopatía isquémica estable es eminentemente clínico y las distintas pruebas diagnósticas adicionales ayudan a confirmar el diagnóstico en casos dudosos y a establecer el riesgo de eventos en el futuro.

El tratamiento general de la cardiopatía isquémica presentaría tres pilares fundamentales:

-El primero sería la modificación del estilo de vida con reducción del peso en caso de sobrepeso u obesidad, la adquisición de una dieta cardiosaludable (mediterránea), el abandono del hábito tabáquico y de la vida sedentaria.

- El segundo consistiría en el tratamiento médico para la optimización de los factores de riesgo cardiovascular, la reducción de los eventos cardiovasculares y el alivio sintomático.

-El tercero y último sería el tratamiento revascularizador, bien percutáneo o bien quirúrgico en aquellos casos de angina refractaria o con un riesgo de eventos cardiovascular (muerte o infarto no fatal) mayor del 3% anual.

Las guías actuales de práctica clínica definen la angina refractaria como una condición crónica caracterizada por la presencia de isquemia inducible y angina que no puede ser adecuadamente controlada con tratamiento médico, angioplastia o cirugía. En este grupo de pacientes se podría considerar como opciones terapéuticas según las guías europeas de práctica clínica (indicación IIb): la contrapulsación externa (enhanced external counterpulsation) con un nivel de evidencia B, la neuroestimulación eléctrica transcutánea (transcutaneous electrical nerve stimulation) con un nivel de evidencia C y la estimulación de la médula espinal (spinal cord stimulation) con un nivel de evidencia B. Otras alternativas o están contraindicadas, como son la revascularización transmiocárdica con láser bien quirúrgica bien percutánea, o están en fase de experimentación como sería la terapia celular o la oclusión del seno coronario ³⁴ **(Figura2)**.

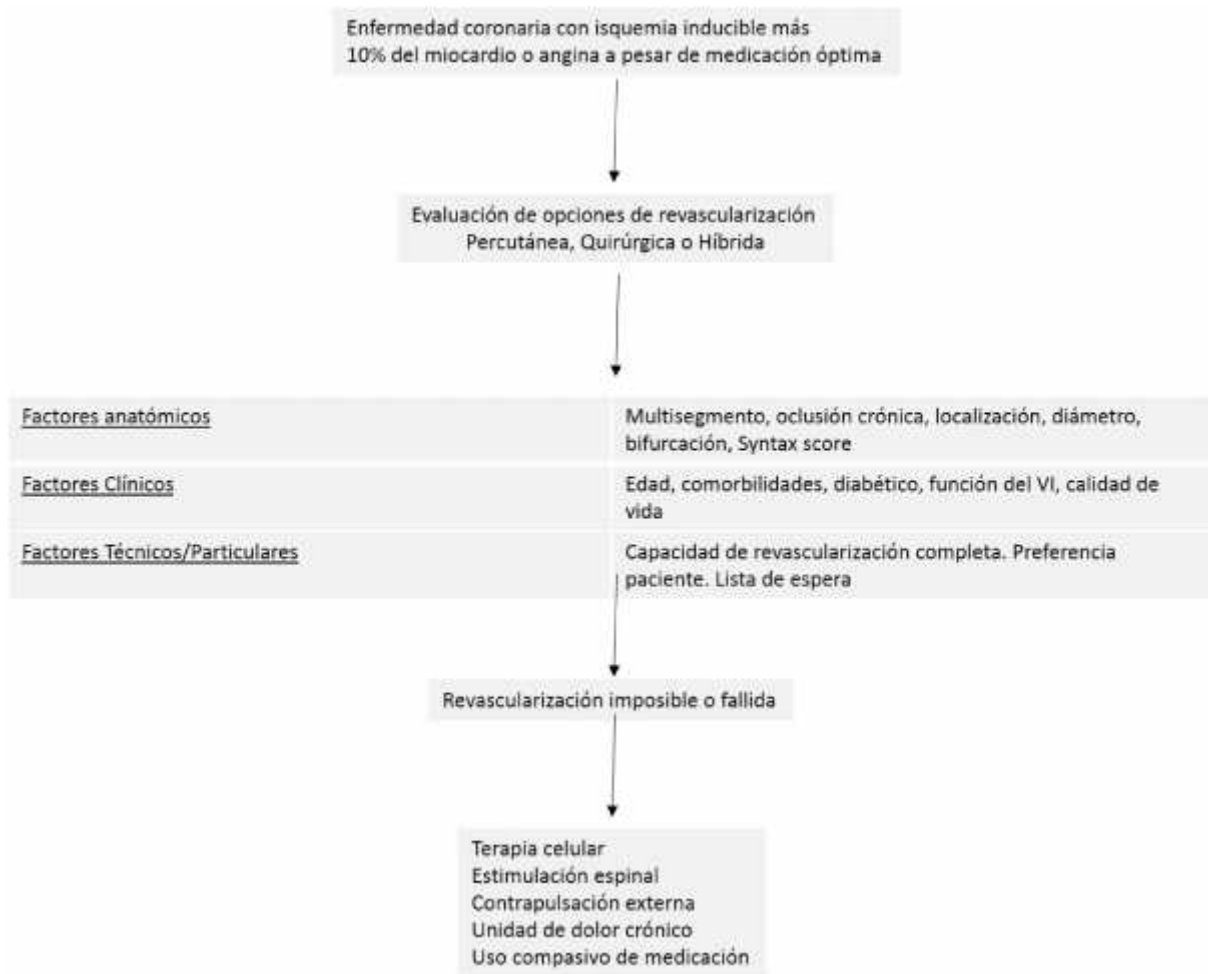


Figura 2. Estrategia global de intervención en la enfermedad coronaria estable con isquemia inducible demostrada.

Concepto de *Cluster of Differentiation*

Las moléculas de la superficie o del interior celular permiten, mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos, identificar el tipo celular, su estado de diferenciación y actividad. Los anticuerpos monoclonales específicamente elaborados van a reconocer regiones específicas (epítomos) de estas moléculas o antígenos. Estas moléculas generalmente tienen una función definida como ser receptores de factores de crecimiento, citoquinas, mediar en la adhesión endotelial o la intercomunicación celular, etc. Mediante un procesamiento posterior (p. ej. inmunofluorescencia) se va a poder reconocer por distintos métodos de análisis, principalmente mediante citometría de flujo o microscopía confocal, que este antígeno se encuentra en la muestra celular estudiada (**Tabla 1**).

Las grandes discrepancias encontradas a la hora de tipificar las células hematológicas en las distintas enfermedades oncohematológicas con los métodos histológicos previos, eminentemente morfológicos, hicieron necesario desarrollar este tipo de identificación celular. Así en 1982 en París³⁵ se estableció el uso de anticuerpos monoclonales para la identificación de linfocitos y otras células hematológicas. Un antígeno era tipificado como CD si dos anticuerpos monoclonales reaccionaban con dicho antígeno con unos estándares de calidad prefijados. Si sólo se observaba positividad con un anticuerpo o se observaba alguna incongruencia se añadía el valor w (CDw) de provisional. A cada demarcación CD le sigue un número en función de criterios taxonómicos. Un factor de determinación puede encontrarse en distintas células y en una misma célula puede expresarse de forma variable en función de su diferenciación o su actividad como se refería al inicio del capítulo. El uso de un conjunto de factores de determinación puede identificar de una forma muy específica y sin ambigüedades

a un tipo celular, a este conjunto se le define como inmunofenotipo celular ³⁶. La tipificación es esencial para el estudio de células madre, para poder diferenciar su estirpe y su estado de maduración. No obstante no es infrecuente que el inmunofenotipo varíe a lo largo de tiempo al encontrarse nuevos antígenos, al refinarse los métodos previos y al implementarse nuevos métodos de reconocimiento. Esto es particularmente cierto para las células madre/progenitoras endoteliales como se verá más adelante.

CD	Nombre alternativo	Ligando	HSC marcador	EC marcador	Función
CD14	LPS-receptor	LPS	+	-	Media respuesta al liposacárido bacteriano (LPS). Expresión de diferenciación mieloide.
CD31	PECAM1	Glucosaminoglicanos	+	+	Adhesión/Migración
CD34	HPCA1	L-selectina	+	+	Adhesión
CD44	H-CAM	Metaloproteasas	-	+	Adhesión y Migración
CD45	LCA	Quinasas	+	-	Regulador linfocitos (crecimiento/diferenciación)
CD90	Thy-1	CD45	+	+	Adhesión
CD133	Prominin-1		+	-	Supresión de la diferenciación
CD117	C-kit	Quinasas	+	-	Receptor tirosin quinasa (supresión, activación, proliferación y quimiotaxis)
CD135	Flk2	Fl3ligando	+	-	Supervivencia/Proliferación/ Diferenciación especialmente linfocitos
CD138	Syndecan-1	Fibronectina	+	+	Proliferación/migración/ Interacción matriz
CD309	VEGFR2	VEGF	+	+	Angiogénesis y regulador permeabilidad vascular
Sca-1	Ly-6 A/E	-	+	-	Autorregulación de progenitores hematológicos. Inhibición de proliferación/diferenciación de linfocitos T

Tabla 1. Muestra los factores de determinación (CD) y marcadores de superficie que constituyen el inmunofenotipo de las células madre hematopoyéticas (HSC) y células endoteliales adultas (EC).

Las células endoteliales en las enfermedades cardiovasculares

Las células endoteliales tapizan la luz de todos los vasos sanguíneos y linfáticos, en su conjunto llegan a pesar un kilo y medio y representan un área de 600 m². Su función así como la integridad de las uniones intercelulares son esenciales para la correcta homeostasis vascular y, lo que es más importante, de todos los tejidos. Histológicamente son planas, de poco diámetro y núcleo pequeño. Característicamente presentan un gran número de vesículas cerca de la membrana, las vesículas picnócíticas o los cuerpos de Weibel-Palade que almacenan el factor de von Willenbran, P-selectina, interleucinas, etc. El endotelio no sólo regula el paso de sustancias a los tejidos acorde con sus necesidades también modula la respuesta inflamatoria y trombótica. Desde el punto de vista inmunohistoquímico se caracterizan por ser positivas a múltiples factores de dominio (CD) –principalmente CD34, CD31 y CD309-, además de captar la LDL acetilada o fijar la lecitina del *Ulex europaeus*, técnicas empleadas para evaluar de forma adicional su funcionalidad.³⁷

Embriológicamente proceden de la capa mesodérmica, específicamente de los hemangioblastos o con menor importancia de las células madre de la región aórto-gonadomesonéfrica. En el adulto es universalmente reconocido que existen células madre que contribuyen al mantenimiento de la celularidad endotelial y que participan en la creación de nuevos vasos, cuestión fisiopatológica incuestionable en procesos tales como el cáncer o la isquemia tisular. En 1997 Ashara et al.³⁸ demostraron que en la sangre periférica se encontraban células madre hematopoyéticas que participaban en la angiogénesis y en la reparación tisular. Inicialmente se afirmó que estas células en su conjunto eran responsables de tal asombroso mérito pero investigaciones posteriores determinaron que su capacidad proliferativa era escasa y que dentro de este grupo celular existirían varios subgrupos con

calidades diferentes entre las que se encontrarían células de estirpe mieloide-monocítica que podían mostrar transitoriamente rasgos fenotípicos de células endoteliales sin ser células madre o células endoteliales en distinto grado de diferenciación.

Los progenitores endoteliales de médula ósea, como se verá más adelante, son también un grupo heterogéneo de células. Además aún no es posible definir con total exactitud que es una célula madre o progenitora endotelial (EPC). La definición antigua “aquella que comparte fenotipo endotelial y hematopoyético” no es del todo acertado, como veíamos antes, y en la actualidad sería más apropiado definirla como aquella que puede formar colonias de clones endoteliales. En cualquier caso la mayor parte de los autores coinciden en que las células madre endoteliales mostrarían al menos los siguientes marcadores: c-kit+ y VEGFR2 +.

El cultivo in vitro de la fracción mononuclear de sangre periférica centrifugada y mantenida en un medio endotelial permitiría distinguir dos tipos de EPC **(Figura 3)**³⁹:

- EPC precoces, donde la diferenciación endotelial se observaría a los 4-7 días de cultivo. Morfológicamente adquirirían forma de huso y presentarían una inmunohistoquímica bastante heterogénea, destacando los marcadores endoteliales como el VEGFR2, la VE-cadherin o el CD133 y mieloides como el CD14 o el CD45. Su capacidad proliferativa y proangiogénica sería limitada pero tendrían una alta capacidad secretora. In vitro desaparecerían a las 4 semanas.
- EPC tardías, donde se observaría diferenciación endotelial a las 2-3 semanas en cultivo. Morfológicamente con un citoplasma más homogéneo pueden tapizar en forma de empedrado la placa (como las células endoteliales derivadas de cordón –HUVEC-). En su inmunofenotipo disminuiría la expresión de marcadores mieloides como el CD14 o

el CD45 y aumentaría la expresión de marcadores de células endoteliales adultas. Este subgrupo presentaría una alta capacidad proliferativa pero con menor capacidad “angiocrina”.

Mayor importancia están adquiriendo las células endoteliales residentes o EPC vasculares, que se encontrarían en cualquiera de las tres capas vasculares (intima, media, adventicia). Actualmente se admite que las mismas tendrían un papel esencial en el proceso de reparación y regeneración vascular con participación de otras células madre residentes de otras estirpes como las mesenquimales y por supuesto de las células madre procedentes de médula ósea.

En este contexto se postula que la acción principal de las células madre endoteliales circulantes sería fomentar las capacidades innatas de las células madre residentes (vide infra) mediante: la liberación de sustancias que se secretan como citoquinas, factores de crecimiento o quimiocinas, de moléculas de membrana (*shedome*) como los proteoglicanos de heparán sulfato transmembrana o sindecanes, mediante la fusión celular, la formación de túneles nanométricos para la transferencia de organelas celulares (p. ej. mitocondrias) o de microvesículas (vesículas rodeadas de membrana plasmática que contendría proteínas, RNA mensajero y microRNA).

Tanto el envejecimiento como los factores de riesgo cardiovascular clásicos, principalmente la diabetes o la insuficiencia renal son causas conocidas de disminución de la concentración de progenitores endoteliales circulantes y de las capacidades de proliferación, migración, diferenciación o supervivencia de las mismas. Varios grupos han observado una deficiencia en la expresión del gen Sirtuina-1 (SIRT1) como responsable

principal de la disfunción de las EPC. Los genes que codifican Sirtuinas están evolutivamente muy preservados y en el ser humano se reconocen hasta 7 tipos distintos. Las proteínas codificadas actuarían principalmente como enzimas deacetiladoras o ADP ribosiltransferasas, dependientes de nicotinamida (NAD). Su papel biológico más plausible sería dar respuesta a estresores o tóxicos limitando la capacidad proliferativa o la supervivencia celular además de modificar significativamente el metabolismo en general.

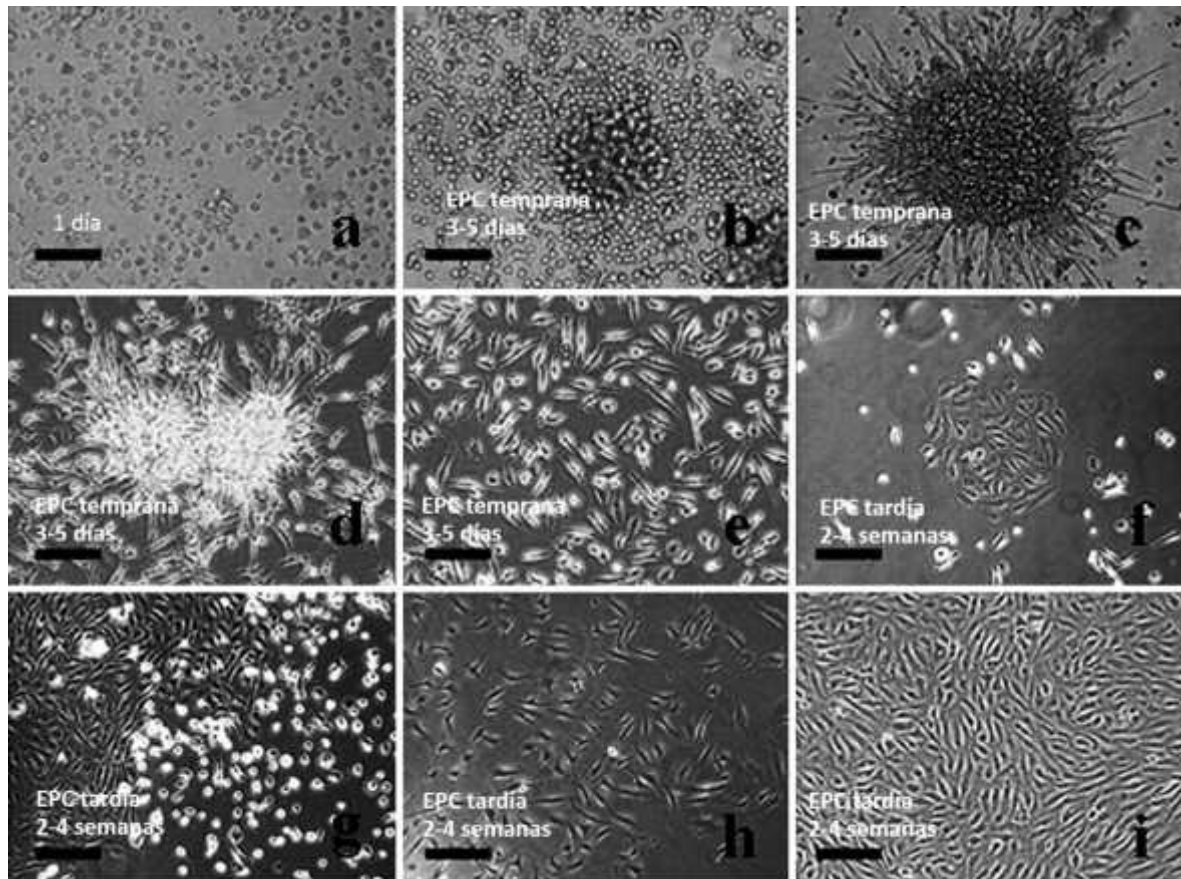


Figura 3. Cambios secuenciales del cultivo en placa (medio endotelial) de la fracción mononuclear de sangre aislada y centrifugada. La imagen **a** muestra la morfología en el primer día tras el cultivo. Las imágenes **b** a **e** muestran distintas etapas de las células progenitoras tempranas, idénticas a las mostradas en el trabajo original de Ashara et al.³⁸ Las imágenes **f** a **i** muestran las células progenitoras endoteliales tardías con la imagen típica en empedrado en fases avanzadas de proliferación y adherencia.³⁹

Introducción a la terapia celular en el campo de la Cardiología

Las células madre son aquellas que presentan la capacidad de auto-regenerarse y diferenciarse a formas maduras. El termino auto-regeneración hace referencia a la capacidad de proliferar sin obligación a diferenciarse o envejecer.

Las células madre pueden tener diversos grados de capacidad de diferenciación o potencia; así pues aquellas que pueden diferenciarse a cualquier tipo celular tanto de tejido embrionario como de tejido extraembrionario (membranas) se denominarían totipotenciales. Estas células son, por tanto, el ovocito recién fecundado o las constitutivas de la mórula embrionaria. Las células pluripotenciales se podrían diferenciar a cualquier célula de cualquier línea germinal y serían tanto las células madre embrionarias como las células pluripotentes inducidas –iPS (**Figura 4**)⁴⁰ -; mientras que las que sólo pueden diferenciarse a cualquier célula de un tipo solo de línea germinal (endodermo, mesodermo o ectodermo), como serías las células madre adultas, se denominan multipotenciales. Las células madres adultas se localizarían en casi todos los órganos y serían responsables del mantenimiento-reparación de los mismos, esta propiedad iría declinando con el envejecimiento y no sería uniforme en todos los órganos.⁴¹⁻⁴²

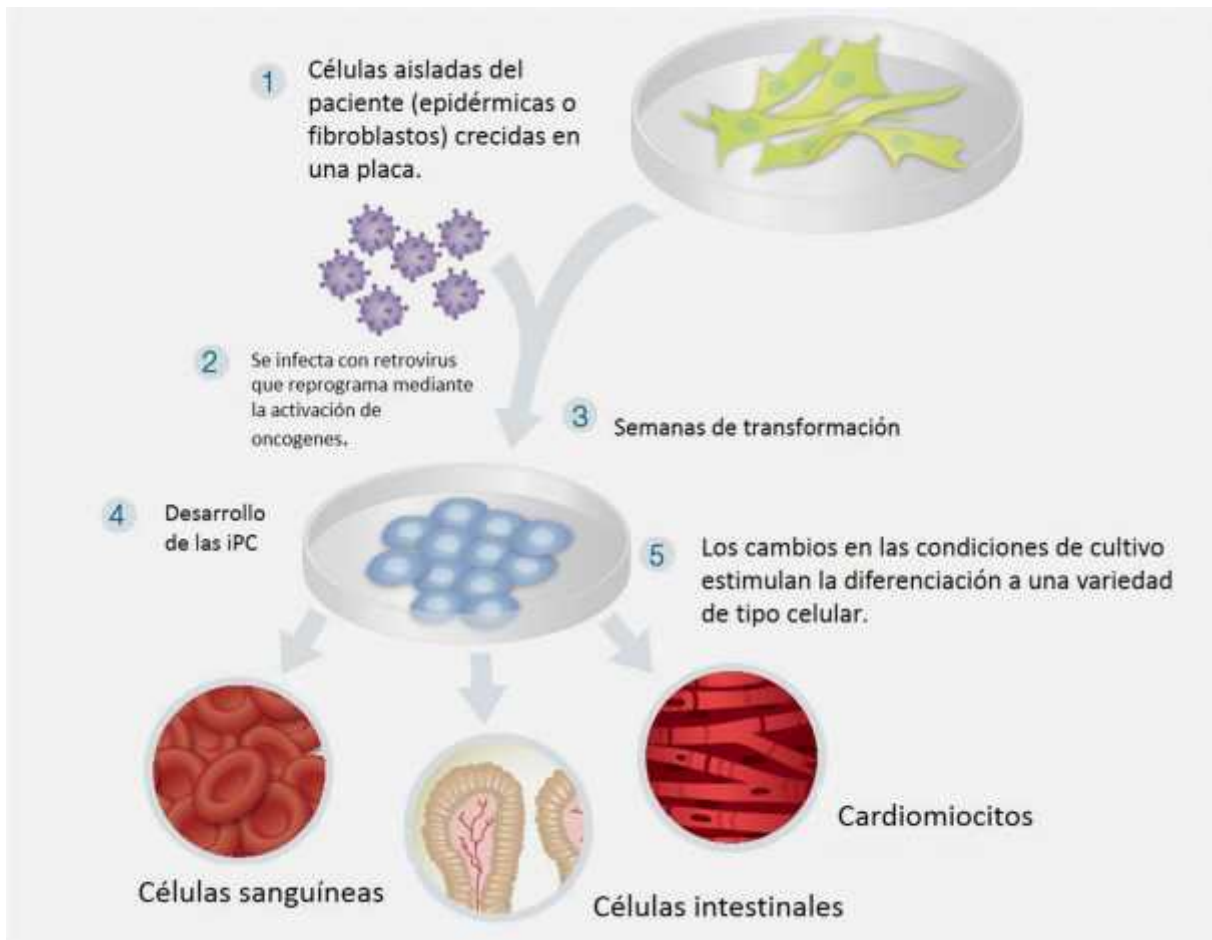


Figura 4. Mecanismo más frecuentemente empleado para generar células madre embrionarias a partir de células somáticas adultas –iPC-. La transferencia a través de vectores virales de factores transcripción que modificaban la expresión genética, principalmente *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4*, induce la transformación de células madre pluripotenciales similares a las células embrionarias.⁴⁰

La aplicación en la práctica clínica de la terapia celular, que ya se inició en los años 60 con el trasplante de médula ósea ⁴³, ha ido creciendo de una forma trepidante en los últimos años y de una forma notable en la especialidad de la cardiología. En esta esfera los estudios experimentales iniciales fueron francamente ilusionantes pero los estudios clínicos han sido discrepantes generando nuevas hipótesis e interrogantes (mecanismos de acción, seguridad, técnica, etc.) ⁴⁴ que de nuevo la investigación básica y nuevos diseños clínicos tendrán que resolver.

La reparación cardiaca por células madre es un fenómeno recurrentemente documentado en la literatura científica, tanto por células madre residentes como por células circulantes cuyo origen principal sería la médula ósea (**Figura 5**). Dos trabajos pioneros demuestran este hecho: en el primero Quaini y sus colaboradores⁴⁵ demostraron la presencia de células madre, sin los marcadores clásicos de células madre de médula ósea, en el corazón donante con los mismos cromosomas sexuales que el sexo donante y células madre con los mismos cromosomas sexuales del receptor (presencia de cromosoma Y en el corazón donado por una mujer). En el segundo Deb y su equipo⁴⁶ observaron la presencia de cardiomiocitos con cromosoma Y en mujeres que se habían sometido a un trasplante de médula ósea de donante varón.

Beltrami y colaboradores⁴⁷ describieron por primera vez la existencia de células madre residentes en el corazón, células caracterizadas por no mostrar los marcadores clásicos de las células madre procedentes de médula ósea (CD34 y CD45) y sí el receptor del factor de crecimiento de las células madre c-kit. Estas células c-kit⁺ se podrían diferenciar tanto a células

endoteliales adultas como cardiomiocitos o células de músculo liso. Sin embargo su densidad y su capacidad regenerativa eran bajas.

El camino de la terapia celular para limitar las consecuencias del infarto de miocardio, la cardiomioplastia celular, lo iniciaron Orlic y sus colaboradores en 2001⁴⁸ con la publicación del beneficio experimental de las células madre en modelos experimentales murinos. Posteriormente han sido múltiples los estudios experimentales y clínicos que han enfatizado la capacidad regeneradora de múltiples tipos de células madre:

1. Células madre embrionarias, células con una gran potencia pero inmunogénicas y con la posibilidad de formar teratomas amén de los problemas éticos que genera su consecución.
2. Mioblastos, con una gran capacidad de proliferación, diferenciación y anidamiento sobre una escara pero con escaso acoplamiento eléctrico y con riesgo arrítmico.
3. Los progenitores mesenquimales, endoteliales o de médula ósea (en su fracción mononuclear se encontrarían células madre hematopoyéticas, mesenquimales, endoteliales y la subpoblación "side population cell" que exhibe un patrón de fluorescencia particular con el contraste de ADN Hoechst 33342) han sido los más empleados, con mejor perfil de seguridad pero con una gran heterogeneidad en cuanto a sus beneficios clínicos.⁴⁹

Mención especial merecen las células progenitoras cardíacas, en el párrafo anterior se hacía mención a las mismas con marcador c-kit +, pero se han encontrado variantes como las Sca-1+ o el factor de transcripción de células pancreáticas Islet-1. Son muchos los estudios

experimentales que han mostrado un gran potencial terapéutico y en los últimos años se han desarrollado ensayos en humanos con resultados prometedores.

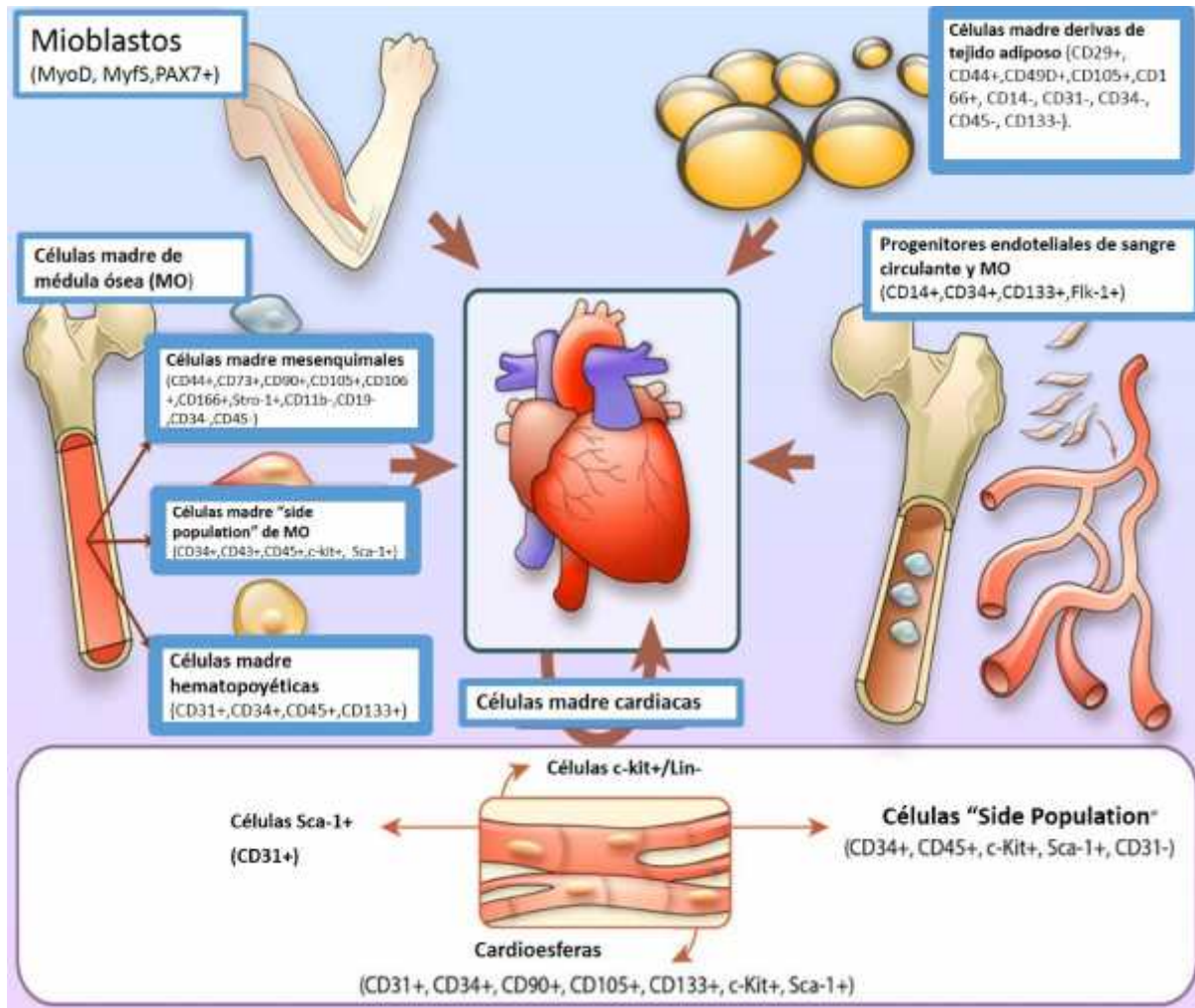


Figura 5. Fuentes de células madre adultas más empleadas para la terapia celular en las enfermedades cardíacas. Sin duda la médula ósea es la más usada bien directamente, con la capacidad de obtener células madre mesenquimales, hematopoyéticas clásica o su variante "side population", bien mediante la recolección de sus progenitores circulantes en sangre periférica. Los mioblastos del músculo estriado son menos empleadas en la actualidad y cobran protagonismo las células madre derivadas del tejido adiposo (principalmente mesenquimales) o las células madre cardíacas residentes.⁴⁹

El mecanismo de acción de las células madre es complejo y aún no comprendido en su totalidad. Existen varias hipótesis pero no han sido homogéneamente demostradas en los distintos estudios experimentales realizados hasta la fecha.

De todos los mecanismos el más controvertido versa sobre la capacidad de diferenciación (transdiferenciación) de las células madre. Experimentalmente se ha demostrado, sin lugar a dudas, la diferenciación de los mioblastos en miocitos esqueléticos sin expresión de genes específicos cardiacos. La transdiferenciación de las células derivadas de médula ósea, de los progenitores endoteliales o de las células madre mesenquimales a cardiomiocitos se pone en duda al igual que su potencial efecto proliferativo mediante la fusión con cardiomiocitos. La capacidad de diferenciación de las células madre cardiaca está limitada y hasta la fecha sólo se ha observado la evolución a cardiomiocitos inmaduros que no alcanzan el fenotipo adulto, demostrándose además que la capacidad regenerativa sería mayor en el contexto de la isquemia miocárdica aguda que en las fases crónicas.

Otro mecanismo beneficioso de las células madre, y menos controvertido, sería la promoción del desarrollo vascular para disminuir la isquemia tisular, principalmente explorado con los progenitores CD34+. De todos los mecanismos el paracrino es quizás el más importante, mediante la liberación de citoquinas (factor 1 derivado de las células del estroma), factores de crecimiento (IGF-1, HGF, VEGF), exones o micropartículas. De este modo estas células podrían fomentar respuestas favorables en el proceso de reparación tisular como serían la activación de los progenitores in situ, la neovascularización, la inhibición de la apoptosis, la modulación de la hipertrofia o el control favorable en la nueva constitución de la matriz extracelular.

Existen varios abordajes para administrar la terapia celular (liberación):

- Métodos indirectos: la liberación intracoronaria consigue una distribución más homogénea sobre las áreas a tratar pero con un porcentaje de anidamiento bajo, la posibilidad de oclusión microvascular (principalmente con células de gran tamaño como los mioblastos o las mesenquimales) y la imposibilidad de liberarlas en áreas con oclusión coronaria. Ha sido empleada principalmente en el infarto agudo de miocardio.
- Métodos de administración directa, como son la quirúrgica (transepicárdica) o percutánea (transendocárdica), han sido las más utilizadas en el escenario de la cardiopatía isquémica crónica. Presentan la ventaja de poder liberar la terapia de forma precisa en las zonas objetivo, localizada con un mapeo electroanatómico o mediante visualización directa, independientemente de la anatomía coronaria. Sin embargo produce anidamientos parcheados donde las condiciones locales de Ph y nutrientes condiciona en gran parte la capacidad de supervivencia de las mismas.

Por último son varios los riesgos, ciertos o potenciales, de la terapia celular. Entre ellos encontraríamos la proarritmia (mioblastos o progenitores CD133+), la potenciación de desarrollo ateromatoso (progenitores endoteliales), lesiones tumorales o diferenciación aberrante (embrionarias) y el daño a la microcirculación con las liberaciones intracoronarias. ⁵⁰

Terapia Celular mediante el trasplante de células madre procedentes de la Medula Ósea: selección de progenitores endoteliales

En los últimos años se ha estudiado en profundidad la medula ósea como una fuente prometedora de células madre adultas para regenerar un área dañada del corazón ⁵¹ constituyendo el tipo celular más ampliamente utilizado en este campo. Ensayos experimentales han demostrado que las células madre derivadas de la médula ósea tienen la capacidad de transdiferenciarse a células nerviosas⁵², hepatocitos⁵³, células endoteliales ⁵⁴ y cardiomiocitos ⁵⁵⁻⁵⁶. En el campo terapéutico se puede emplear la masa celular global (no seleccionada) o bien la fracción mononuclear (seleccionada). A este respecto son varios los estudios preclínicos⁵⁷ que han puesto de manifiesto que la inyección directa de células madre derivadas de la fracción no seleccionada en tejidos isquémicos es segura⁵⁸, induce angiogénesis terapéutica ^(38,59-62) y aumenta la perfusión del miocardio isquémico. Por otro lado la fracción seleccionada o mononucleada de la médula ósea, bastante heterogénea, está compuesta de células mesenquimales, células progenitoras hematopoyéticas, células progenitoras endoteliales y otras líneas celulares más diferenciadas como son los linfocitos *natural Killer*, linfocitos T o linfocitos B. Por ello, algunos investigadores han empleado una fracción celular enriquecida como son la selección de las células mesenquimales⁶³ o las células progenitoras endoteliales.

La médula ósea adulta humana contiene precursores endoteliales con características funcionales y fenotípicas de los hemangioblastos embrionarios. Estas células se caracterizan por la capacidad de circular, proliferar y diferenciarse a células endoteliales maduras ⁶⁴⁻⁶⁶.

Además, expresan el receptor 2 del factor de crecimiento endotelial (VEGFR-2 o flk-1) y poseen un alto potencial proliferativo mediante la formación de colonias en respuesta al factor de crecimiento endotelial (VEGF) ⁶⁷⁻⁷⁰. Estas células progenitoras endoteliales han sido aisladas mediante la punción directa de la médula ósea o de la circulación periférica y pueden ser identificadas entre otros, mediante el análisis de la expresión del marcador de membrana CD34. Existe una subpoblación de las células CD 34+ que expresa el marcador CD133. El CD133 o prominina-1 (**Figura 6**) es un polipéptido 120-kd glicosilado que contiene 5 dominios transmembrana con un residuo N extracelular y un residuo C citoplasmático, codificado por un gen ubicado en el cromosoma 4p15 ⁷¹⁻⁷². Su función exacta no es conocida pero su distribución en zonas concretas de la membrana celular de tipos celulares de morfología compleja como las células epiteliales intestinales o las neuronas hacen probable que se trate de algún regulador de la composición y la topología de la membrana celular. Por otro lado se ha demostrado que las células CD133+ humanas pueden repoblar la médula ósea en un modelo ovino ⁷³ y por tanto pueden ser consideradas como células madre hematopoyéticas pluripotenciales. Así, la expresión del marcador CD 133 disminuye cuando estas células se diferencian en células maduras postmitóticas. De hecho, las células hematopoyéticas diferenciadas que incluyen la serie mieloide madura, los megacariocitos, eritrocitos y la serie linfoide que están totalmente diferenciada no expresan el marcador CD133, al igual que las células endoteliales maduras. Por tanto, es plausible que la prominina-1 tenga una función de supresión sobre la diferenciación celular.

El subgrupo de células CD34 positivas que expresan CD133 constituye una población de células progenitoras endoteliales y células madre hematopoyéticas inmaduras ⁷⁴⁻⁷⁵. Las células CD133+ se pueden aislar tanto a partir de médula ósea como de sangre periférica movilizada

con G-CSF. Las células que expresan el marcador CD133 sólo constituyen el 0.4% del total de la población de las células CD 34+, 0.002% de la fracción mononucleada de la médula ósea. Sin embargo con la movilización mediante la administración de G-CSF se incrementa el número de células CD 133 al 2%, es decir un 0.02% de las células monucleares movilizadas. Finalmente se ha demostrado que las células que expresan el marcador CD 133 pero son CD34 negativas podrían ser precursoras de la subpoblación CD34 y CD133 positivas, funcionalmente más potentes en el anidamiento y en la reparación vascular ⁷⁵⁻⁷⁹.

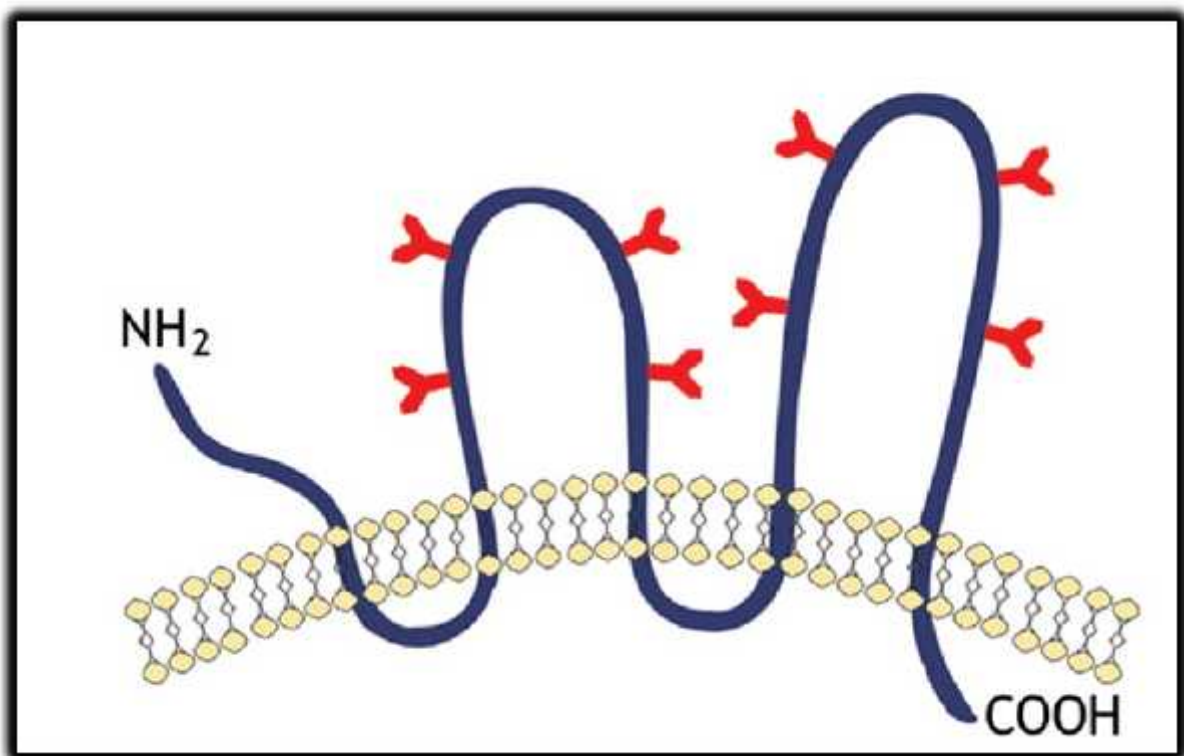


Figura 6. Representación esquemática de la glicoproteína transmembrana CD133. Esta proteína tendría un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal citoplasmático. Se encontrarían dos lazos pequeños intracelulares ricos en cisteína y dos grandes extracelulares con cuatro sitios potenciales para la N-glicosilación en cada uno.⁷⁷

Inyección transendocárdica con un sistema de mapeo electromecánico (NOGA)

El sistema NOGA (Biosense-Webster, Diamond Bar, California) es un sistema de navegación no fluoroscópica que permite tanto la reconstrucción tridimensional del corazón como elaborar mapas de actividad eléctrica y mecánica. Mediante la creación de un campo electromagnético débil y un sensor pasivo localizado en la punta del catéter se puede conocer en todo momento la posición del catéter. Al producirse perturbaciones electromagnéticas con el movimiento del catéter en el interior de las cavidades cardiacas se puede determinar la posición tridimensional de la punta con un nivel de precisión espacial muy alto.

Brevemente, el mapeo electromecánico del ventrículo izquierdo mediante este sistema no difiere del procedimiento a realizar cuando se emplean otros sistemas de navegación no fluoroscópica utilizados en la electrofisiología cardiaca. Los mapas se elaboran mediante la adquisición de múltiples puntos de la superficie endocárdica ventricular izquierda sincronizando la adquisición con una derivación del electrocardiograma de superficie (generalmente QRS) o una señal eléctrica interna de referencia con el fin de establecer el tiempo de activación. En el sistema NOGA se utiliza un campo magnético de baja intensidad (10^{-5} – 10^{-6} teslas) que es generado por una plataforma magnética triangular colocada por debajo del paciente. El sistema no sólo localiza la punta del catéter con una precisión de 1 mm, también determina la orientación de la punta del catéter dentro del ventrículo izquierdo, esencial para el proceso de inyección.

Estas reconstrucciones tridimensionales permiten la identificación de zonas viables del corazón al integrar la información mecánica y eléctrica de cada punto. Así pues zonas con menor engrosamiento y con voltajes normales se considerarían viables y por lo tanto objetivos de intervenciones terapéuticas con células madre ⁸⁰. Este sistema, ha sido utilizado ampliamente como sistema de ayuda para la liberación tranendocárdica de factores de crecimiento ⁸¹, genes recombinantes ⁸²⁻⁸³ y células madre ⁸⁴⁻⁸⁵ tanto en humanos como en modelos animales demostrando un excelente perfil de seguridad.

El sistema NOGA utiliza un algoritmo para analizar la contractilidad puntual al establecer la posición de la punta tanto en sístole como en diástole. Ese movimiento es posteriormente comparado con el movimiento de los puntos vecinos en el área de interés. El valor resultante, denominado acortamiento lineal local o Lineal Local Shortening (LLS) es expresado como un porcentaje y es representativo de la función mecánica del ventrículo izquierdo en ese punto. Con el fin de que los mapas sean fiables, los puntos deben ser solamente adquiridos cuando la punta del catéter está en contacto temporal y espacial estable con el endocardio⁸⁶. Así pues se determina automáticamente los siguientes criterios con el fin de decidir la idoneidad del punto:

- **Estabilidad del punto** (point loop stability): trayectoria de un punto específico durante 2 ciclos cardiacos consecutivos (un valor bajo es indicativo de una buena estabilidad, debe ser menor de 6 mm).
- **Estabilidad de la longitud del ciclo** (cycle length stability): diferencia entre la longitud del ciclo de un punto específico y la media de las longitudes de ciclo de los 100 latidos previamente registrados (aceptable menor del 10%).

- **Estabilidad del tiempo de activación local** (local activation time stability): diferencia entre el tiempo de activación local de un punto y de otros puntos adyacentes previamente recogidos (la variación no debe ser superior a 2 ms).

- **Estabilidad local** (local stability): variabilidad en la localización de la punta del catéter durante el ciclo cardiaco (entre el final de la sístole y el final de la diástole, aceptable menor de 4mm).

Además de la información sobre el tiempo de activación local y el acortamiento local, el sistema es capaz de evaluar la magnitud de la señal eléctrica expresada en voltaje unipolar (uniV) y bipolar (biV). A cada punto adquirido durante el mapeo se le asigna un valor de voltaje para así construir un mapa de voltaje eléctrico del ventrículo izquierdo. De esta manera, cada punto tiene un valor de LLS y de voltaje. Una vez que el mapa está completado, todos los puntos son integrados en una estación de trabajo y presentados mediante una reconstrucción tridimensional codificada en color de la superficie endocárdica y en unos mapas tipo ojo de buey (bull's eye) de 9 o 12 segmentos que muestran la media de los valores de acortamiento lineal local y voltaje de cada segmento (**Figura 7**). Las representaciones tridimensionales adquiridas durante el ciclo cardiaco son utilizadas para calcular los volúmenes ventriculares. El sistema NOGA utiliza el volumen mayor como volumen telediastólico ventricular izquierdo (VTDVI) y el más pequeño como telesistólico (VTSVI). La fracción de eyección ventricular izquierda es calculada como $(VTDVI - VTSVI)/VTDVI$.

Toda adquisición de mapas debe continuarse con un análisis post-proceso, debiendo aplicarse una serie de filtros para eliminar los puntos indeseables: puntos internos, aquellos que no cumplen los criterios estándar de estabilidad, los que han sido adquiridos durante

elevaciones del segmento ST o aquellos puntos que están fuera de los límites del ventrículo izquierdo (por ejemplo en la aurícula izquierda).



Figura 7. Imagen que muestra el sistema NOGA con el monitor arriba, la unidad de interfase inmediatamente debajo, el campo magnético más abajo y por último la unidad comunicadora.

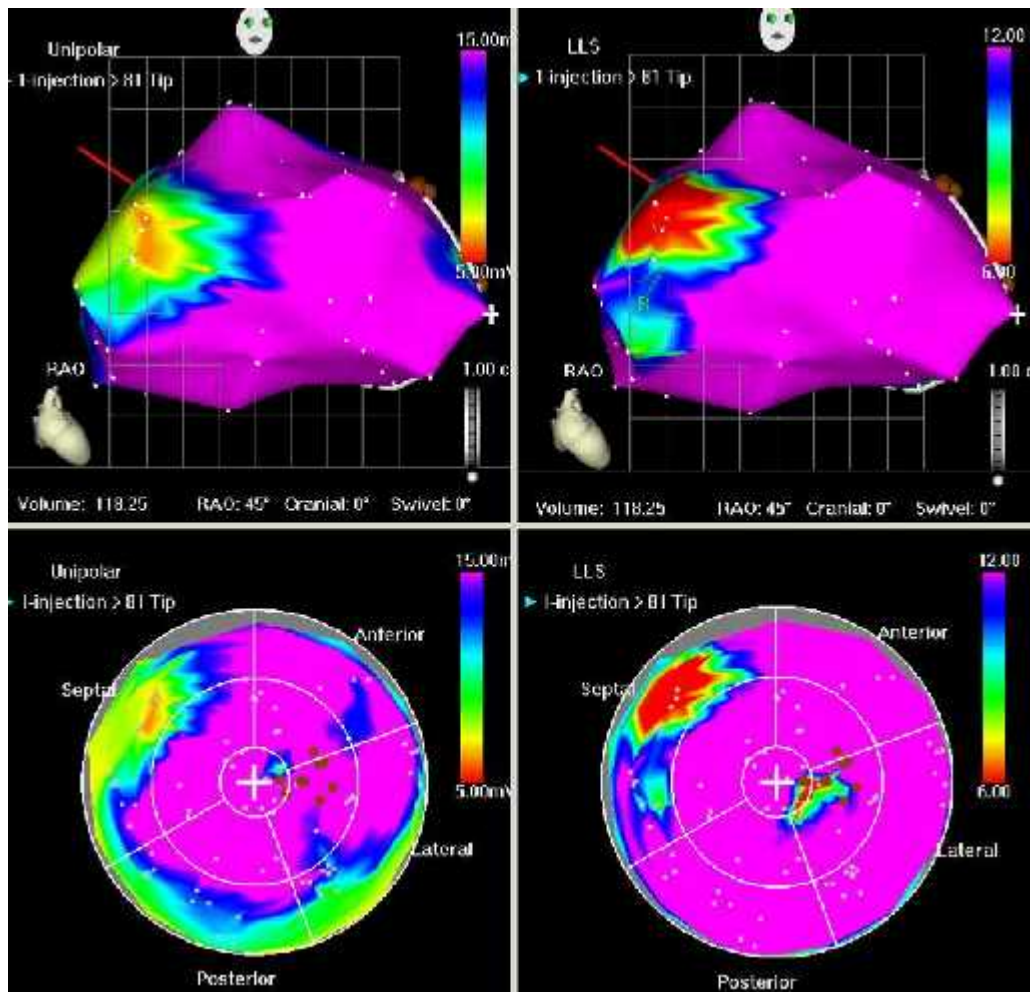


Figura 8. Mapas de superficie arriba y polares abajo obtenidos mediante el mapeo endocárdico con el sistema NOGA en un paciente con un angina refractaria. Las imágenes de la izquierda muestran los voltajes unipolares expresados en milivoltios (mV) y las de la derecha el acortamiento lineal local (LLS). Puede observarse como en los segmentos septo-anteriores basales hay una reducción del voltaje y del acortamiento lineal sugiriendo un área de necrosis con viabilidad circunscrita y un segmento apicolateral con voltaje normal pero con acortamiento lineal reducido típico de segmentos isquémicos.

Estudios preclínicos en los que se ha utilizado el sistema NOGA como sistema de inyección celular

Existen en la literatura médica varios estudios preclínicos en los cuales se ha utilizado el sistema NOGA como plataforma de administración celular. En ninguno de ellos se reportaron efectos adversos asociados al procedimiento.

Rutanen y colaboradores⁸² realizaron un estudio de terapia génica con el objetivo de evaluar la naturaleza angiogénica y los potenciales efectos secundarios de dos factores de crecimiento vasculares que fueron inyectados mediante el sistema NOGA en un modelo no isquémico porcino. Realizaron un total de 10 inyecciones, de 0,2 cc cada una, sin registrarse ningún efecto adverso asociado al procedimiento. Las dosis altas de factores de crecimiento se asociaron a un importante edema miocárdico con derrame pericárdico. De forma análoga, Kawamoto y colaboradores⁸⁵ demostraron que la inyección transendocárdica de células progenitoras endoteliales autólogas mediante el sistema NOGA era segura y factible en un modelo porcino de isquemia crónica destacando además que la simple inyección miocárdica no aumentaba la vascularización en la zona objetivo.

Kamihata y colaboradores⁸⁷ llevaron a cabo un estudio en el año 2002, en el cual se comparó el efecto angiogénico de la inyección transendocárdica, guiada por el sistema NOGA, de células madre mononucleares derivadas de la médula ósea (CMNO) frente a células endoteliales maduras de la microvasculatura coronaria en segmentos miocárdicos hibernados. La inyección de células mononucleares procedentes de la médula ósea incrementó la perfusión regional y la función cardíaca, fenómeno que no ocurrió con las células endoteliales adultas. Estas células sobrevivieron principalmente como células endoteliales y en menor medida como macrófagos sin encontrarse diferenciación a miocitos o

fibroblastos. Las CMNO incorporadas mostraron un incremento en la expresión génica de factores angiogénicos y antiapoptóticos (FGF, VEGF, IL-1B) e indujeron un incremento de la expresión de los mismos en el tejido hospedador. En esta publicación los autores tampoco declararon la presencia de efectos adversos significativos del procedimiento.

Finalmente Chazaud y colaboradores⁸⁸ realizaron un interesante estudio en el cual se inyectaban entre 120 y 150 millones de mioblastos en un modelo isquémico porcino con el objetivo de determinar la eficacia y la seguridad de la inyección transendocárdica mediante el sistema NOGA. Estos autores llegaron a la conclusión que el paso de células a través de este sistema y su inyección no afecta a la supervivencia, crecimiento o diferenciación de estas células. Así mismo, demostraron que la supervivencia celular a los 15 minutos de la inyección fue superior al 80%, porcentaje mayor que el referido para otros mecanismos de implante celular. Como en los estudios anteriormente citados, no se observó ningún efecto secundario asociado al uso del NOGA como sistema de inyección celular.

Estudios clínicos en los que se ha utilizado el sistema NOGA como sistema de guía para la liberación celular

Existen varios estudios clínicos publicados en el ámbito de la terapia celular cardiaca que han utilizado el sistema NOGA como sistema de apoyo a la liberación celular.

El primero de ellos fue llevado a cabo por el grupo del profesor Losordo en Boston⁸³. Se trataba de un estudio piloto en el cual se valoraba la seguridad y eficacia de la terapia génica, mediante inyección transendocárdica de plásmidos de ADN desnudos que codificaban factor de crecimiento endotelial vascular (phVEGF-2), en 6 pacientes con isquemia crónica. Realizaron un total de 36 inyecciones de 1 ml cada una guiadas por el sistema NOGA y no observaron complicaciones. Este mismo grupo de trabajo⁸⁹ realizó posteriormente un estudio en fase II, prospectivo, aleatorizado, doble ciego, comparado con placebo y con escalada de dosis en pacientes inoperables con angina crónica y que se encontraban en clase funcional de la CCS III-IV. Como en el estudio anterior, no aparecieron eventos adversos tras 114 inyecciones de plásmidos de ADN y que practicaron a los 19 pacientes que fueron reclutados. Además se observó una mejoría en los síntomas anginosos y una tendencia no significativa a una mejor capacidad funcional sin angina.

El grupo dirigido por Emerson Perin⁸⁴ realizó, en colaboración con investigadores del Hospital Pro-Cardiaco (Río de Janeiro, Brasil), un estudio clínico pionero donde se implantaron células madre mononucleadas derivadas de la médula ósea en el corazón humano. De forma consecutiva reclutaron un total de 21 pacientes con miocardiopatía dilatada de origen isquémico e imposibilidad de tratamiento de revascularización (grupo de tratamiento los 14

primeros pacientes, grupo control los 7 últimos). Se llevaron a cabo 15 inyecciones de 0,2 cc/inyección (total 30×10^6 células madre derivadas de la médula ósea por paciente). El sistema NOGA fue utilizado para identificar áreas de miocardio viable ($uniV \geq 6.9$ mV) donde se inyectaron las células. No hubo complicaciones derivadas del procedimiento. Este estudio demostró que la inyección transendocárdica de células madre mononucleadas derivadas de la médula ósea era segura y factible.

Smits y colaboradores⁹⁰ realizaron en el Thorax Center de Rotterdam el primer estudio en humanos en el cual demostraron el potencial y la seguridad de la inyección transendocárdica de mioblastos, guiándose con el sistema NOGA, en pacientes sintomáticos con insuficiencia cardiaca tras un infarto agudo de miocardio de localización anterior. En cada uno de los 15 pacientes se realizaron 16 ± 4 inyecciones (rango de 9 a 19) de 0,3 ml cada una en las zonas de escara. Como en los casos anteriores no observaron eventos adversos asociados con el procedimiento. Aunque ninguno de los pacientes de este estudio había sufrido eventos sincopales o taquicardias ventriculares previamente, los autores observaron 2 muertes súbitas y 3 taquicardias ventriculares en el seguimiento a largo plazo tras la inyección transendocárdica de mioblastos, obligando el comité de seguridad a implantar un desfibrilador a todos los pacientes de la cohorte. Sin embargo, ninguno de estos eventos se asoció al procedimiento de inyección en si y posiblemente se deba al desarrollo de una mayor distorsión de la propagación eléctrica en el área infartada donde se implantaron los mioblastos. Hasta la fecha no se ha demostrado una arritmogenicidad significativa de los mioblastos cuando se implanta en zonas de miocardio sano.⁹¹

Sin embargo en esta fase de desarrollo un estudio reportó efectos secundarios graves asociados con la utilización del sistema NOGA en terapia celular ⁹². El estudio EUROINJECT

ONE fue un estudio multicéntrico llevado a cabo en varios países europeos y en el cual se aleatorizaron, en proporción 1:1, a 80 pacientes con isquemia severa crónica, clase funcional CCS avanzada y que no eran susceptibles de ningún tipo de revascularización. Se dividieron en 2 grupos de 40 pacientes cada uno: el grupo de tratamiento recibió terapia génica con factor de crecimiento vascular endotelial (phVEGF-A₁₆₅) y un grupo de control que recibió inyecciones de plásmido placebo (sin el gen VEGF). Se realizaron 10 inyecciones de 0,3 cc cada una en las regiones de isquemia inducible valorado con SPECT. Se registraron durante el procedimiento de mapeo electromecánico e inyección transendocárdica un total de 6 complicaciones severas (4 en el grupo de tratamiento y 2 en el grupo control): 2 pacientes sufrieron taponamiento cardiaco con muerte en uno de ellos, uno sufrió un accidente isquémico transitorio con pérdida súbita de visión, otro paciente sufrió un episodio de elevación transitoria del segmento ST, un paciente presento un shock séptico tras el procedimiento y por último se observó un bloqueo aurículo-ventricular que precisó implante de marcapasos. En la metodología publicada se puede apreciar que el umbral del voltaje unipolar por debajo del cual evitaban la inyección era de 5 mV cuando la recomendación más aceptaba aconsejaba utilizar un límite inferior mayor de 6,9 mV para minimizar los riesgos de perforación. Aunque grupos anteriores habían establecido ese límite en 5 mV, otros grupos, como el dirigido por Emerson Perin⁸⁰, habían observado que áreas de miocardio infartado, de escaso espesor, pueden tener voltajes superiores a 5mV pero no superiores a 7mV cuando el mapeo era exhaustivo. Asimismo no se utilizó de forma sistemática la resonancia magnética nuclear o un ecocardiograma con ecopotenciador previo al procedimiento, con lo que se hubiera descartado la presencia de trombos intracardiacos y probablemente se hubieran evitado los fenómenos embólicos. Finalmente aunque el estudio no mostro una mejoría significativa en la perfusión valorada de forma semicuatitativa ni diferencias en la clínica entre

grupos, que mejoró significativamente en ambos, subanálisis desarrollados posteriormente demostraron una mejoría de la perfusión integrando la información del SPECT con la aportada por el NOGA. Así aunque la perfusión no llegó a normalizarse durante el esfuerzo en el grupo tratado mejoró notablemente acompañándose de una mejoría en la contractilidad segmentaria, principalmente en los segmentos con peor contractilidad previa⁹³ (**Tabla 2**).

	Objetivo	Resultado
Preclínicos		
Rutinen et al. ⁸²	Evaluar la angiogénesis y los efectos secundarios de la inyección guiada por NOGA de dos factores de crecimiento (VEGF-D ^{ΔNAC} y VEGF-A ¹⁶⁵) en un modelo porcino.	A los 6 días se observó un potente efecto angiogénico, transmural y mayor con VEGF-A ¹⁶⁵ que con VEGF-D ^{ΔNAC} . El estudio de perfusión con ecocontraste demostró un incremento de la misma en zonas inyectadas. Las dosis más altas del factor de crecimiento se asoció a edema miocárdico y derrame pericárdico.
Kawamoto et al. ⁸⁵	Evaluar la angiogénesis y los efectos secundarios de la inyección guiada por NOGA de progenitores endoteliales frente a placebo o células mononucleares CD31- en un modelo porcino de isquemia crónica.	A las 4 semanas se observó un incremento angiográfico de colaterales, de la FEVI y de la densidad capilar en el estudio AP. No se observaron complicaciones y la neovascularización no se registró en el grupo control (placebo y monucleares CD31-).
Kamihata et al. ⁸⁷	Evaluar el efecto biológico y los efectos secundarios de la inyección guiada por NOGA de células marcadas de la fracción mononucleada de la médula ósea en un modelo porcino de isquemia crónica frente a los efectos de la inyección de células endoteliales adultas o suero.	A las 3 semanas en los cerdos tratados se observó en la zona objetivo un incremento del flujo sanguíneo, de vasos visibles angiográficamente y de la función cardíaca. El estudio AP demostró una mayor densidad capilar y una mayor expresión de factores proangiogénicos. Además se encontraron las células marcadas en el 31% de los neocapilares y en un 8,7% de los macrófagos de la zona. No se registraron complicaciones.
Chazaud et al. ⁸⁸	Evaluar la supervivencia y la factibilidad de la inyección guiada por NOGA de mioblastos en un modelo porcino.	Se demuestra que mantenidas adecuadamente preimplantación los mioblastos no sufren un gran impacto en su supervivencia inmediata y en su función. Se consigue inyectar las células en la zonas objetivos prefijadas en todos los cerdos.
Clínicos		
Losordo et al. ⁸⁹	Estudio fase 2 aleatorio/ciego para evaluar la seguridad y explorar la eficacia de la inyección guiada por NOGA de plásmidos desnudos de ADN que contiene el gen del VEGF2 (12) frente a placebo (7) en pacientes con angina refractaria III/IV sin opción.	Se observó una mejoría significativa en la clase funcional CCS y no significativa en la puntuación del test de Seattle, tiempo de ejercicio o en la perfusión (SPECT). Sin complicaciones agudas.
Perin et al. ⁸⁴	Estudio fase 2 aleatorio/ciego para evaluar seguridad y explorar la eficacia de la inyección guiada por NOGA de células de la fracción mononuclear de la médula ósea en pacientes (21) con insuficiencia cardíaca avanzada.	A los 2 y 4 meses se observó una mejoría de la disnea, reducción de los episodios anginosos, mejoría en la capacidad funcional y en VO2 max, mejoría en la FEVI, una reducción de la isquemia inducible, una disminución del volumen telesistólico y mejora del acortamiento lineal en los pacientes tratados. Sin complicaciones.
Smits et al. ⁹⁰	Evaluar la eficacia y seguridad de la inyección transendocárdica (la mayoría guiada por NOGA) de mioblastos autólogos en zonas de escara en pacientes (15) con insuficiencia cardíaca.	Se observó una mejoría no significativa en la FEVI y en el WMSI. Durante el mapeo se registraron en 2 pacientes 2 episodios de TV. Durante el seguimiento se observó 1 muerte súbita posiblemente arritmica con lo que se implanto un DAI a los siguientes de la cohorte. Un paciente con DAI murió tras una tormenta arritmica. Otros 3 pacientes tuvieron TV sostenida.
EUROINJECT ONE. ⁹²	Estudio fase 2 aleatorio/ciego para explorar la eficacia de la inyección guiada por NOGA de plásmidos cubiertos (adenovirus) que contiene el gen del VEGF2 -phVEGF-A ¹⁶⁵ -(40) frente a placebo (40) en pacientes con angina refractaria III/IV sin opción.	No se evidenció mejoría en los parámetros de perfusión ni de la isquemia inducible. En ambos grupos la clínica anginosa mejoró y en el grupo terapéutico la intensidad del trastorno de la contractilidad segmentaria se redujo. Se registraron 5 complicaciones graves en relación al procedimiento.

Tabla 2. Tabla resumen mostrando los principales estudios preclínicos o experimentales y clínicos donde utilizan la inyección transendocárdica guiado por el sistema NOGA.

Estudios Clínicos y Preclínicos en Terapia Celular realizados mediante la administración de la Fracción Mononucleada de la Médula Ósea

Estudio preclínicos

Existen múltiples estudios preclínicos publicados en la literatura médica que han utilizado la médula ósea como fuente de células madre. Además algunos de ellos han utilizado como método de administración celular la inyección transendocárdica guiada por el sistema NOGA. En todos se llegó a la conclusión de que la administración de estas células en tejidos isquémicos era segura y aumentaba la perfusión tisular en las zonas inyectadas.

El primer estudio con células madre de médula ósea, en 1999, fue realizado en el Hospital de Toronto donde in vitro se demostró que las células de médula ósea cultivadas en un medio con 5-azacitadina desarrollaban miotúbulos que presentaban tinción positiva para la troponina I y la cadena pesadas de miosina. Al mismo tiempo inyectaron en ratas, a las que se les había producido una criolesión sobre el ventrículo izquierdo 3 semanas antes, células de médula ósea (MO) frescas y cultivadas, células de MO cultivadas con 5-azacitadina o placebo. Los tres grupos de células de médula ósea mejoraron la función cardíaca valorada mediante el desarrollo de presiones sistólicas y el examen histológico encontró células con tinción positiva para proteínas del sarcolema además de un significativo desarrollo de capilares vasculares ⁹⁴.

En el año 2001 se llevaron a cabo varios estudios de enorme relevancia en el campo de la terapia celular cardíaca:

En primer lugar, Jackson y cols.⁹⁵ utilizaron una subpoblación de células madre hematopoyéticas (CD34⁻/low, c-Kit⁺, Sca-1⁺), que presentan un patrón característico en el análisis espectral con el contraste de Hoechst, llamadas de la población marginal o “side population”. A ratones letalmente irradiados se les trasplantó esta subpoblación celular, procedente del modelo transgénico Rosa26 que expresa el gen de la B-galactosidasa (lacZ⁺), y posteriormente se les ligó la arteria coronaria descendente anterior. Se observó que las células lacZ⁺ expresaban alfa actina en la región infartada, en vías de diferenciación a cardiomiocito, y otras lacZ⁺ expresaban Flt-1, conocido marcador endotelial, ambas evidencias sobre la capacidad regenerativa de la médula ósea. El estudio, además, fue pionero al emplear la subpoblación CD34⁻ en el contexto de la isquemia cardiaca.

En segundo lugar el grupo de Kamihata y cols.⁸⁷ empleo la fracción mononuclear de la médula ósea en un modelo isquémico porcino. Como veíamos con anterioridad, en este estudio se demostró un incremento de la perfusión miocárdica, de la densidad capilar y de la contractilidad regional en las regiones tratadas con células madre. No se observaron arritmias ni formación de tumores. Dichas células parecían evolucionar a células endoteliales y se incorporaban a nuevos capilares sin diferenciarse a mioblastos o fibroblastos, además segregaban factores angiogénicos como VEGF o angiopoyetina-1.

Fuchs y cols.⁹⁶ en un modelo de isquemia crónica en cerdos, inyectaron células frescas de médula ósea mediante aspiración del fémur y filtrado de la muestra. Dicha inyección, realizada de forma transendocárdica con el sistema NOGA, fue segura sin que se observasen eventos adversos en relación con su administración. Los autores encontraron un aumento en la perfusión en las zonas isquémicas y un aumento de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo. Además se realizó un estudio *in vitro* donde se evidenció que las células madre

derivadas de la médula ósea segregan factores angiogénicos (VEGF y proteína quimio-atrayente de macrófagos MCP-1) e inducían la proliferación de las células endoteliales recolectadas de la aorta del propio cerdo.

En el año 2004 Liu y cols.⁹⁷ utilizaron también células mononucleares de médula ósea en un modelo murino, pero en este caso se inyectaron directamente de forma quirúrgica, transepícardicamente, tras la creación de un infarto de miocardio. El estudio se diseñó para esclarecer los mecanismos por los que estas células favorecían la angiogénesis. Mediante el estudio con RT-PCR se analizó el contenido de citoquinas y sus receptores tanto a nivel cardíaco como en la médula ósea en el grupo control y en el terapéutico. No se observó una diferencia en el nivel de citoquinas proangiogénicas en el corazón en ambos grupos si bien se confirmó un aumento del receptor de la factor de crecimiento hepatocitario (HGF) c-met en el grupo terapéutico. No se observaron diferencias en el nivel de los receptores o de las citoquinas a nivel de médula ósea si bien el estudio puso de manifiesto que los niveles de HGF en MO era mayores que en el corazón y superiores a los encontrados en especímenes sanos, otra prueba de concepto sobre la capacidad de la médula ósea para modular la reparación tisular y como la terapia celular podría potenciar esta capacidad innata.

Ya en el año 2006, Bhakta y cols.⁹⁸ utilizaron un modelo porcino de isquemia crónica e infundieron de forma intracoronaria células marcadas de la fracción mononuclear de la médula ósea. Aunque el estudio incluyó un número reducido de animales (5 especímenes), los autores identificaron que dichas células se incorporaban a estructuras perivasculares cardíacas además de encontrarse en el bazo del cerdo. No se produjeron nuevos infartos de miocardio. El estudio concluyó que la administración intracoronaria de estas células era segura y que se localizaban en las regiones objetivo en el territorio de la arteria tratada.

Goodchild y cols.⁹⁹ inyectaron transendocardicamente células de la fracción mononuclear de la médula ósea guiado por fluoroscopia con el catéter Stiletto (Boston Scientific) en modelo porcino de isquemia crónica. El objetivo principal del estudio fue demostrar la seguridad del procedimiento, principalmente desde el punto de vista arrítmico. No se evidenciaron cambios histopatológicos tras la inyección de las células que sugiriesen el desarrollo de un nuevo infarto o de un teratoma. El procedimiento no se asoció a complicaciones y el estudio electrofisiológico no indujo arritmias en los especímenes tratados.

Guarita-Souza y cols.¹⁰⁰ compararon, en un modelo murino, el efecto de la inyección de células madre mesenquimales obtenidas de la médula ósea frente al de la fracción mononuclear de la médula ósea o placebo. Una semana después de provocar un infarto de miocardio, que les condicionaba una disminución de la fracción de eyección significativa (FEVI<40%), se procedió a su inyección quirúrgica. No se objetivaron cambios en la FEVI en los animales tratados con ambos tipos de células, pero sí una disminución de la FEVI en los controles, un prometedor efecto antirremodelado de la terapia celular.

Yokoyama y cols.¹⁰¹ evaluaron otra vía de administración. En cerdos con un infarto de miocardio tanto agudo como antiguo, aislaron la fracción mononuclear de la médula ósea y la administraron de forma retrógrada a través del seno coronario. En ambos escenarios, tanto agudo como crónico, el tratamiento celular incrementó la función cardíaca, favoreció la neoangiogénesis, provocó un aumento en la secreción de factores de crecimiento como VEGF o FGF-2 y conllevó una disminución de los péptidos natriuréticos.

Estudios Clínicos

El primer estudio clínico que utilizó las células mononucleadas de la médula ósea para la creación de angiogénesis se llevó a cabo en pacientes con isquemia vascular periférica (TACT study). Tras la administración intramuscular de estas células se observó un aumento de la perfusión y se demostró un aumento de la arteriogénesis mediante la visualización de nuevos vasos en la angiografía ¹⁰².

Tras este resultado prometedor en un modelo de isquemia vascular periférica estas células han sido utilizadas en diferentes escenarios clínicos y liberadas mediante diversos métodos de administración: la inyección intracoronaria en pacientes postinfarto de miocardio, inyección directa en el miocardio durante la cirugía de revascularización miocárdica o la administración percutánea mediante la inyección transendocárdica guiada por NOGA.

Así en el seno del infarto agudo de miocardio existen varios estudios publicados que utilizan la vía intracoronaria para la administración de las células madre. Strauer y cols. ¹⁰³ incluyeron 20 pacientes (10 tratados con terapia celular y 10 controles). Estos autores demostraron que la infusión intracoronaria de células autólogas de la médula ósea, a los 5-9 días de un infarto agudo de miocardio, reducía en un 26% el defecto de perfusión en el grupo tratado observándose además una mejoría en la geometría ventricular con una reducción de los volúmenes telediastólico y telesistólico. Además se evidenció un incremento en la contractilidad en el área tratada a los 3 meses de seguimiento. Otros estudios preliminares,

como el desarrollado por el profesor Fernández Avilés o como el estudio BOOST¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ demostraron que esta terapia era segura y posiblemente efectiva.

De forma sorprendente los resultados de los siguientes estudios aleatorizados fueron contradictorios en términos de eficacia. Tanto el trabajo de Lunde et al. como el de Janssens et al. no mostraron beneficio ni en la función cardiaca ni en la perfusión miocárdica con el tratamiento de células madre procedentes de médula ósea administradas de forma intracoronaria en pacientes con infarto agudo de miocardio¹⁰⁷⁻¹⁰⁸. Sin embargo el estudio aleatorizado de mayor tamaño muestral (REPAIR-AMI)¹⁰⁹ llevado a cabo por el grupo de Frankfurt, mostró un incremento significativo de la fracción de eyección en el grupo aleatorizado a recibir tratamiento celular (células madre mononucleares de la médula ósea) en comparación con el grupo control, 5,5%, grupo de terapia celular frente a 3%, en el grupo control, y una disminución del evento combinado de muerte, infarto recurrente y necesidad de nueva revascularización al año de seguimiento. Adicionalmente este estudio destacó que los pacientes que más se beneficiaban del tratamiento eran precisamente aquellos con peor fracción de eyección (<50%).

En este mismo contexto clínico el estudio realizado por Assmus y cols.¹¹⁰ incluyó 20 pacientes con fracción de eyección preservada (media de 52%). Nueve pacientes recibieron precursores endoteliales obtenidos de la sangre periférica y posteriormente expandidos durante $4,3 \pm 1,5$ días tras el infarto de miocardio. Estos pacientes se compararon con un grupo representativo de forma no aleatorizada (n=10). A los 4 meses de seguimiento, se observó un incremento significativo de la fracción de eyección, un incremento de la contractilidad segmentaria en la zona del infarto y una reducción del volumen telesistólico. Por otro lado la reserva coronaria de flujo se incrementó en la arteria responsable del infarto y mediante

tomografía de emisión de positrones (PET) con FDG-18 se demostró un incremento significativo de la viabilidad miocárdica en la zona del infarto. No se registraron complicaciones significativas.

Más adelante el grupo de Tse ¹¹¹ utilizó la vía de administración transendocárdica guiada mediante NOGA para tratar a 8 pacientes con angina refractaria y función sistólica conservada (media de la fracción de eyección del 57,6%). A los 3 meses de seguimiento se observó un descenso en el promedio del número de episodios de angina y en la necesidad de administración de nitroglicerina por semana, de 26.5 a 10.1 ($p < 0,0001$) y desde 23.9 a 6.8 ($p = 0,002$), respectivamente. La resonancia magnética cardiaca reveló un incremento en el grosor de la pared y en la contractilidad regional (11,6% y 5,5%, respectivamente), observándose una reducción de la masa de miocardio hipoperfundido. Por último se demostró que el procedimiento era seguro, no registrándose derrame pericárdico de importancia, arritmias sostenidas u otro tipo de complicación.

Como se refería anteriormente Perin y cols. ⁸⁴ llevaron a cabo un estudio en 21 pacientes (14 tratados y 7 controles) con isquemia miocárdica sin opción a revascularización y disfunción ventricular a los que se les trató con la fracción mononucleada de la médula ósea mediante inyección transendocárdica guiada por NOGA. El procedimiento fue seguro, sin registrarse complicaciones. A los 4 meses de seguimiento se demostró un aumento de la fracción de eyección desde el 20% al 29% en promedio ($p = 0,003$) y se redujo significativamente el diámetro telesistólico ($p = 0,03$) en el grupo tratado. Al año de seguimiento ¹¹² se observó un descenso significativo de los defectos reversibles evaluados mediante SPECT y un aumento de la capacidad funcional medida mediante una ergometría con consumo de oxígeno en el grupo tratado (**Tabla 3**).

	Objetivo	Resultado
Preclínicos		
Tomita et al. ⁹⁴	Evaluar la capacidad de diferenciación, supervivencia en escara y efecto de la inyección directa de células de MO tanto frescas como cultivadas en el corazón de rata sometido a criolesiones.	Se observó que las células de médula ósea desarrollaban miotúbulos además de ser proangiogénicas mejorando la función hemodinámica. No se observó la formación de tumores.
Jackson et al. ⁹⁵	Evaluar el efecto del trasplante de una subpoblación de células madre hematopoyéticas (side population) en ratones letalmente radiados a los que posteriormente se le inducía un infarto de miocardio.	Histológicamente se observó movilización de estas células, previamente marcadas, a la zona del infarto en vías de diferenciación a cardiomiocitos (α -actina) y progenitor endotelial (Flt-1+).
Kamihata et al. ⁹⁷	Evaluar el efecto biológico y los efectos secundarios de la inyección guiada por NOGA de células marcadas de la fracción mononucleada de la médula ósea en un modelo porcino de isquemia crónica frente a los efectos de la inyección de células endoteliales adultas o suero.	A las 3 semanas en los cerdos tratados se observó en la zona objetivo un incremento del flujo sanguíneo, de vasos visibles angiográficamente y de la función cardíaca. El estudio AP demostró una mayor densidad capilar y una mayor expresión de factores proangiogénicos. Además se encontraron las células marcadas en el 31% de los neocapilares y en un 8,7% de los macrófagos. No se registraron complicaciones.
Fuchs et al. ⁹⁶	Evaluar el efecto de la inyección guiada por NOGA de células frescas de MO en un modelo de isquemia crónica porcino. Estudio funcional in vitro.	In vivo se observó un incremento de la perfusión regional y de la FEVI en los corazones del grupo tratado que no observó en el control. In vitro se observó una producción significativa de factores angiogénicos (VEGF y MCP-1) además de promover la proliferación de células endoteliales adultas.
Liu et al. ⁹⁷	Evaluar el efecto de la inyección directa de células de médula ósea en un modelo isquémico crónico porcino mediante la cuantificación del nivel de citoquinas y sus receptores.	Se observó que la mayor expresión del receptor del factor de crecimiento hepatocitario (c-met) se da en los especímenes sometidos al trasplante.
Bhakta et al. ⁹⁸	Evaluar la seguridad de la inyección intracoronaria de células mononucleares de MO marcadas en un modelo de isquemia crónica porcina.	La inyección no se asoció al desarrollo de un infarto de miocardio. Las células marcadas se encontraron alrededor de los capilares de la zona tratada y en el bazo.
Goodchild et al. ⁹⁹	Evaluar la seguridad, principalmente arritmica, de la inyección no guiada por NOGA de células frescas de MO en un modelo de isquemia crónica porcino.	El procedimiento transcurrió sin complicaciones. No se indujeron arritmias en los cerdos tratados ni cambios histopatológicos significativos.
Guarita-Souza et al. ¹⁰⁰	Evaluaron el efecto de la inyección directa de células de la fracción monoclear de MO, médulas mesenquimales de MO o placebo en modelos subagudos de isquemia en roedores.	No se observó una mejoría en la FE o en los volúmenes si bien el tratamiento se asoció a una ausencia de deterioro de la FE o de los volúmenes que si se observó en los controles.
Yokoyama et al. ¹⁰¹	Evaluar la seguridad y eficacia de la administración retrograda por el seno coronario de células mononucleares de MO en un modelo de isquemia agudo y crónico en cerdos.	Los corazones tratados mostraron mejor FE y disminución de péptidos natriuréticos; se observó en el análisis histológico un incremento en la neoangiogénesis y del nivel de citoquinas proangiogénicas.

Clínicos		
Strauer et al. ¹⁰³	Estudio fase 2 aleatorio/ciego para evaluar seguridad y explorar la eficacia de la inyección intracoronaria de células no seleccionadas de MO en pacientes con un infarto de miocardio.	Se observó una reducción en el tamaño del infarto con menor remodelado en los pacientes tratados (10) vs a los no tratados (10) sin diferencias en la localización de la lesión o el tiempo del infarto. Sin complicaciones.
Fernández Avilés et al. ¹⁰⁴	Estudio fase 2 donde se evalúa la capacidad de la fracción mononuclear de MO in vitro y in vivo en 20 pacientes con infarto agudo de miocárdico mediante administración intracoronaria	No se registraron complicaciones. In vitro se observó diferenciación a cardiomiocitos expresando conexina 43. En el grupo tratado se observó a los 6 meses un efecto antirremodelado frente a controles representativos no aleatorizados.
BOOST trial. ¹⁰⁵	Evaluar la eficacia y seguridad de la administración de células autólogas de médula ósea en 60 pacientes con un infarto agudo de miocardio	En los 6 meses de seguimiento se observó una mejoría, evaluada por CardioRM, de la FEVI en promedio 6% en los pacientes tratados frente a los controles.
Schächinger et al. ¹⁰⁶	Estudio fase 2 aleatorio/ciego para explorar la eficacia de la administración intracoronaria en pacientes con un infarto agudo de miocardio de células de la fracción mononucleada de MO.	Tanto en el grupo control como en el tratado se registró un episodio de reinfarcto de miocardio. Sin más complicaciones agudas. Se observó un incremento significativo de la FEVI y una disminución del volumen telesistólico del VI en los pacientes tratados.
Lunde et al. ¹⁰⁷	Estudio fase 2 aleatorio/ciego para explorar la eficacia de la administración intracoronaria en pacientes con un infarto agudo de miocardio anterior de células de la fracción mononucleada de MO (49 tratados y 50 controles).	No se registraron complicaciones sin embargo no se observaron diferencias en términos clínicos o antirremodelado.
Janssens et al. ¹⁰⁸	Estudio fase 2 aleatorio/ciego para explorar la eficacia de la administración intracoronaria en pacientes con un infarto agudo de miocardio de células de la fracción mononucleada de MO en 67 pacientes.	No se registraron complicaciones sin embargo no se observaron diferencias en términos clínicos o antirremodelado.
REPAIR-AMI. ¹⁰⁹	Estudio multicéntrico de 204 pacientes con un infarto agudo de miocardio aleatorizados a recibir inyección intracoronaria de células de la fracción mononuclear de MO o tratamiento convencional.	Se observó una mejoría de la fracción de eyección, principalmente en pacientes con una FEVI < 50% y al año una disminución de eventos significativa en el end-point combinado de muerte, infarto recurrente o necesidad de un nuevo procedimiento de revascularización.
Assmus et al. ¹¹⁰	Evalúa la eficacia y seguridad de la administración intracoronaria de células mononucleares recolectadas de la médula ósea o de la sangre periférica en 20 pacientes con un infarto agudo de miocardio.	En ambos grupos celulares se observó una mejoría de la FEVI, de la contractilidad segmentaria, reducción de los volúmenes y un incremento en la perfusión/metabolismo medido por PET con respecto a un grupo no aleatorio representativo.
Tse et al. ¹¹¹	Evaluar la eficacia y seguridad de la inyección transendocárdica (guiada por NOGA) de células mononucleares de MO en zonas viables en pacientes (8) con angina refractaria sin opción y FEVI normal.	A los 3 meses se observó una mejoría clínica y los parámetros de perfusión en los pacientes tratados.

Tabla 3. Tabla resumen mostrando los principales estudios preclínicos o experimentales y clínicos donde utilizan las células madre de médula ósea para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

Estudio Preclínicos y Clínicos llevados a cabo mediante la administración de Progenitores Endoteliales Seleccionados

Estudios preclínicos

Como se ha comentado previamente debido a que la fracción mononuclear de la médula ósea es una muestra celular muy heterogénea, algunos autores han intentado buscar subpoblaciones con perfiles a priori más eficaces como sería la subpoblación CD 34+/CD 133+. Así Kocher y cols.¹¹³ inyectaron en un modelo murino células humanas procedentes de la médula ósea que expresaban el marcador CD34+. Estas células fueron recogidas mediante la estimulación de la médula ósea con G-CSF y posteriormente seleccionadas con anticuerpos monoclonales contra CD34+. El análisis de la población recogida mostró que las células presentaban tanto marcadores hematopoyéticos como endoteliales que los autores reconocieron similares a los hemangioblastos embrionarios. A las 48 horas, tras provocar un infarto de miocardio mediante la ligadura de la arteria coronaria descendente anterior, las células seleccionadas fueron inyectadas en los segmentos infartados. En este estudio, se demostró que el grupo tratado desarrollo un incremento significativo de la microvascularización en la zona del infarto además de una reducción de la densidad de fibrosis en comparación con el grupo control. Del mismo modo, Orlic y cols.¹¹⁴ demostraron, en un modelo similar en el que se inducía a los especímenes un infarto de miocardio, que las células madre procedentes de la medula ósea, principalmente c-kit+ con marcadores de linaje hematológico negativo (Lin-), movilizadas mediante la administración de citoquinas (Stem Cell Factor y G-CSF) se veían atraídas al tejido dañado. En la zona del infarto anidaban, proliferaban

y se diferenciaban a células maduras contribuyendo de forma significativa en el proceso de reparación tisular. Los animales tratados presentaron una disminución del tamaño del infarto, de los volúmenes ventriculares y de la mortalidad. Estos mismos autores en otro estudio con ratones⁴⁸ inyectaron directamente células procedente de la médula ósea en la zona del infarto produciéndose regeneración de miocardio de novo.

Como mencionábamos antes, en el año 2003 Kawamoto y cols.⁸⁵ investigaron si mediante la inyección transendocárdica de células progenitoras endoteliales autólogas asistidos con el sistema NOGA se podía promover la neovascularización del miocardio isquémico. Para ello crearon un modelo porcino de isquemia subaguda. A las cuatro semanas se aislaron de la sangre periférica un total de 10 millones de células progenitoras endoteliales autólogas CD34⁺ que fueron inyectadas en áreas miocárdicas isquémicas. Estos autores observaron que la densidad capilar en las zonas miocárdicas isquémicas era significativamente superior en los cerdos trasplantados comparados con el grupo control.

Estudios clínicos

De forma específica la fracción seleccionada de células CD133+ obtenida en sangre periférica ha sido utilizada en varios estudios clínicos con el objetivo de reparar y regenerar tejidos enfermos, principalmente para inducir miogénesis tras un infarto o angiogénesis en tejidos isquémicos.

Pompilio y cols.¹¹⁵ establecieron un protocolo en humanos para estimular la médula ósea con el fin de poder seleccionar y procesar cantidades suficientes de células progenitoras. Las células recolectadas fueron inyectadas en un grupo de 4 pacientes durante la cirugía de revascularización coronaria. El procedimiento en su conjunto fue seguro sin que se registrasen complicaciones durante el seguimiento.

Stamm y cols.¹¹⁶ en un estudio con 6 pacientes, purificaron células CD133+ de la médula ósea y las inyectaron en el borde de una escara durante una cirugía de revascularización miocárdica. El procedimiento fue seguro y sin complicaciones. A los 16 meses de seguimiento no se registró ningún evento clínico de interés, todos los pacientes permanecieron vivos y en ninguno se observó la aparición de arritmias ventriculares o neoplasias. Además, se contempló en el 83% de los pacientes un aumento de la perfusión mediante SPECT y en un 66% un incremento en la contractilidad segmentaria de la zona infartada.

Bartunek y col.¹¹⁷ incluyeron 35 pacientes con infarto agudo de miocardio que fueron tratados con angioplastia y stent de la arteria responsable del infarto. De este grupo, 19 pacientes recibieron una infusión intracoronaria de células CD 133+ a los 11 días del infarto y

el resto constituyeron el grupo control. El procedimiento fue seguro. A los 4 meses de seguimiento se observó un incremento significativo de la fracción de eyección y una reducción significativa del defecto de perfusión en el grupo tratado, cambios que no se observaron en el grupo control. En este estudio se observó una considerable tasa de reestenosis del stent en ambos grupos, si bien en el grupo tratado se produjeron 2 oclusiones subagudas del stent previo. Los autores postularon que fisiopatológicamente pudieron influir las oclusiones intracoronarias con el balón del catéter de infusión a nivel del stent recientemente implantado. Por otro lado los mismos autores reconocieron que la población inyectada no superó el 82% de pureza de células CD133+ con una importante contaminación linfomonocitaria, por lo que no es posible atribuir, a ciencia cierta, un posible efecto reestenótico a las células CD133+. Finalmente el escaso número de pacientes y el tipo de estudio, no aleatorizado, hacen plantearse otros interrogantes tanto técnicos como metodológicos ¹¹⁸ **(Tabla 4)**.

	Objetivo	Resultado
Preclínicos		
Kocher et al. ¹¹³	Evaluar el efecto de células mononucleadas CD34+ humanas inyectadas en un modelo murino de isquemia subaguda.	En el examen histológico se observó una mayor densidad capilar y una menor fibrosis en los roedores tratados frente a los controles.
Orlic et al. ¹¹⁴	Evaluar el efecto de las células madre (c-kit+ Lin-) autólogas estimuladas con factores de crecimiento en un modelo murino de isquemia miocárdica.	Se observó una reducción de la mortalidad en los especímenes tratados, con disminución del tamaño del infarto, mejor contractilidad regional y menor estrés diastólico. Todo acompañado de una mayor preservación tisular y una mayor densidad capilar.
Kawamoto et al. ⁸³	Evaluar la angiogénesis y los efectos secundarios de la inyección guiada por NOGA de progenitores endoteliales (mononucleares CD31+) en un modelo porcino de isquemia crónica.	A las 4 semanas se observó un incremento angiográfico de colaterales, de la FEVI y de la densidad capilar en el estudio AP. No se observaron complicaciones y la neovascularización no se registró en el grupo control (placebo y mononucleares CD31-).
Clínicos		
Pompilio et al. ¹¹⁵	Estudio fase I para evaluar seguridad y factibilidad de la inyección directa de células CD133+ recolectadas mediante aféresis en sangre periférica en pacientes con enfermedad coronaria (3 recibieron adicionalmente cirugía de revascularización coronaria)	No se registraron complicaciones.
Stamm et al. ¹¹⁶	Estudio fase I para evaluar seguridad y factibilidad de la inyección directa de células CD133+ recolectadas en MO en pacientes con enfermedad coronaria e infarto previo sometidos a cirugía de bypass aortocoronario.	Sin complicaciones. En el seguimiento se observó mejoría en la perfusión de segmentos infartados.
Bartunek et al. ¹¹⁷	Estudio fase 2 aleatorio/ciego para evaluar seguridad y explorar la eficacia de la inyección intracoronaria de una muestra enriquecida con células CD133+ extraída de la MO en 35 pacientes con un infarto de miocardio.	Se observó una mejoría significativa en la FEVI y en la perfusión que no se observó en los controles. Se registró una alta tasa de reestenosis (11) tanto en controles como en los pacientes tratados. En estos últimos además se registró 2 trombosis subagudas del stent.

Tabla 4. Tabla resumen mostrando los principales estudios preclínicos o experimentales y clínicos donde utilizan las células progenitoras endoteliales para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

OBJETIVOS Y VARIABLES PRINCIPALES DEL ESTUDIO.

Los principales objetivos de este estudio fueron:

A-Demostrar la seguridad y factibilidad de la inyección transendocárdica de células madre CD 133 positivas en pacientes con isquemia miocárdica demostrada en un territorio sin ninguna opción de revascularización, tanto percutánea como quirúrgica, y que se encuentran sintomáticos a pesar de un tratamiento médico óptimo.

La factibilidad se evaluó atendiendo a la posibilidad de realizar todo el procedimiento predeterminado mientras que la seguridad se determinó como la incidencia de eventos adversos (muerte cardiovascular, infarto no fatal, complicaciones neurológicas, complicaciones vasculares, derrame pericárdico/taponamiento cardiaco, taquicardias ventriculares sostenidas o ingresos hospitalarios de causa cardiovascular) durante el seguimiento del estudio.

B-Demostrar la eficacia de la inyección transendocárdica de progenitores endoteliales CD133+ en pacientes con isquemia miocárdica refractaria, tanto en términos clínicos como de perfusión, de preservación de la función miocárdica y de reclutamiento de segmentos no contráctiles.

La eficacia de esta estrategia terapéutica será evaluada mediante las siguientes variables a los 6, 12 y 24 meses del tratamiento:

1. Aumento de perfusión/viabilidad miocárdica en el área tratada en el seguimiento mediante Gated-SPECT-TAC (tomografía computarizada por emisión de fotón único-tomografía axial computarizada).

2. Evolución de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, de los diámetros ventriculares y de la contractilidad segmentaria durante el seguimiento.
2. Cambios en la capacidad funcional y de la clínica anginosa mediante la evaluación de parámetros de la ergometría (METS, minutos hasta la aparición de angina, duración total de la prueba).
3. Clínica y calidad de vida mediante el análisis del cuestionario de Seattle y la escala de dolor anginoso según la Canadian Cardiovascular Society (CCS).

C- Evaluar in vitro las características morfo-funcionales de los progenitores endoteliales CD133+.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio y diseño del mismo

Con el objetivo de dar respuesta a las hipótesis planteadas, es decir la inyección de progenitores endoteliales es una estrategia segura, factible y en menor medida eficaz, se diseñó el estudio como un ensayo clínico en fase I/II (estudio PROGENITOR). Por lo tanto se trata de un estudio prospectivo, aleatorizado (a recibir tratamiento con células madre o el mejor tratamiento posible con mapeo endocardio pero sin inyección intramiocárdica) y doble ciego (el paciente desconoce el tratamiento asignado, los evaluadores de los eventos desconocen la asignación pero no así el médico responsable de inyectar las células). En el proyecto participaron tres hospitales: el Hospital Clínico San Carlos de Madrid, el Hospital Clínic de Barcelona y el Hospital de Sant Pau de Barcelona. El estudio cumplía con los principios de la declaración de Helsinki en investigación en humanos y fue aprobado por todos los comités institucionales correspondientes en los tres hospitales. El mecanismo de aleatorización fue diseñado para que hubiese el doble de pacientes tratados que de controles y fue generado por un programa informático diseñado para tal efecto.

Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión para la participación en este estudio fueron los siguientes:

- Clase II-IV de la Sociedad Canadiense de Cardiología para angina bajo el tratamiento médico máximo posible. El estado funcional y el máximo tratamiento médico fueron determinados por un comité cardiológico (al menos 2 cardiólogos).

- Isquemia miocárdica/viabilidad demostrada por un defecto reversible de perfusión detectado por las técnicas de imagen.
- Enfermedad coronaria no susceptible de ningún tipo de revascularización (quirúrgica o percutánea) en la zona diana. Se precisó la evaluación de un cardiólogo intervencionista y un cirujano cardiaco del Hospital Clínico de Madrid para determinar las posibilidades de revascularización.
- Firmar el consentimiento informado.

Criterios de exclusión

Los pacientes fueron excluidos del estudio si presentan una o más de las siguientes características:

- Menores de 18 años o mayores de 80 años.
- Fibrilación auricular permanente.
- Presencia de trombo en el ventrículo izquierdo.
- Patología valvular aórtica significativa (mayor de grado II).
- Embarazo o periodo de lactancia.
- Diátesis hemorrágica.
- Historia de cáncer en los 5 años previos.
- Infarto de miocardio reciente (menos de 3 meses).
- Grosor de la pared del ventrículo izquierdo en la zona a inyectar menor de 8 mm.
- Cualquier condición que a juicio de los investigadores sometería al paciente a un riesgo injustificable.

Número de sujetos previstos y justificación del mismo

Para conseguir una adecuada gestión estadística el número de pacientes previstos máximo serían 30, 20 tratados con células y 10 controles. Al concebirse como un estudio piloto no se predeterminó, a priori estadísticamente, el tamaño muestral. Estudios previos consiguieron demostrar diferencias significativas con tamaños muestrales de 21 pacientes por lo que se establece este número como mínimo tamaño muestral.⁸⁴

Criterios de finalización del estudio

Se prefirió que el estudio finalizaría en el caso de que se cumpliera alguno de los siguientes criterios:

-Tras un periodo de 5 años máximo de reclutamiento (mínimo 21 pacientes hasta un máximo de 30 pacientes).

-En caso de que la mortalidad fuese excesiva: los pacientes serían analizados en grupos de 5 de tal forma que una mortalidad en las primeras 48 horas superior o igual a 2/5 sería causa de finalización del ensayo.

Desarrollo del estudio y descripción de los procedimientos.

Desarrollo del ensayo

Procedimiento de selección de pacientes e inclusión en el estudio

A todos los pacientes candidatos se les completó la historia clínica y el examen físico. A todos se les realizó un electrocardiograma (ECG) de 12 derivaciones y varias determinaciones analíticas (hemograma general, bioquímica, coagulación, datos de función hepática, Proteína C reactiva -PCR-, Péptido natriurético cerebral -NT pro BNP-, Troponina I -TnI-, Creatinfosfoquinasa -CPK- y su fracción muscular -CPK-MB- Además se extrajo sangre para el análisis serológico: VIH (serología VIH-1, VIH-2), VHB (HBsAg, anti-HBc), VHC y VDRL. Se solicitó un Holter de 24 horas, una ergometría limitada por síntomas, un ecocardiograma transtorácico (ETT) y una prueba de determinación de perfusión mediante SPECT. Se realizó una evaluación de la clase funcional para la angina de la Sociedad Canadiense de Cardiología y se cumplimentó el cuestionario de valoración integral al paciente con angina de Seattle. Cuando se corroboró que se cumplía con los criterios de inclusión, por lo que era necesario que se hubiese realizado un cateterismo izquierdo en los 6 meses previos, y no se presentaba ningún criterio de exclusión se solicitó la firma del consentimiento, reiterándose el derecho de abandono en cualquier momento sin merma en su manejo médico. Se realizó la aleatorización a recibir tratamiento celular o el mejor tratamiento posible.

Procedimiento e ingreso hospitalario

A todos los pacientes incluidos se les realizaron las siguientes pruebas:

-Ventriculografía izquierda y coronariografía selectiva (si no se dispone de un estudio previo realizado en los 3 meses previos a la implantación).

-Mapeo electromecánico (MEM) del ventrículo izquierdo utilizando el sistema NOGA.

-Trasplante transendocárdico de progenitores o simulación, según aleatorización, guiado por el sistema NOGA.

-Ecocardiograma inmediatamente tras el procedimiento para evaluar la función ventricular y detectar la existencia de complicaciones.

- Ingreso en la unidad coronaria durante las primeras 24 horas para monitorización de constantes vitales y ECG. Seriación enzimática (CPK, CPK-MB, Tn-I) cada 6-8 horas tras el implante de células.

- Paso a planta si no había complicaciones. Evaluación clínica completa previa al alta hospitalaria.

A la semana del trasplante

Evaluación clínica completa. Analítica general que incluía perfil renal, hepático, hemograma, fórmula leucocitaria y estudio completo de coagulación, PCR y niveles de BNP, hemoglobina glicosilada, y marcadores miocárdicos. Holter de 24 horas y ECG de 12 derivaciones.

4 semanas del trasplante

Evaluación clínica completa. Analítica general. Holter ECG de 24 horas y ECG de 12 derivaciones.

A los 3 meses del trasplante

Evaluación clínica completa. Analítica general. Holter ECG de 24 horas y ECG de 12 derivaciones.

A los 6 meses del trasplante

Control clínico exhaustivo (incluía valoración del estado clínico, revisión del tratamiento farmacológico para comprobar cambios de medicación, registro de eventos adversos, presión arterial, frecuencia cardiaca, peso, exploración general y cardiovascular. ECG de 12 derivaciones. Cateterismo cardiaco que incluyese ventriculografía y coronariografía selectiva. Mapeo electromecánico ventricular izquierdo (MEM). Holter de 24 horas. Ergometría limitada por síntomas. Analítica general. SPECT-TAC. Ecocardiograma transtorácico Evaluación de la calidad de vida mediante el cuestionario de Seattle y Escala de dolor anginoso según la Canadian Cardiovascular Society (CCS).

A los 12 y 24 meses del trasplante

Control clínico exhaustivo (incluía valoración del estado clínico, revisión del tratamiento farmacológico para comprobar cambios de medicación, registro de eventos adversos, presión arterial, frecuencia cardiaca, peso, exploración general y cardiovascular). ECG de 12 derivaciones. Analítica general. SPECT-TAC. Ecocardiograma transtorácico Evaluación de la calidad de vida mediante el cuestionario de Seattle y Escala de dolor anginoso según la Canadian Cardiovascular Society (CCS).

Procedimientos

Mobilización y recolección de células CD 133 de sangre periférica

A todos los pacientes del estudio se les programó para la movilización de células de sangre periférica según el siguiente esquema:

- Se obtuvo una muestra de sangre periférica basal para determinar el porcentaje de células CD133+ como el número total de células CD133+ por centímetro cúbico de sangre.
- Se inició la administración oral del factor estimulante de colonias de granulocitos - G-CSF- (Neupogen[®], Amgen, Thousand Oaks, CA) a razón de 5 µg/kg cada 12 horas los 4 días previos al procedimiento de leucoaféresis. Debido al dolor óseo frecuentemente inducido se les prescribió Paracetamol si no tenían alergia o Metamizol si era así.
- Recolección de células de sangre periférica (leucoaféresis) utilizando el protocolo estándar de recolección de progenitores hematopoyéticos. Se procesó un total de 2-3 volemias.
- Sólo en los pacientes asignados al grupo terapéutico se procedió a la selección de células CD133 positivas, reservando el producto en el resto. Una vez finalizado el proceso se determinó el número total y relativo de células CD133 procediéndose a realizar una selección y enriquecimiento de la muestra utilizando el sistema de CliniMacs (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladback, Germany). Brevemente, el sistema

selecciona las células mediante el uso de anticuerpos conjugados con óxido de hierro, las células que presentan el antígeno específico se verán atraídas por un campo magnético (“magnetically-activated cell sorting”) mientras que pasivamente elimina otros tipos celulares no deseados (p. ej. Linfocitos) ¹¹⁹. El objetivo prefijado era obtener un total de entre 20-30 x 10⁶ células CD133 positivas tras el procedimiento de selección. Se almacenaron muestras para análisis de la viabilidad y pureza.

- Se realizaron los controles de calidad pertinentes (test de esterilidad –Gram y cultivo- y detección de ausencia de Micoplasma).
- Se realizó exclusivamente una leucoaféresis por paciente.

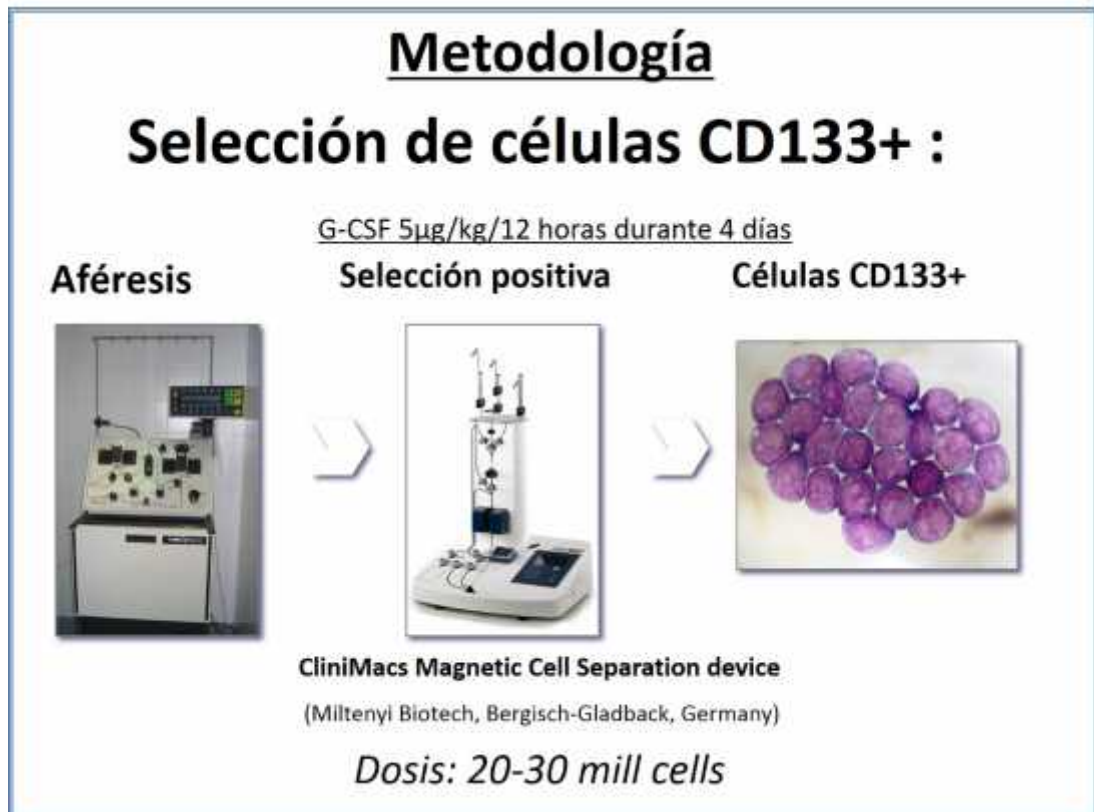


Figura 9. Esquema que representa los pasos a seguir para la obtención de las células a inyectar. En primer lugar se realizara una leucoaféresis al paciente. La volemia procesada se someterá a un proceso de selección y enriquecimiento mediante el sistema CliniMacs. La muestra a inyectar presentara al menos 30 millones de células sin ningún parámetro que indique contaminación de la misma.

Cateterismo cardiaco

Los pacientes fueron sometidos a un cateterismo cardiaco siguiendo este protocolo:

- Acceso vascular vía femoral con catéteres de 8F y posterior técnica de Judkins.
- Se administró heparina a dosis de 35 UI/Kg de peso.
- Se utilizó siempre contraste iónico iso-osmolar.
- Se realizó antes de la coronariografía dos ventriculografías de contraste, de buena calidad, en la proyección oblicua anterior derecha (OAD) a 30 grados con al menos dos latidos contiguos en ritmo sinusal. La velocidad de inyección fue de 10-14 ml/s durante 4 segundos.
- Se midió la distancia tubo-intensificador con la que se realizó la ventriculografía. Si no había contraindicaciones se realizó otra ventriculografía en la proyección oblicua anterior izquierda (OAI) a 60º con ligera cranealidad (10-15º).
- Se grabó una rejilla preparada al efecto en OAD a 30 grados y a la misma distancia tubo-intensificador a la que se realizó la ventriculografía.
- Después de la ventriculografía se realizó una coronariografía selectiva completa. Se requirieron al menos tres proyecciones ortogonales para la arteria coronaria izquierda y dos para la derecha. Al comienzo de la grabación de cada una de las proyecciones de la coronariografía, el catéter estuvo vacío de contraste, debiendo visualizarse dentro del fotograma al menos 3 centímetros de la parte distal del catéter. Se recogió el French, el modelo y la marca del catéter utilizado.

- Se filmó a 15 imágenes por segundo y se grabará en CD-R en formato DICOM. Además de la grabación destinada al archivo convencional, se realizó una grabación específica en CD-R formato DICOM para cada uno de los pacientes del estudio. Cada CD-R angiográfico incluyó únicamente los datos correspondientes a un paciente y una exploración. Cada CD-R se emplazó en su estuche protector y fueron etiquetados con los datos siguientes: a) nombre del estudio b) tipo, fase y fecha de la exploración que contiene; c) Iniciales del paciente; d) número de inclusión en el estudio (nº del Cuaderno de Recogida de Datos); e) datos demográficos del paciente; f) los datos de archivo angiográfico (nº de cateterismo).

Mapeo Electromecánico (MEM)

Después del cateterismo diagnóstico un cardiólogo intervencionista con amplia experiencia en el manejo de catéteres intracardiacos realizó un MEM del ventrículo izquierdo siguiendo el siguiente protocolo:

- Se colocó una plataforma triangular que crea el campo electromagnético por debajo del paciente, anclado en la parte inferior de la mesa del laboratorio de hemodinámica. Se colocó un parche de referencia en la espalda del paciente a la izquierda de la columna vertebral a la altura del corazón. Se heparinizó al paciente para conseguir una ACT entre 250-300 segundos. Se utilizó el mismo introductor femoral 8 French que para el cateterismo. Se eligió la curva del catéter de mapeo Navistar (BSD, Johnson & Johnson Inc.) -pala D o pala F más grande- en función del tamaño de la aorta y del ventrículo izquierdo visualizado en el cateterismo. Se avanzó el catéter de mapeo bajo fluoroscopia a través de la aorta con la punta curvada para evitar posibles embolizaciones de placas ateroscleróticas. Se atravesó la válvula aórtica con la punta curvada (posición máxima de

flexión) con el fin de avanzar el catéter a la cavidad ventricular sin dañarla. Se deflexionó el catéter y se dirigió hacia el ápex ventricular, donde se registró el primer punto. Otro punto en la pared lateral y otro en el septo ventricular fueron adquiridos con el fin de establecer los ejes del corazón. Posteriormente se fueron registrando puntos por toda la superficie endocárdica ventricular izquierda hasta tener construido un mapa que recogía las propiedades electromecánicas del corazón. Todos los puntos debía de cumplir las siguientes características para considerarlos como válidos: estabilidad del tiempo de activación local < 2 ms, estabilidad del punto < 2 mm. Se eliminaron manualmente aquellos puntos internos o que se encontraban fuera de la cavidad ventricular (por ejemplo en la aurícula izquierda) y los que se hubiesen adquirido sin cumplirse los anteriores criterios. Se delineó manualmente la zona diana de inyección, que debe ser aquella en la que se demostraba mediante el acortamiento lineal local y el voltaje unipolar que presentaba isquemia y/o viabilidad.

Protocolo de Inyección de Progenitores Endoteliales Autólogos (CD133+)

Sólo se realizó en pacientes asignados a la terapia celular. Se ajustó la aguja extensible situada en la punta del catéter Myostar (BDS, Johnson & Johnson Inc.) a 0° y 90° y se rellenó el espacio muerto de la aguja con 0,1 cc de la suspensión celular. Para garantizar la seguridad y limitar la posibilidad de inyectar las células fuera del miocardio, en todo momento debía haber una relación extensión de la aguja/grosor muscular $\leq 1/4$. La máxima extensión de la aguja era de 6 mm. Se utilizó el mismo introductor 8 french que en el mapeo electromecánico previo. La curva del catéter de inyección (D y F) se eligió en función del tamaño de la aorta y ventrículo izquierdo visualizados en el cateterismo cardíaco. Se avanzó el catéter de inyección por la aorta bajo visión fluoroscópica y se introdujo en el ventrículo izquierdo atravesando la válvula

aórtica como se refirió en el apartado anterior. La punta del catéter se colocó dentro de los límites de la zona diana previamente delimitada. Cada sitio elegido fue cuidadosamente evaluado previamente a la inyección para aumentar la seguridad de la inyección y confirmar la liberación intramiocárdica de las células. Se tenían que cumplir los siguientes criterios:

- Posición perpendicular del catéter en la pared ventricular;
- Excelente estabilidad (<4 mm);
- UniV en ese punto <6,9 mV;
- Presencia de una extrasístole ventricular al extender la aguja dentro del miocardio.

Un total de 30×10^6 células fueron inyectadas en la zona diana. Cada una de las 15 inyecciones contendrá 0,2 ml de la suspensión de células (concentración de 2 millones de células en cada sitio de inyección). Cada estudio fue grabado en un disco óptico que incluyó únicamente los datos correspondientes a un paciente y una exploración. Cada disco óptico y su estuche protector fueron etiquetados con los datos siguientes: a) nombre del estudio; b) tipo, fase y fecha de la exploración que contiene; c) Iniciales del paciente; d) número de inclusión en el estudio (nº del Cuaderno de Recogida de Datos); e) datos demográficos del paciente; f) los datos de archivo angiográfico (nº de cateterismo).

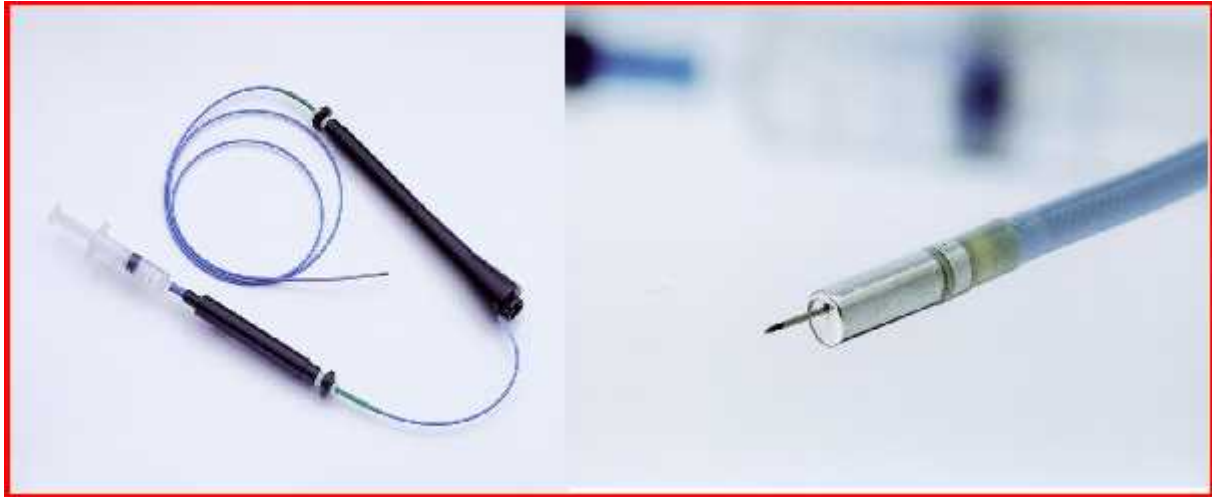


Figura 9. *La imagen de la derecha muestra el catéter Myostar con la jeringa cargada con la suspensión celular. A la derecha el detalle mostrando la aguja del catéter extendida.*

Protocolo SPECT cardíaco

Todos los pacientes se sometieron a un Gated-SPECT-TAC de perfusión miocárdica en reposo y tras el esfuerzo mediante la administración ^{99m}Tc -sestamibi (MIBI). Se administró una dosis de ^{99m}Tc -MIBI basal por vía intravenosa 4 minutos tras la administración de nitroglicerina sublingual y en el pico de esfuerzo o tras la administración de dipiridamol (0,56mg/Kg en 4 minutos). Las imágenes se adquirieron 60 min después de la administración del radiofármaco. Las adquisiciones se practicaron en una tomo-gammacámara de tomografía por emisión de fotón único (SPECT)-tomografía axial computarizada (TAC), en un equipo modelo SPECT-TAC Infinia (General Electric Medical Systems, GE Healthcare) que incorpora un TAC de 4 cortes. Este equipo tiene una resolución espacial en SPECT (C: central; T: transversal; R: radial): C= 9,9 mm, T= 9,9 mm, R= 7,0 mm, y tiene un campo: 540 x 400 mm.. El TAC de corrección de atenuación se realizó con 1mA y 120 kV.

Se obtuvieron 60 proyecciones sobre una órbita semicircular de 180° en modo *step-and-shoot*, iniciada en la posición oblicua anterior derecha a 45° y con detecciones cada 3° de 25 segundos cada una. En el estudio de Gated-SPECT se adquirieron 8 imágenes por ángulo de proyección durante cada ciclo cardíaco. Las imágenes fueron reconstruidas empleando un filtro Butterworth de orden 5 y frecuencia de corte de 0,4 ciclos/ píxel, obteniéndose los cortes de eje corto, eje largo horizontal y eje largo vertical. El VI se dividió en 17 segmentos ¹²⁰: 1- anterior basal. 2-anteroseptal basal. 3-inferoseptal basal. 4-inferior basal. 5 inferolateral basal. 6-anterolateral basal. 7-anterior medio. 8-anteroseptal medio. 9 inferoseptal medio.

10-inferior medio. 11-inferolateral medio. 12-anterolateral medio. 13-anterior apical. 14-septal apical. 15-inferior apical. 16-lateral apical. 17-ápex puro.

A cada uno de éstos se le asignó una puntuación de 1 a 4 según el nivel de captación: 1 = normal, 2 = defecto ligero, 3 = defecto moderado y 4 = defecto severo. Todos los estudios fueron validados con el consenso entre 2 observadores expertos, calculándose los índices de perfusión en reposo y en estrés (suma de la puntuación en reposo y en estrés). Además se informó sobre el número de segmentos con defectos reversibles e irreversibles. Del estudio Gated-SPECT-TAC de reposo se calcularon los volúmenes y la FE del VI mediante un algoritmo de cuantificación automática que opera tridimensionalmente y que utiliza el volumen de la cavidad ventricular en las imágenes sincronizadas de eje corto.

Protocolo Ecocardiograma

Se realizó con equipos que presentaban transductores multielemento de cristales piezoeléctricos -antena- en fase (phased array). El estudio se llevó a cabo según los estándares de calidad de la Sociedad Americana de ecocardiografía ¹²¹. Se anotaron las dimensiones de todas las cámaras y los espesores parietales. Se valoró la función sistólica segmentaria en los distintos planos (16 segmentos) informándose cada segmento como normocinético (grado 1), hipocinético leve (grado 2), hipocinético severo (grado 3), acinético (grado 4) y discinético (grado 5). Con estos datos se calculó el índice de motilidad parietal o “wall motion score” – WMS- como la suma de todos los niveles de contractilidad de cada segmento dividido entre el número de los mismos. La función sistólica global se estudió mediante el método de Simpson biplano. Se cuantifico la severidad de las valvulopatías, siendo leve el grado I, leve a moderado grado II, moderado a severo grado III y severo grado IV. La presencia de derrame

pericárdico se evaluó como leve cuando es menor de 10 mm, moderado entre 10 y 20 mm y severo cuando es mayor de 20 mm.

Protocolo Holter ECG

Sobre el tórax limpio y rasurado se emplazaron las pegatinas-electrodos en las distintas posiciones internacionalmente determinadas para registro y sobre las mismas se acoplaron los cables del registrador diferenciados por colores. El registrador era de lectura automática. El registro debía mostrar al menos 3 derivaciones electrocardiográficas y el registro mínimo fue de 24 horas. Las variables que se analizaron fueron la frecuencia cardiaca (Fc) media, la Fc máxima, la Fc mínima, la desviación máxima del ST en cualquier variación, las pausas mayores de 3 segundos, la presencia de bloqueos AV mayores de 1 grado y la presencia de fibrilación auricular (mayor de 30 segundos).

Protocolo analítico

La cuantificación analítica se realizó con los distintos equipos de determinación, todos testados y estandarizados para su función y se llevó a cabo por el servicio de análisis clínicos de cada hospital, comprobándose que la técnica era homologable para cada determinación. De forma prioritaria se exploró los cambios en la concentración de hemoglobina, del NT-proBNP, de la hemoglobina glicosilada, de la creatinina y de la proteína C ultrasensible.

Protocolo test de Seattle

El test de Seattle fue desarrollado en 1995 por John Spertus y sus colaboradores¹²² con el fin de obtener una evaluación clínica global de los enfermos con patología coronaria estable. Este test serviría para la comprobar la eficacia de distintos tratamientos más allá de los distintas

variables hasta entonces utilizadas, donde no se estudiaban los múltiples factores que pueden afectar a la evaluación terapéutica, como la adhesión al tratamiento, el status psicológico o la capacidad física del enfermo. El test está dividido en 5 dominios: el primero explora la capacidad física del enfermo preguntando sobre la capacidad para realizar distintas actividades dejando la opción para que el paciente muestre que se encuentra limitado por otras causas. El dominio 2 (cuestión 2) explora la estabilidad de la angina mientras que el dominio 3 (cuestiones 3 y 4) evalúa la frecuencia de los episodios anginosos. El dominio 4 explora (preguntas 5 a 8) la satisfacción del tratamiento recibido, cuestión esencial para inferir la adhesión al mismo, mientras que el dominio 5 evalúa la percepción por el enfermo sobre la limitación que tiene su enfermedad en la calidad de vida (cuestiones 9 a 11) permitiendo estimar de una forma sencilla cambios en la calidad de vida. Cada dominio está validado frente a otros test que exploran la actividad física, la calidad de vida o la frecuencia de angina con una correlación significativa. El test podía ser rellenado por el paciente o ser rellenado por el personal del estudio realizando las preguntas al enfermo, generalmente en no más de 5 minutos.

La puntuación del test se informó por dominio, la puntuación de cada uno se expresó como la suma de los valores de cada respuesta en cada ítem, sabido que por pregunta los valores varían del 1 al máximo valor ordinal (1 peor respuesta a 5 o 6 a la mejor respuesta) siendo 0 cuando no es aplicable o no se contesta.

Protocolo Ergometría

Se realizó una prueba libre de cinta sin fin (ergometría) siguiendo el protocolo de Naughton¹²³ de 2 minutos por etapa con un MET de incremento por etapa. Se registró de forma

prioritaria el tiempo total de ejercicio, el tiempo hasta la angina y la capacidad funcional evaluada en equivalentes metabólicos METs.

Procesamiento y estudio funcional in vitro de los progenitores endoteliales

Cultivo celular:

Parte de la fracción de células CD133 positivas obtenidas por leucoaféresis se resuspendió en medio de cultivo para células endoteliales MV2 completo estéril (PromoCell, Heidelberg, Germany) suplementado con 50 µg/ml de gentamicina. A continuación, las células se sembraron en placas de 24 pocillos previamente tapizadas con 10 µg/ml de fibronectina humana (Sigma Aldrich Química SL, Madrid, Spain), ajustándolas a una concentración final de 10⁶ cél/ml. Las placas se mantuvieron en una estufa a 37° C y 5 % de CO₂ durante 7 o 14 días, realizándose cambios del medio de cultivo cada 3-4 días.

Una vez cultivadas, a los 7 o 14 días, las células se levantaron con tripsina para realizar los estudios por citometría de flujo. Brevemente, se recogió el sobrenadante de los pocillos correspondientes en un tubo de 10 ml. A continuación se añadió 100 µl de tripsina-EDTA (Biowest, Nuaille, Francia) a cada pocillo, tras 5 minutos de incubación en la estufa se recogió el sobrenadante en el tubo anteriormente mencionado y se neutralizó la tripsina con un volumen igual de suero bovino fetal (Biowest, Nuaille, Francia) que también se recogió en el tubo de 10 ml. Finalmente se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a temperatura ambiente a 2000 rpm, se deshechó el sobrenadante y se resuspendieron los precipitados en PBS 1x.

Análisis de la capacidad de formación de colonias:

Después de 7 y 14 días de cultivo se contó el número de unidades formadoras de colonias por pocillo mediante un microscopio invertido de contraste de fases, considerándose colonias a agrupamientos de células fusiformes distribuidas alrededor de un núcleo de células redondeadas.

Estudio de la formación de microtúbulos en matriz tridimensional:

Como parte de los estudios de funcionalidad de las células endoteliales progenitoras se analizó la capacidad de formación de microtúbulos de las células CD133 positivas en cocultivo con Células Endoteliales de la Vena del cordón Umbilical (HUVECs. Innoprot, Bizcaia, Spain).

Para ello se sembraron las células CD133 positivas en medio MV2 completo estéril con gentamicina, en placas de 48 pocillos previamente tapizadas con 100 μ l de matrigel (gel ECM de sarcoma murino EHS. Sigma Aldrich Química SL, Madrid, Spain), a una concentración final de $1,5 \times 10^5$ cél/ml. Tras 24 horas de cultivo en una estufa a 37^o C y 5 % de CO₂, se añadió al medio 6 μ g/ml de LDL acetilada marcada con Dil (DiI_{Ac}LDL. Tebu-Bio, Yveline, France) y se dejó incubando 2 horas en la estufa, tras las cuales se retiró el sobrenadante y se lavaron las células con PBS 1x atemperado. A continuación, se añadió a cada pocillo con células CD133 positivas las HUVECs a una concentración final de 1×10^5 cél/ml y medio de cultivo MV2 hasta un volumen final de 200 μ l/pocillo. Pasados 3-4 días los pocillos se incubaron durante 1 hora con lectina de *Ulex europeus* (Sigma Aldrich Química SL, Madrid, Spain) a una concentración final de 20 μ g/ml, se lavaron con PBS 1x atemperado y se observó la formación de microtúbulos a 20-40 aumentos en un microscopio de fluorescencia.

CITOMETRIA DE FLUJOEstudio de la expresión de marcadores de superficie:

Para el estudio de fenotipo tanto de las células aisladas como en cultivo se utilizó la técnica de citometría de flujo que se basa en el marcaje de las células con anticuerpos conjugados con sondas fluorescentes que reconocen específicamente antígenos de la superficie de la membrana celular. Se utilizó el citómetro de flujo modelo Gallios (Beckman Coulter Inc) equipado con 3 láseres, uno azul que emite a una longitud de onda de 488 nm, otro rojo que emite a una longitud de onda de 633nm y otro violeta que emite a una longitud de onda de 405 nm. También presenta detectores de tamaño y complejidad celular así como 10 detectores de fluorescencia para diferentes fluorocromos. El citómetro de flujo permite analizar o no la expresión de antígenos de superficie celular al excitar los láseres los fluorocromos conjugados con los anticuerpos específicos para cada antígeno. Se utilizaron diferentes antígenos de superficie anti-CD45-FITC (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), anti CD133-PE ((Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), anti CD34-PC7 (Beckman Coulter Inc, Miami, Florida, USA), anti CD14-PC5, anti-CD31- FITC (eBioscience Inc, San Diego,CA, USA) anti-TIE2-Alexa Fluor 488 (BD Biosciences, San Jose CA, USA), anti KDR Alexa Fluor 700 (BD Biosciences, San Jose CA, USA), anti-CD144-Alexa Fluor 700 (eBioscience Inc, San Diego,CA, USA).

El marcaje se realizó añadiendo a la suspensión celular (células aisladas “frescas” o de cultivo celular) el volumen especificado por la casa comercial de cada uno de los anticuerpos: 5µL de los anticuerpos anti-CD144-Alexa Fluor 700, anti-TIE2-Alexa Fluor 488 y anti-CD31-FITC ; 10µL de los anticuerpos anti-CD45-FITC, anti CD133-PE, anti CD34-PC7 y anti CD14-PC5; 20 µL del anticuerpo anti KDR Alexa Fluor 700; se utilizaron los correspondientes isotipos como tubos

control. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, una vez transcurrido ese tiempo se analizaron inmediatamente en el citómetro de flujo. Para realizar la detección simultánea de diferentes antígenos de superficie se seleccionaron según su espectro de emisión para que no hubiera solapamiento según los láseres utilizados. Los resultados de citometría se expresaron como porcentaje de célula marcada.

Análisis de la actividad Aldehído Deshidrogenasa (ALDH):

Para determinar la actividad aldehído deshidrogenasa se utilizó el kit ALDEFLUOR™ (Stemcell Technologies, Vancouver, Canadá) Este kit consta de un reactivo fluorescente no tóxico (BODIPY aminoacetaldehído (BAAD)) cuyo espectro de emisión es similar al de FITC, que difunde libremente en células viables a través de la membrana plasmática y al ser metabolizado por la enzima ALDH se convierte en un compuesto cargado negativamente (BODIPY aminoacetato (BAA)) que se acumula en el interior celular gracias a un inhibidor de las bombas de flujo MRD presente en el buffer del kit. Como control negativo se utiliza un potente inhibidor de la enzima ALDH, el dietilbenzaldehído (DEAB).

El protocolo seguido para este ensayo consistió en incubar una muestra de células CD133⁺ aisladas (10^6 cél/mL) o células despegadas tras 7 y 14 días de cultivo ($0,3 \times 10^6$ cél/ml) con el buffer del kit en un volumen final de 1 mL con el reactivo fluorescente que posteriormente se repartió en dos muestras de volumen final 500 μ L. Una correspondía al tubo control al que se le añadió el inhibidor DEAB y otra el tubo problema para analizar. Ambas muestras se incubaron a 37°C durante 50 minutos en oscuridad, transcurrido ese tiempo se realizó una centrifugación de 5 minutos a 250G, y el pellet celular de cada tubo fue resuspendido en 500 μ L de Aldeafleur

Assay Buffer TM. Inmediatamente se analizaron por citometría de flujo. Las células fueron adquiridas por citometría de flujo en modelo Gallios (Beckman Coulter Inc, Miami, Florida, USA) equipado con software de análisis Gallios (versión 1.1, Beckman Coulter Inc, Miami, Florida, USA) según las especificaciones del kit ALDEAFUOR TM.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con intención de tratar y se utilizaron los paquetes estadísticos SPSS (versión 15.0) y STATA (versión 9.0). Las variables cuantitativas se describieron con su media y la desviación estándar o como mediana y rango intercualtilico cuando la distribución mostrase grandes irregularidades. Las variables cualitativas se expresaron en frecuencia absolutas y porcentajes. En el análisis de dos medias independientes se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. En la evaluación de más de dos medias independientes se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Para determinar la significación estadística de dos variables cuantitativas se utilizaron la prueba de regresión lineal mientras que si se trataban de variables cualitativas se emplearon la prueba de Chi cuadrado o la prueba exacta de Fisher. En el análisis de datos apareados (“antes-después”) se utilizaron las pruebas de simetría exacta de McNemar (proporciones), de Wilcoxon y de Friedman (medias). Para el análisis estratificado se empleó el análisis de la Covarianza (ANCOVA) donde se analiza el efecto terapéutico en función de otras covariables cuando se cumplen los supuestos de aplicación. Para evaluar la significación estadística de la diferencia de probabilidad de eventos adversos mayores entre los grupos se emplearon modelos de regresión específicos (regresión Bayesiana). Al considerarse un estudio piloto el tamaño muestral no fue calculado a priori. Todos los análisis se realizaron con intención de tratar empleándose el paquete estadístico SPSS 15.0 o STATA 9.0 mostrándose sólo el valor exacto de la p cuando esta fue menor de

0,05. Los datos analizados corresponden a los 6 primeros meses de seguimiento realizado en todos los pacientes.

Al tratarse de un estudio multicéntrico la recolección de los datos de seguimiento y su análisis transcurre más lentamente de lo que se planeó en un inicio por lo que sólo se pueden mostrar los resultados de los primeros seis meses.

RESULTADOS

Descripción de la muestra

Durante un periodo de 5 años de reclutamiento, se evaluaron a 237 pacientes. 209 fueron excluidos por diversas razones: 140 por no cumplir los criterios de inclusión o alguno de exclusión. 32 declinaron participar y 37 abandonaron antes del procedimiento o desarrollaron alguna patología que les excluía del procedimiento.

Finalmente 28 pacientes fueron incluidos en el estudio. 19 se asignaron al grupo terapéutico y 9 al grupo control (**Figura 10**)

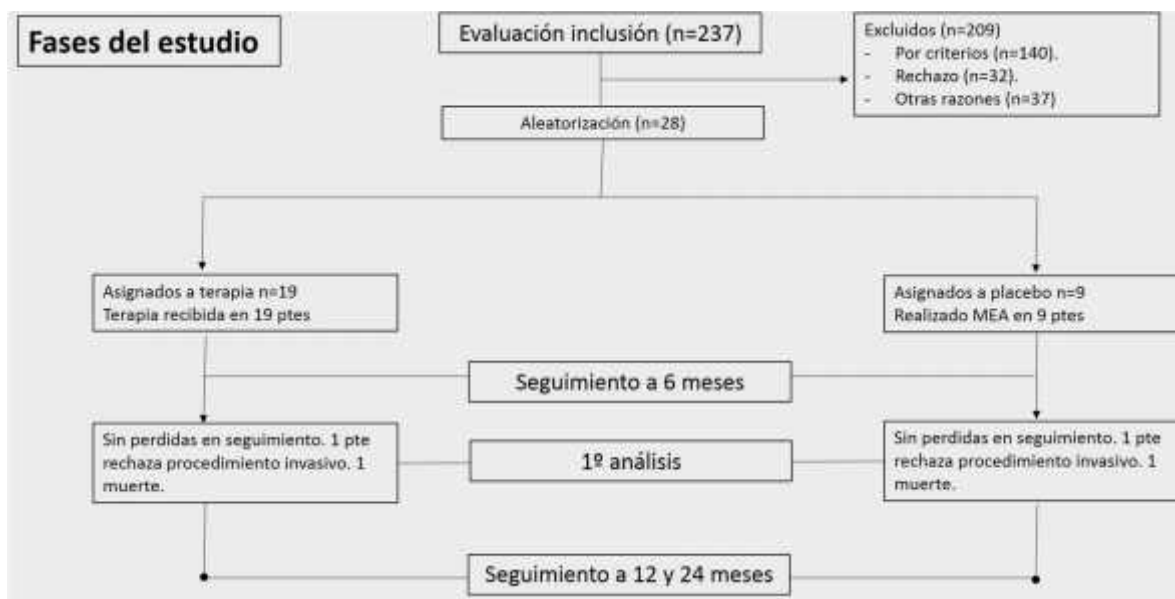


Figura 10. Flujo de desarrollo del estudio PROGENITOR. MEA Mapeo electro-anatómico.

La edad mediana de la muestra era de 64,4 (RIQ 15,1) años. 24 (85,7%) eran varones. Un 14,3% (4) eran fumadores, 53,6% (15) eran diabéticos, 89,3% (25) eran hipertensos y un 82,1% (23) hipercolesterolémicos.

Un 46,4% (13) habían sufrido previamente un infarto de miocardio, un 10,7% (3) presentaban claudicación intermitente y otro 10,7% (3) insuficiencia renal crónica.

Con respecto al tratamiento, el 82,1% (23) tomaba Inhibidores de la Enzima Convertidora de la Angiotensina (IECA), un 85,7% (24) tomaban Beta-bloqueantes, un 82,1% (23) tomaba formulas orales o transdérmicas de Nitroglicerina, un 46,4% (13) tomaba Antagonistas del calcio, un 14,3% (4) tomaba Ivabradina, todos tomaban Estatinas y todos tomaban Ácido acetilsalicílico. Un 67,9% de los pacientes (20) tomaba Clopidogrel, un 7,1% (2) tomaba Acenocumarol/Warfarina.

Clínicamente el 100% de los pacientes tomaban al menos 2 antianginosos con un frecuencia promedio de angina mensual de 13 (SD 9,2) episodios al mes, con un consumo mensual promedio de nitroglicerina sublingual de 6 unidades/mes (SD 6). La mediana de la clase funcional de la CCS (Cardiology Canadian Society) era de 3 (RIQ 2).

La FEVI media era de un 53% (SD 11), la media del índice de motilidad regional (WMS) era de 1,4 (SD 0,4), un 43% (12) presentaban una insuficiencia mitral $\geq 2^{\circ}$ y el diámetro telediastólico medio fue de 53,1 mm (SD 8,1).

26 (92,9%) pacientes se habían sometido a un procedimiento de revascularización previo; 23 pacientes se habían sometido a un procedimiento de revascularización percutánea y un 46,4% (13) a un procedimiento de cirugía de derivación aortoconario (bypass). La mediana de segmentos coronarios enfermos (estenosis mayor del 50%) era de 4 por paciente

(RIQ 6), con una mediana de vasos coronarios epicárdicos principales con estenosis significativas de 3 (RIQ 3). La fracción de eyección (FEVI) evaluada por angiografía fue del 55% (RIQ 45%).

Estratificado por grupos terapéuticos encontramos de forma general una muestra bien balanceada observándose tan solo dos diferencias estadísticamente significativas. Así en el grupo terapéutico la edad media fue superior al del grupo control. Asimismo un mayor porcentaje de pacientes en el grupo control tomaban antagonistas del calcio no dihidropiridínicos y dihidropiridínicos. La **tabla 5** muestra las características clínicas de los pacientes del grupo terapéutico frente al grupo control.

Características basales	Grupo terapéutico (n=19)	Grupo control (n=9)	Valor de la P
Edad en años (RIQ)	70 (12,3)	58,2 (18)	0.02
Hombre, n (%)	15 (78.9)	9(100.0)	NS
Fumador, n (%)	3 (16)	1 (11)	NS
Diabético, n (%)	10 (52)	5 (55)	NS
HTA, n (%)	16 (84)	9 (100)	NS
Hipercolesterolemia, n (%)	17 (89)	6 (66)	NS
IMC en Kg/m2 (RIQ)	29 (6)	29,3 (2)	NS
Infarto previo, n (%)	13(68.4)	6(66.7)	NS
Revascularización pre, n (%)	17(89.5)	9(100)	NS
Enfermedad vascular periférica, n (%)	2 (10,5)	1 (11,1)	NS
IECA, n (%)	17(89.5)	7(77.8)	NS
B-Bloq, n (%)	18(94.7)	7(77.8)	NS
Nitratos, n (%)	16(84.2)	8(88.9)	NS
Estatinas, n (%)	19 (100)	9(100)	NS
Antag. Ca, n (%)	8(42.1)	6(66.7)	0,042
AAS, n (%)	18(94.7)	8(88.9)	NS
Clopidogrel, n (%)	15(78.9)	5(55.5)	NS
Nº episodios angina/mes. (RIQ)	12 (22)	10 (6)	NS
Nº NTG/mes (RIQ)	4 (10)	5 (7)	NS
CCS	3(1)	3(1)	NS
FEVI en % (RIQ)	51 (23)	55(12,3)	NS
Diámetro Telediastólico en mm (RIQ)	52 (13)	50 (6)	NS
Nº segmentos coronarios enf. \pm SD	4,2 \pm 1,3	3,83 \pm 1,8	NS
Hemoglobina (g/dl) \pm SD	13,9 \pm 0,7	14,7 \pm 0,6	NS
Creatinina (mg/dl) \pm SD	1,2 \pm 0,3	1,3 \pm 0,4	NS
NT-proBNP \pm SD (pg/ml)	380 \pm 332	256 \pm 180	NS
Proteína C reactiva (RIQ) (mg/dl)	0,27 (0,53)	0,13 (0,6)	NS
Hb1c \pm SD (%)	6,6 \pm 0,9	7,0 \pm 1,9	NS
Frecuencia cardiaca promedio (lpm) \pm SD	69 \pm 14,7	72 \pm 10,6	NS
QRS (ms) \pm SD	104 \pm 22,8	105 \pm 19,2	NS

Tabla 5. Los datos se muestran como mediana y rango intercuartílico, como medias y desviación estándar o como número absoluto y su porcentaje.

Estudios de las características y funcionalidad in vitro

La pureza de células CD133+ fue del 94,5% con una alta viabilidad (**Tabla 6**). La expresión de antígenos CD133+, CD34+ y la actividad ALDH disminuyó en los cultivos celulares entre el 7º y el 15º día. Sin embargo la expresión de marcadores endoteliales (KDR, VE-Cadherin, P1H12, TIE-2, Dil-Ac-LDL) se incrementó en cultivo entre el 7º y el 15º. Todo ello fue congruente con una maduración de los progenitores endoteliales. El análisis funcional mostró además que las células adquirirían las capacidades de células endoteliales maduras (**Figura 11**).

	Células inyectadas basal	A los 7 días en cultivo	A los 14 días en cultivo	Onda P
Viabilidad (7-aminoactinomicina-D).%	97,3 (2,5)			
Nº CD133 por millón	65,2 (62,9)			
Dosis celular (por millón)	30 (6)			
Nº CD45+/Nº Células (%)	98,7 (2,7)	94,1(7,9)	94(10,7)	0,006
Nº CD133+/Nº Células (%)	94,5 (6,9)	40,6 (69,3)	7,8 (23,4)	<0.001
Nº CD34+/Nº Células (%)	93,7 (11)	30,2 (60,6)	2,2 (3,6)	<0.001
Nº CD14+/Nº Células (%)	0,7 (2,3)	0,2 (2,9)	0,8 (13,1)	NS
Nº CD31+/Nº Células (%)	63,5 (55,9)	63,1(30,6)	73,4 (7,4)	NS
Nº CD117+/Nº Células (%)	27,9 (35,2)	41,1(30,3)	36,3 (18)	NS
Nº KDR+/Nº Células (%)	0,3 (2,2)	3,3 (6,4)	5,7 (8,7)	0.006
Nº VE-Caderina/Nº Células (%)	0,6 (1,8)	25,8 (36,3)	43,4 (28,1)	<0.001
Nº P1H12/Nº Células (%)	0,2 (0,3)	4,5 (11,3)	13,3 (21,1)	<0,001
Nº Tie+/Nº Células (%)	2,4 (2,9)	11,5 (15,1)	21,3(36)	<0,001
Análisis funcional				
UFC		3,2 (17)		
ALDH ^{Bright} (%)	88,3(11,8)	11,2 (20,3)	2,2 (12,4)	<0.001
Dil-AcLDL (%)		84,0 (20,2)	91,2 (13,1)	NS
Formación Microtúbulos (%)		100		

Tabla 6. Los datos son expresados como mediana y rango intercuartílico o porcentaje. UFC Unidad Formadora de Colonias. ALDH^{Bright} indica Aldehído deshidrogenasa; KDR, receptor del factor de crecimiento endotelial vascular tipo 2; Tie, indica el receptor tirosina quinasa; P1H12 anticuerpo frente a CD146 (Endo-CAM) y VE, vascular endotelial. UFC hace referencia a Unidad Formadora de Colonias. Dil-AcLDL hace referencia a LDL acetilada marcada con una molécula fluorescente (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate).

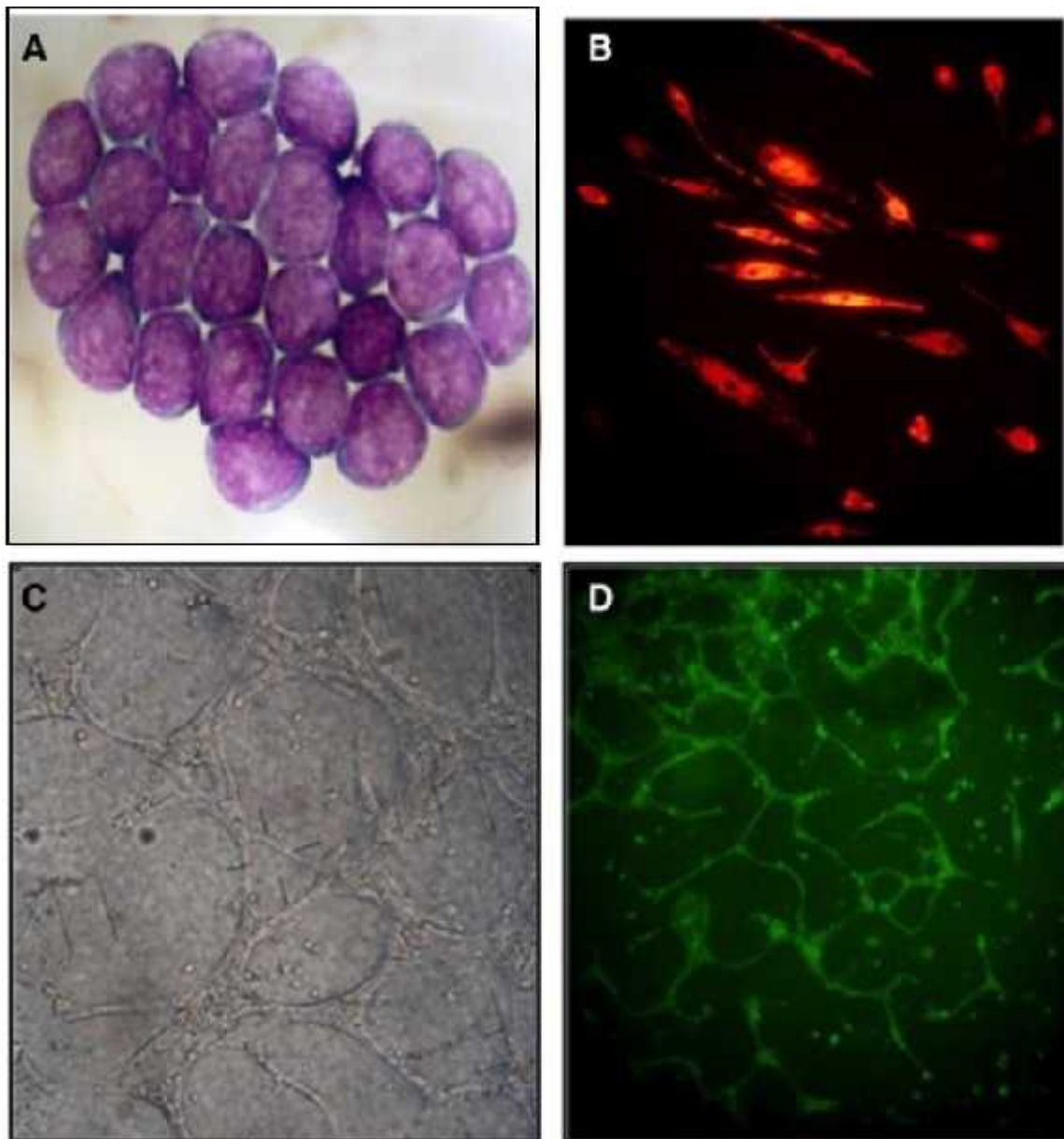


Figura 11. **A** Tinción con hematoxilina-eosina de las células recién seleccionadas (CD133+). Se observa la característica morfología de célula hematológica inmadura con una forma redondeada, núcleo prominente y escaso citoplasma. **B** Tinción fluoroscópica AcDiLDL de las células tras 2 meses de cultivo indicando su maduración endotelial. **C** De igual modo el cocultivo con células de la vena umbilical humana (HUVEC) -2×10^5 células y 2×10^5 células, respectivamente- en un gel de matriz extracelular y factor de crecimiento endotelial (50 ng/ml de VEGF) permitió observar el desarrollo de estructuras tubulares (x 20 aumentos) y en **D** teñidos con lecitina del *Ulex Europeus*.

Resultados inmediatos del procedimiento

A todos los pacientes se les pudo realizar el procedimiento, elaborando un mapeo electroanatómico preciso en todos los sujetos y la inyección de células madre a los pacientes asignados al grupo terapéutico. En este grupo 18 pacientes recibieron 30 millones de células progenitoras endoteliales CD133+ (dosis media $0.4 \pm 0.1/\text{kg}$) y tan sólo uno recibió 24×10^6 de células CD133+.

Después del procedimiento en un paciente se registró una elevación significativa de los marcadores de necrosis miocárdica sin cambios electrocardiográficos o alteraciones ecocardiográficas ¹²⁴. La mediana de la concentración de Troponina I fue de 1,3 (1,0-2,0) ng/ml.

Durante la estancia hospitalaria se registraron tres eventos adversos mayores:

Un paciente en el grupo control presentó una parada cardiorrespiratoria por fibrilación ventricular a las 24 horas del procedimiento. Se realizó una desfibrilación precoz y la recuperación transcurrió sin secuelas, antes del alta hospitalaria el paciente se sometió al implante de un desfibrilador.

Otro paciente en el grupo terapéutico presentó un episodio de fibrilación ventricular durante el procedimiento de mapeo que fue desfibrilado sin mayores consecuencias. Este paciente no presentaba indicación de DAI por prevención primaria y se interpretó el evento en el contexto de una manipulación excesiva e inducción mecánica de una TV polimórfica.

La complicación más grave ocurrió en un paciente del grupo terapéutico. Durante la inyección se produjo una perforación cardiaca cerca del anillo mitral sufriendo un taponamiento cardiaco inmediato. Se realizó una pericardiocentesis consiguiendo estabilizar al paciente que se sometió a una cirugía cardiaca reparadora. Desafortunadamente el paciente falleció por shock cardiogénico en el postoperatorio inmediato.

Eficacia evaluada por la entrevista clínica y el cuestionario de Seattle

A los seis meses de seguimiento el número de episodios de angina y el consumo de nitratos de corta duración disminuyó de forma significativa en el grupo terapéutico (**Figuras 12 a la 14**). Se observó una diferencia absoluta de 8.5 episodios menos (IC 95%; -15.0 a -4.0) y una diferencia absoluta en el consumo de nitratos de corta duración de 3.5 unidades menos (IC95%; -5,2 a 0.0). Alternativamente no se encontraron cambios significativos en el grupo control [diferencia absoluta 1.5 episodios menos, (IC95%; -8.7 a 15.0) y 0.5 unidades menos (95%CI; -6.5 a 0.5), respectivamente]. Por otro lado, la clase CCS mejoró significativamente en el grupo terapéutico con disminución promedio en la escala de 1 nivel, (95%CI; -2.0 a 0.0) mientras que no se observaron cambios en el grupo control (diferencia absoluta 0.0, (IC95%CI; -1.0 a 0.5).

Sin embargo en el análisis estratificado entre grupos no se observaron diferencias significativas:

- Diferencia absoluta de episodios anginosos mensuales menos de 4,6 episodios en el grupo terapéutico [IC 95%:-13,2 a 4,0; p=0,28].

- Diferencia absoluta de consumo de nitratos de acción rápida/mes fue de 4,6 comprimidos menos [IC 95%: -11,3 a 2,0; p=0,14].
- Diferencia absoluta en la clase funcional CCS fue de 0,6 menor [IC 95%: -1,2 a 0,01; p=0,13].

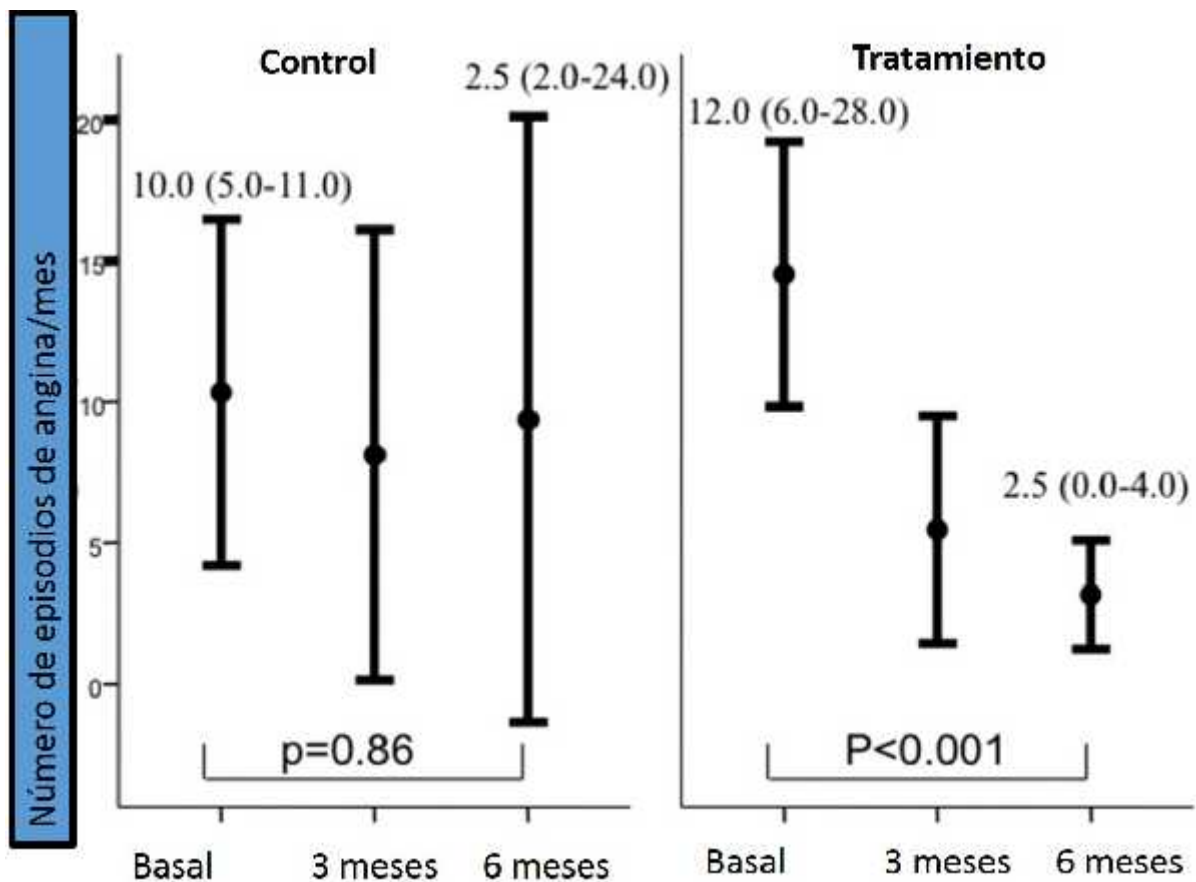


Figura 12. Cambio en el promedio de episodios de angina mensual en los grupos a lo largo del seguimiento (3 y 6 meses). El eje Y representa el intervalo de confianza al 95% y el eje X los diferentes puntos de tiempo.

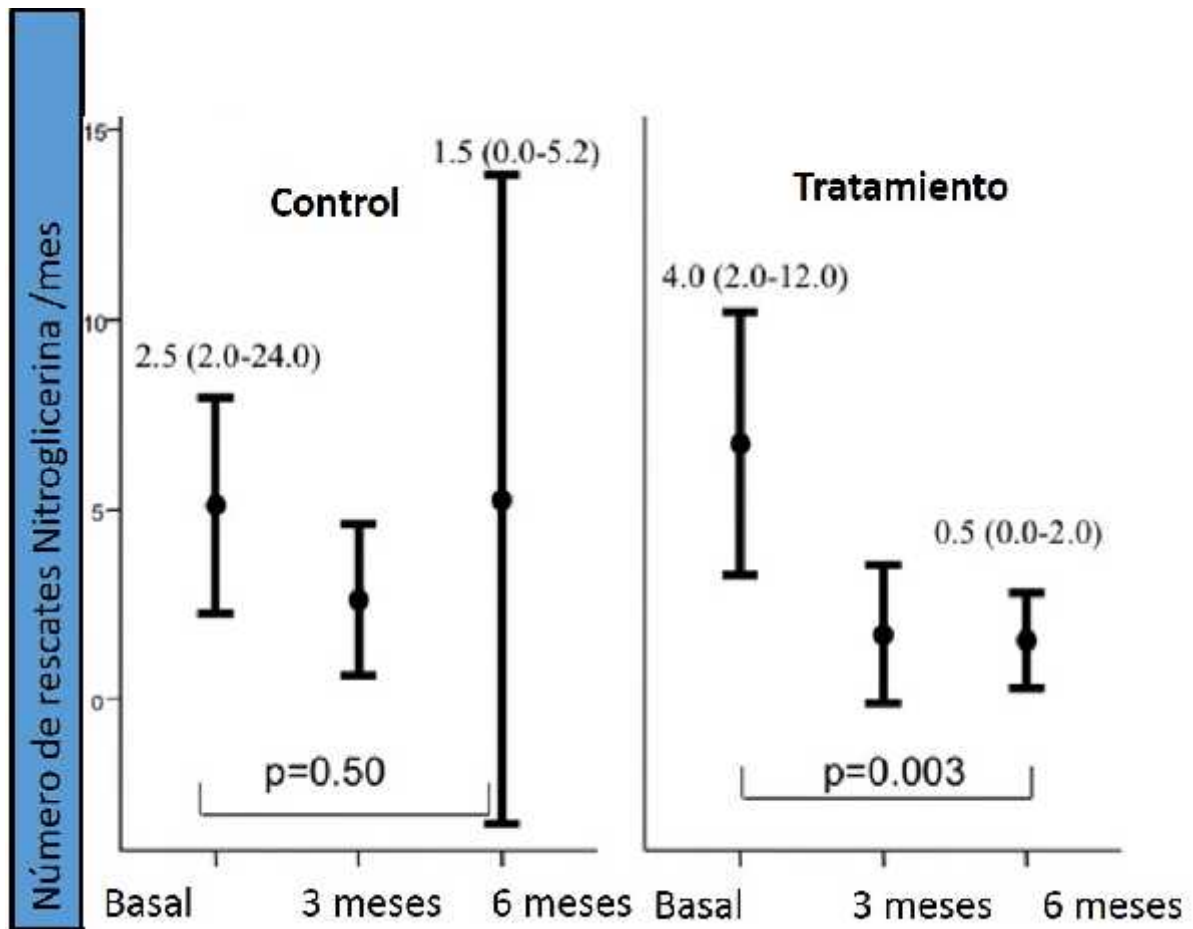


Figura 13. Cambio en el promedio en el consumo de Nitroglicerina de acción rápida mensual en los grupos a lo largo del seguimiento (3 y 6 meses). El eje Y representa el intervalo de confianza al 95% y el eje X los diferentes puntos de tiempo.

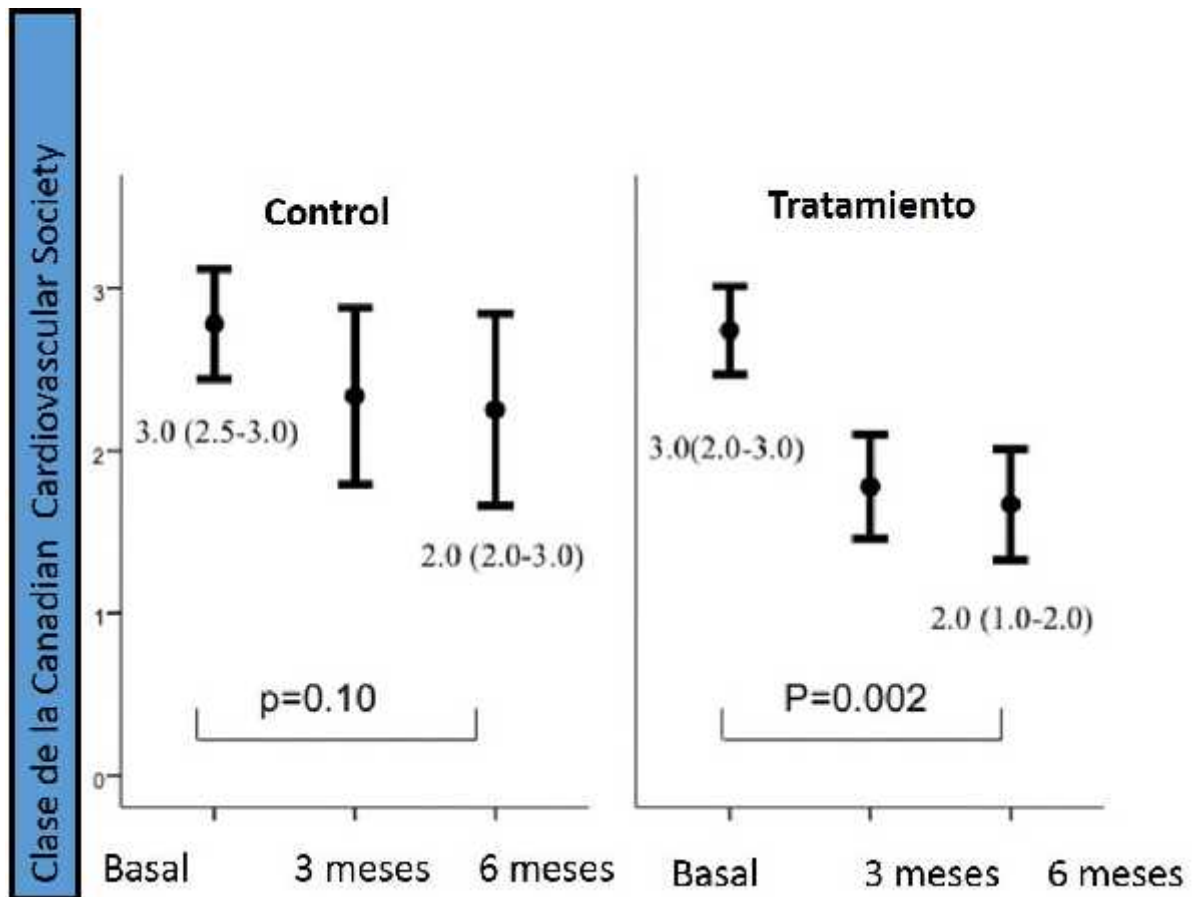


Figura 14. Cambio en la clase funcional de la Canadian Cardiovascular Society en los grupos a lo largo del seguimiento (3 y 6 meses). El eje Y representa el intervalo de confianza al 95% y el eje X los diferentes puntos de tiempo.

El análisis de los cuestionarios de Seattle reveló que basalmente los pacientes en el grupo terapéutico presentaban, de forma estadísticamente significativa, una peor capacidad funcional, evaluada en el dominio de actividad física, y una mayor frecuencia de angina, evaluado por el dominio específico, con respecto al grupo control. Tras el procedimiento los pacientes asignados al grupo terapéutico experimentaron mejoría clínica, tanto en su capacidad funcional, como en la frecuencia de la angina y en la percepción del tratamiento recibido. Esto no fue observado en el grupo control. Sin embargo el análisis ajustado con

respecto a los valores basales y la edad no mostró que existiesen diferencias significativas entre grupos en ninguno de los dominios evaluados a los 6 meses (**Tabla 7**).

	Basal	3 meses	6 meses	P intragrupo
Actividad física control	32,5(11,8)	33(16)	29,9(14)	NS
Actividad física tratamiento	24(5,5)	31(14,25)	30,5(6,75)	0,01
P intergrupo	0,02		NS*	
Estabilidad angina control	3(1)	3(1)	3(1)	NS
Estabilidad angina tratamiento	3(1)	3(1)	5(3)	NS
P intergrupo	NS		NS*	
Fr. Angina control	9,5(2)	10(3)	10(7)	NS
Fr. Angina tratamiento	7(3,25)	8,5(4,5)	10,5(3,25)	0,001
P intergrupo	0,04		NS*	
Satisfacción control	16(4)	16(4)	18(5)	NS
Satisfacción tratamiento	19(4,5)	19(4,25)	19(3)	NS
P intergrupo	NS		NS*	
Percepción enf. control	8(3,8)	8(4)	10(3)	NS
Percepción enf. tratamiento	6(5)	9(4,25)	9,5(5,25)	0,001
P intergrupo	NS		NS*	

Tabla 7. Puntuación en el test de Seattle por dominios a lo largo del seguimiento del estudio. Los datos se muestran como la mediana de puntuación y su rango intercuartílico. A mayor puntuación en cada dominio mejor situación clínica o calidad de vida apreciada subjetivamente. El asterisco indica que el valor de la P está ajustado por el valor basal y la edad.

Eficacia evaluada por las pruebas.

Perfusión miocárdica evaluada por SPECT.

La **tabla 8** muestra los parámetros evolutivos de la perfusión miocárdica evaluada mediante Gated-SPECT durante el seguimiento, tanto en el grupo control como en el terapéutico. Se observó durante el seguimiento en el grupo terapéutico una disminución de los segmentos con isquemia reversible y, sorprendentemente, con defectos irreversibles aunque dichos cambios no alcanzaron la significación estadística. No obstante la sumatoria del valor de perfusión de cada segmento (17 segmentos, siendo el valor 1 perfusión normal) tanto en reposo como en el pico de estrés mostro una disminución significativa a los 6 meses, fenómeno que no ocurrió en el grupo control (**Figura 15**). Sin embargo en la comparación entre ambos grupos el análisis tampoco demostró una mejoría en términos de perfusión.

	Tratamiento (n=17)	Control (n=7)	Diferencia absoluta*(IC95%)	Diferencia absoluta+(IC95%)
Fración de eyección del ventrículo izquierdo (%)				
Basal	53,3 (34)	57,0(20,5)	0,83 (-9,2 a 10,9)	-0,5 (-13,1 a 12,0)
6 meses	55,0 (32,5)	57,0(10)		
P intragrupo	NS	NS		
Segmentos reversibles (%)				
Basal	17,6(15)	11,8(12)	2,2 (-3,6 a 8,1)	5,1 (-1,4 a 11,7)
6 meses	12,0 (18)	11,8(13)		
P intragrupo	NS	NS		
Segmentos irreversibles (%)				
Basal	14,7 (19,1)	0,0 (10,3)	0,2 (-4,4 a 4,7)	-1,6 (-6,9 a 3,7)
6 meses	8,8 (17,6)	0,0 (10,3)		
P intragrupo	NS	NS		
Suma score reposo				
Basal	21,0 (9)	18,0 (4)	-0,4 (-1,2 a 0,4)	-0,7 (-1,6 a 0,1)
6 meses	19,5 (5,3)	17,5 (3,5)		
P intragrupo	0,03	NS		
Suma score estrés				
Basal	24,0 (5,0)	20,0 (5,5)	-0,49(-2,3 a 0,3)	-0,7 (-2,3 a 0,9)
6 meses	23,5 (7,3)	20,0 (5,2)		
P intragrupo	0,003	NS		

Tabla 8. *Parámetros de perfusión y ventriculografía valorados mediante Gated-SPECT. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico. IC hace referencia a intervalo de confianza. * expresa la diferencia absoluta entre los grupos (Grupo tto-Grupo control) ajustado por la variable basal. + expresa la diferencia absoluta entre los grupos (Grupo tto-Grupo control) ajustado por la variable basal y la edad.*

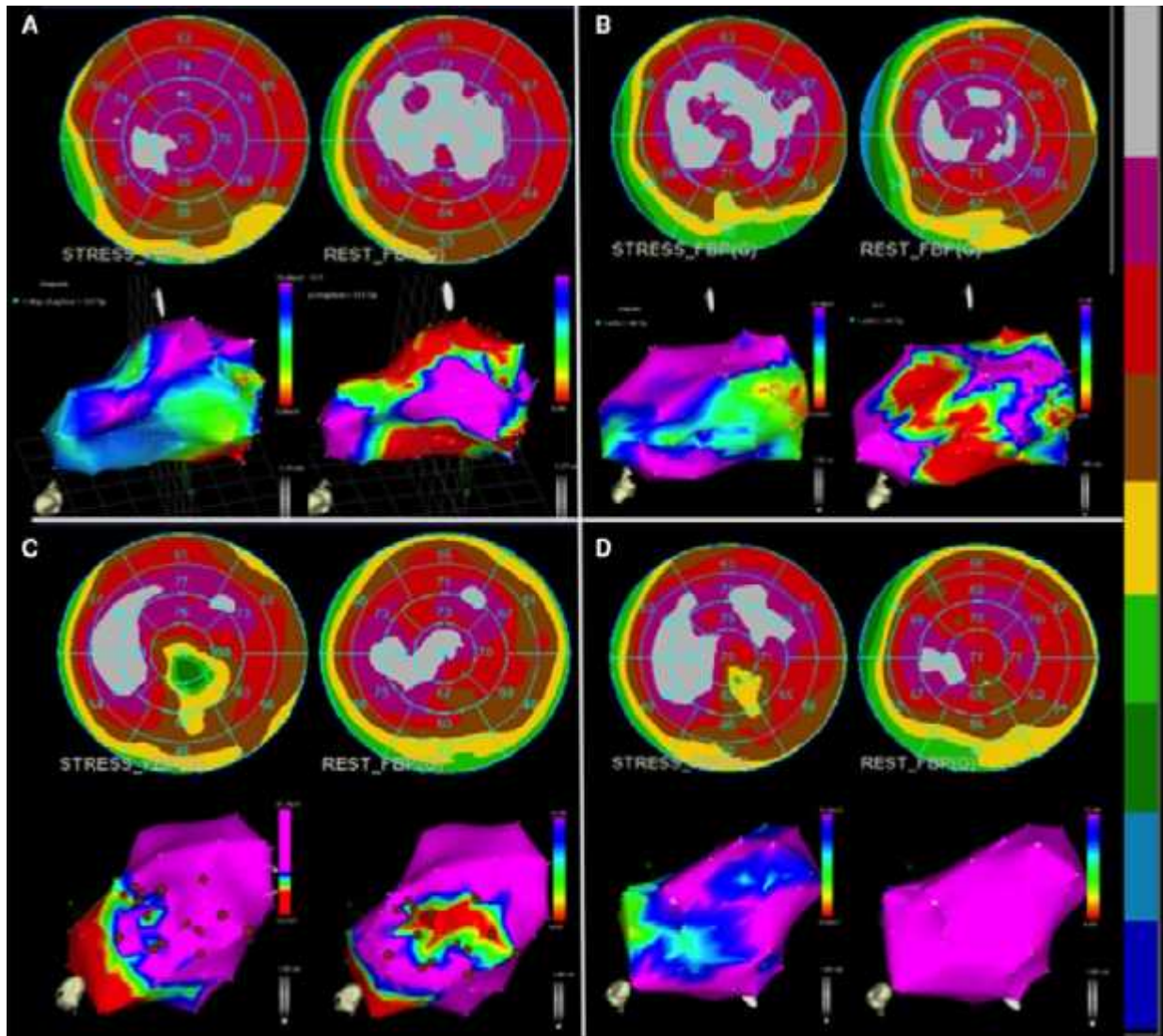


Figura 15. Un ejemplo de 2 pacientes incluidos en el estudio. Las figuras **A y B** muestran, en un sujeto control, los mapas polares (estrés y reposo) en la parte superior y los mapas adquiridos por NOGA en la parte inferior, a la derecha el mapa de voltaje unipolar (en rojo valores inferiores a 6,9 mV) y la izquierda el mapa de acortamiento local (en púrpura valores superiores a 12%) en una proyección lateral izquierda caudal. Los datos de perfusión están codificados por colores de acuerdo a la escala semicontinua mostrada en la línea del margen derecho, de modo que cada color representa un intervalo del 10% de perfusión desde el azul (el inferior) al blanco (superior). Del azul al amarillo son colores con una perfusión menor del 50% (los números en cada segmento del mapa polar indica el valor de perfusión calculado). La imagen **A** muestra defectos de perfusión en segmentos inferolaterales con viabilidad mostrada en el NOGA por valores preservados de voltaje unipolar y acortamiento lineal reducido. En **B** el estudio en el mismo paciente a los 6 meses, con un mayor defecto de perfusión y contractilidad local. Las figuras **C y D** muestran el estudio en un paciente asignado a la inyección de células CD133+. En la figura **C** se observa basalmente defectos de perfusión inferoapicales con viabilidad preservada (las bolas rojas indican los puntos de liberación). El estudio a los 6 meses, **D**, se observa una casi normalización de la perfusión desapareciendo los defectos de contractilidad segmentaria.

Cambios ecocardiográficos

Con respecto a los datos ecocardiográficos no se observaron cambios significativos en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo así como en los diámetros ventriculares en ambos grupos de estudio. El índice de motilidad parietal tampoco se modificó sustancialmente (Tabla 8). No se registraron derrames pericárdicos en el seguimiento.

	Tratamiento (n=17)	Control (n=7)	Diferencia absoluta* (IC95%)	Diferencia absoluta+ (IC95%)
Fracción de eyección del ventrículo izquierdo (%)				
Basal	51.0 (23)	55.0(12,3)	1,6 (-8,9 a 12,1)	5,0 (-17,4 a 7,4)
6 meses	61.1 (22)	55.0(9)		
P intragrupo	NS	NS		
Diámetro telediastólico (mm)				
Basal	52(10)	50(6)	1,9 (-2,7 a 6,4)	2,7 (-3,2 a 6,5)
6 meses	53 (13)	51,5 (8,5)		
P intragrupo	NS	NS		
Diámetro telesistólico (mm)				
Basal	38 (13,7)	34 (8,5)	2,9 (-2,6 a 8,5)	2,9 (-2,6 a 8,5)
6 meses	37,5 (23,3)	31 (8)		
P intragrupo	NS	NS		
Índice de motilidad parietal				
Basal	1,2 (0,7)	1,1 (0,3)	0,1 (-0,1 a 0,4)	0,03 (-0,2 a 0,3)
6 meses	1,3 (0,7)	1,0 (0,1)		
P intragrupo	NS	NS		

Tabla 9. *Parámetros ecocardiográficos. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico. IC hace referencia a intervalo de confianza. * expresa la diferencia absoluta entre los grupos (Grupo tto-Grupo control) ajustado por la variable basal. + expresa la diferencia absoluta entre los grupos (Grupo tto-Grupo control) ajustado por la variable basal y la edad.*

Cambios en la capacidad funcional valorada con ergometría

La capacidad funcional medida por el test de cinta sin fin no fue ejecutado en 6 pacientes (4 pacientes en el grupo de tratamiento y 2 en el grupo control) debido a la imposibilidad física de realizar la prueba (mala adaptación a la cinta). El tiempo de ejercicio y los equivalentes metabólicos no fueron diferentes en los dos grupos. Sin embargo el tiempo mediano a la angina en la prueba se incrementó en el grupo terapéutico de forma significativa y no lo hizo en el grupo control (**Tabla 10**).

	Basal	6 meses	P intragrupo
Tiempo de ejercicio			
Tratamiento	515,0 (221)	652,0 (239)	NS
Control	604,8 (427)	609,0 (563)	NS
<i>P intergrupo</i>		NS	
Equivalentes metabólicos (METS)			
Tratamiento	4,6 (1,3)	5,7 (2,1)	NS
Control	6,0 (3,5)	7,0 (2,7)	NS
<i>P intergrupo</i>		NS	
Tiempo hasta la angina			
Tratamiento	428,4 (186)	635 (254)	0,046
Control	466,5 (407)	466,5 (771)	NS
<i>P intergrupo</i>		NS	

Tabla 10. *Parámetros de la ergometría (protocolo Naughton). Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico. El tiempo se expresa en segundos.*

Evolución de los mapas de voltaje y acortamiento lineal

A los 6 meses, un mapa electroanatómico con el sistema NOGA fue realizado en todos los pacientes excepto en 2 que rechazaron someterse de nuevo a un procedimiento invasivo. En otros dos se produjeron problemas técnicos con el sistema y los datos fueron excluidos del análisis. Los registros muestran una mejora significativa en el acortamiento local lineal sin cambios en el voltaje unipolar en los segmentos donde se había inyectado. No se observó cambio alguno en el grupo control (**Tabla 11**). No obstante la comparación entre grupos no mostro diferencias significativas a los 6 meses.

	Tratamiento (n=16)	Control (n=6)	Diferencia absoluta*(IC95%)	Diferencia absoluta+(IC95%)
<u>Voltaje Unipolar</u>				
Basal	10,4 (6,8)	12,5(6,9)	-0,4 (-1,3 a 2,0)	1,0 (-1,0 a 3,1)
6 meses	10,1 (6,2)	11,4(9,2)		
P intragrupo	NS	NS		
<u>Acortamiento lineal local</u>				
Basal	10,6(10)	10,7(13,6)	-4,1 (-7,2 a -0,9)	-2,5 (-6,4 a 1,3)
6 meses	12,3 (13)	8,9 (8,8)		
P intragrupo	0,01	NS		

Tabla 11. *Parámetros NOGA. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico. IC hace referencia al intervalo de confianza. * expresa la diferencia absoluta entre los grupos (Grupo tto-Grupo control) ajustado por la variable basal. + expresa la diferencia absoluta entre los grupos (Grupo tto-Grupo control) ajustado por la variable basal y la edad.*

Variaciones analíticas, electrocardiográficas y angiográficas.

No se observaron en el seguimiento grandes cambios en los parámetros analíticos evaluados. La concentración mediana de hemoglobina basal en ambos grupos era normal y se mantuvo normal descartándolo como posible efecto confundidor con respecto al efecto terapéutico. Fue registrado un incremento inicial de la concentración de NT-proBNP en ambos grupos que fue disminuyendo a los 6 meses. Esto se debe poner en contexto del estrés que puede generarse con el mapeo electroanatómico extenso. Así mismo se observó un incremento en la concentración de la proteína C reactiva en el grupo control sin significación estadística y no acompañado de otros datos clínico-analíticos que pudieran sugerir infección. El análisis estadístico no mostro diferencias significativas entre grupos e intragrupo.

	Basal	3 meses	6 meses	P intragrupo
Hb (g/dl) control	14,5(2)	14,4(2)	14,5(2)	NS
Hb (g/dl) tratamiento	14,1(2)	14,4(1,9)	14,3(1,9)	NS
P intergrupo	NS		NS	
Creatinina (mg/dl) control	1,16(0,95)	0,97(0,8)	1,0(0,6)	NS
Creatinina (mg/dl) tratamiento	1,13(0,97)	1,14(0,3)	1,12 (0,7)	NS
P intergrupo	NS		NS	
Hb1Ac (%) control	6,1(4,5)	6,4(4)	6,4(4)	NS
Hb1Ac(%) tratamiento	6,3(2,9)	6,2 (1,2)	6,2 (1,2)	NS
P intergrupo	NS		NS	
NT-proBNP (pg/ml) control	327 (453)	553 (450)	502 (448)	NS
NT-proBNP (pg/ml) tratamiento	249 (1021)	295 (1471)	275 (1400)	NS
P intergrupo	NS		NS	
Prot. C reactiva (mg/dl) control	0,13(0,6)	0,51(0,2)	0,47 (0,3)	NS
Prot. C reactiva (mg/dl) tratamiento	0,27(0,53)	0,2 (0,28)	0,23 (0,4)	NS
P intergrupo	NS		NS	

Tabla 12. *Parámetros analíticos. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico.*

En el seguimiento con Holter ECG de 24 horas no fue posible realizar registros a todos los pacientes en los puntos de evaluación a los 3 y los 6 meses pero toda la cohorte se sometió a esta prueba en este periodo (**Tabla 13**). No hubo diferencias significativas en la frecuencia cardiaca media ni basal ni a los 6 meses. No se registraron eventos de bradicardia significativa (pauza sinusal mayor de 3 segundos o BAV mayor de 1º) ni ventriculares significativas (TV sostenidas o TV polimórficas) ni ningún evento de isquemia silente (por el descenso o ascenso del segmento ST).

	Basal	6 meses	P intragrupo
FC control	72 ±10,6	65 ±3,4	NS
FC tratamiento	69 ±14,7	66 ±8,5	NS
P intergrupo	NS	NS*	
Ep. Isquemia silente control	0(0)	0(0)	NS
Ep. Isquemia silente tto	0(0)	0(0)	NS
P intergrupo	NS	NS*	

Tabla 13. *Parámetros electrocardiográficos. Los datos se expresan como media y desviación estándar (media±SD) o como mediana y rango intercuartílico. La frecuencia cardiaca (FC) se expresa en latidos por minuto.*

En el control angiográfico a los 6 meses, dos pacientes rechazaron someterse de nuevo a un procedimiento invasivo. No se observaron cambios significativos en la fracción de eyección evaluada por la ventriculografía ni en la progresión en la enfermedad coronaria en ambos grupos (Tabla 14).

	Basal	6 meses	P intragrupo
Fracción de eyección			
Tratamiento	50,0 (26)	52,0(15,5)	NS
Control	59,0 (15)	63,0 (8)	NS
P intergrupo		NS	
Nº de vasos enfermos			
Tratamiento	3.5±1.3	3.5±1.4	NS
Control	2.6±1.8	2.8±1.6	NS
P intergrupo		NS	

Tabla 14. *Parámetros angiográficos. La Fracción de eyección (%) se expresa en mediana y rango intercuartílico y el número de vasos enfermos en mediana y desviación estándar.*

Complicaciones en el seguimiento

Durante el seguimiento un paciente en el grupo control falleció de forma súbita. Se trata del paciente que presentó fibrilación ventricular a las 24 horas del procedimiento. A los tres meses y medio de su inclusión y sin que previamente advirtiésemos un deterioro en su estado presentó un episodio de dolor torácico súbito que se siguió de la pérdida de conocimiento. Los servicios de emergencias lo encontraron en parada cardiorrespiratoria por asistolia y los esfuerzos de la reanimación cardiopulmonar fueron infructuosos. La familia denegó la autopsia clínica y el análisis del desfibrilador implantable no mostro ni taquicardia ventricular ni fibrilación ventricular.

Se registraron en cada grupo dos ingresos por causas cardiovasculares. En el grupo terapéutico dos pacientes fueron admitidos por reagudización de la insuficiencia cardiaca. En el grupo control dos pacientes fueron ingresados por angina inestable. En estos últimos se potenció aún más el tratamiento antianginoso (**Tabla 15**).

	Grupo terapéutico (N=19)	Grupo control (N=9)	Valor de la P
Eventos cardíacos o cerebrovasculares mayores, n(%)	2 (10,5)	1 (11,1)	NS
Muerte cardíaca, n (%)	1 (5,3)	1 (11,1)	NS
Infarto de miocardio no fatal, n (%)	1	0	NS
TV sostenida/FV, n(%)	1(5,3)	1(11,1)	NS
Taponamiento cardíaco, n(%)	1(5,3)	0	NS
Complicaciones vasculares, n(%)	0	0	-
Complicaciones neurológicas, n(%)	0	0	-
Hospitalización por causas cardíacas, n(%)	2 (11,1)	2 (25)	NS

Tabla 15. *Eventos clínicos en el seguimiento de 6 meses*

DISCUSIÓN

Los resultados del estudio permiten responder a varias de las hipótesis formuladas.

En primer lugar la inyección transendocárdica de progenitores endoteliales CD133 es un procedimiento factible y pudo completarse en todos los pacientes. Además es un procedimiento relativamente seguro pues aunque se registraron complicaciones durante el mismo, el porcentaje de las mismas no excedió a las registradas en estudios similares⁹². En el último registro de la Sociedad Española de Cardiología la incidencia de taponamientos cardiacos en el contexto de la ablación de la taquicardia ventricular fue superior al 2% mientras que en nuestro estudio fue del 3%, mostrando que no hay grandes discrepancias en la incidencia habida cuenta que dichos procedimientos están realizados por cardiólogos electrofisiólogos muy experimentados en la cartografía del ventrículo izquierdo¹²⁵. Sin embargo derivado de una de estas complicaciones fue necesaria una cirugía cardiaca urgente. Lamentablemente la paciente falleció en las horas posteriores debido al desarrollo de un shock cardiogénico refractario. La complicación se produjo en una mujer con superficie corporal pequeña y un ventrículo izquierdo hipertrófico con un volumen de cavidad izquierda reducida. Utilizando un catéter de liberación de pala convencional (pala D) sobre el segmento laterobasal, la ectopia mecánica al extender la aguja se siguió de una pausa postextrasistólica que propulsó el catéter, inicialmente no presentaba un exceso de corriente de lesión en el registro unipolar, llevando a la perforación con taponamiento inmediato. Este acontecimiento nos empujó a emplear y recomendar el uso de palas ajustadas al tamaño del ventrículo izquierdo, reservándose las palas D y F únicamente en pacientes con dilatación del ventrículo izquierdo y la pala C o B en ventrículos normales.

Por otro lado no resulta sorprendente la inducción de fibrilación ventricular durante un procedimiento de mapeo complejo en un paciente con isquemia miocárdica residual. Más sorprendente fue el evento de muerte súbita presenciada y recuperada de un paciente asignado al grupo control en las primeras 24 horas post-procedimiento. Este paciente presentaba una disfunción ventricular sistólica severa (FEVI < 30%) y taquicardia ventricular no sostenida previamente al procedimiento y se sometió a un implante de desfibrilador antes del alta hospitalaria ¹²⁶. Este paciente falleció de forma súbita a los 3,5 meses de la inclusión de causa previsiblemente cardíaca pero no confirmada por la denegación a la práctica de una autopsia.

A diferencia de las tasas de complicaciones publicadas en los distintos registros de cardiología intervencionista, no se registraron eventos adversos vasculares o neurológicos alrededor del procedimiento. Aunque se produjo una elevación significativa de los marcadores de necrosis miocárdicas (cinco veces por encima del límite superior) en un paciente del grupo terapéutico, posiblemente secundario a una microembolia coronaria, esto no se acompañó de síntomas anginosos, cambios electrocardiográficos o de la contractilidad segmentaria. Sin embargo lo consideramos como un infarto sin elevación del ST de acuerdo a la definición actual de infarto tipo 4a ¹²⁴.

Durante el seguimiento un paciente falleció en el grupo control probablemente debido a un infarto fatal. Se contabilizaron dos ingresos por insuficiencia cardíaca en el grupo terapéutico y dos por angina inestable en el grupo control. Estos datos están en concordancia con estudios previos que ponen de manifiesto que los pacientes con angina refractaria constituyen un grupo de pacientes con mal pronóstico, así pues Andrell et al. publicaron que este tipo de pacientes presentaban una mortalidad anual del 10% frente un 0,7% anual que

presentan los pacientes con control sintomático ¹²⁷. Por último, no se registraron arritmias significativas, progresión de la enfermedad coronaria o trombosis tardía de los stent previamente implantados durante el seguimiento.

En segundo lugar el estudio no consiguió demostrar un beneficio clínico neto entre grupos en ninguno de los parámetros estudiados. Sin embargo observamos que los pacientes que recibieron progenitores endoteliales mostraron una mejoría, estadísticamente significativa, en la situación clínica, en la calidad de vida y en el tiempo hasta la angina en la ergometría. Todo pese que el tratamiento anti-anginoso era similar entre los grupos. Además se registró una mejoría en la perfusión miocárdica evaluado por SPECT durante el seguimiento, donde la sumatoria del nivel de perfusión de los segmentos tanto en reposo como en estrés mejoró significativamente en el grupo terapéutico y no en los controles. En este punto encontramos una cierta paradoja al no observarse cambios significativos en el número de segmentos con defectos de perfusión durante el seguimiento y sí en los índices sumatorios. A este respecto especulamos que son varias las razones que pueden explicar esta discrepancia: una de ellas se relacionaría con aspectos técnicos de la evaluación de los parámetros del SPECT, sabido que el tipo de análisis empleado y que el uso de Tc99m-Sestamibi pueden infraestimar la viabilidad y la reversibilidad principalmente en pacientes con enfermedad multivaso, ^{93, 128} y la otra versa sobre la limitación metodológica por el tamaño muestral que limita la significación estadística a grandes cambios de magnitud. En concordancia con los otros resultados obtenidos, observamos un incremento en el acortamiento lineal local evaluado por NOGA, añadiendo un punto más a la evidencia sobre la eficacia clínica de los progenitores endoteliales en el tratamiento de la angina refractaria. Y es que además de los datos clínicos, los estudios in vitro avalan el potencial beneficio de los

progenitores endoteliales al demostrarse sus cualidades funcionales. El estudio muestra de forma reproducible la capacidad proliferativa de las células CD133+ desarrollando marcadores de células endoteliales adultas, asimismo se observó la formación de estructuras tubulares en el cocultivo con células endoteliales de cordón umbilical y una capacidad funcional endotelial in vitro apropiada a tenor de la captación de la lipoproteína de baja densidad acetilada.

Las células madre CD133+ han sido utilizadas previamente tanto para reducir el tamaño del infarto agudo de miocardio como para tratar la disfunción ventricular debida a la cardiopatía isquémica crónica. Kurbonov y colaboradores ¹²⁹ utilizaron las células CD34+ y CD133+, directamente recolectadas de la médula ósea y liberadas de forma intracoronaria, para tratar a pacientes con cardiopatía isquémica crónica. Dicho estudio demostró principalmente un incremento en la perfusión miocárdica valorado por SPECT. Stamm et al. ¹¹⁶ las emplearon conjuntamente en la revascularización coronaria quirúrgica y Bartunek et al. ¹¹⁷ en el tratamiento subagudo de un infarto agudo de miocardio. En ambos casos se observó una mejoría en los parámetros de perfusión. El estudio PROGENITOR también ha empleado células progenitoras endoteliales pero es pionero al evaluar su efecto mediante la inyección transendocárdica en pacientes con angina refractaria sin mayor opción terapéutica.

Estudios previos han demostrado la presencia de células endoteliales maduras y de progenitores endoteliales en la sangre de la circulación periférica ³⁸. Ambas poblaciones expresan el marcador de superficie CD34+ por lo que como marcador aislado para la selección de progenitores no es útil. Por otro lado, el marcador de superficie CD133+ es altamente expresado en dichos progenitores sin apenas expresión en las células endoteliales adultas. Por ello la selección de células CD133+ permite la obtención de células endoteliales inmaduras con una alta capacidad para la diferenciación a células endoteliales maduras. Estudios

recientes muestran que un subgrupo de células endoteliales CD133+, las células CD133+ CD34-⁷⁹, tendrían una mayor capacidad proliferativa que el subgrupo CD34+. Sin embargo el efecto clínico de esta selección comparada con otras subpoblaciones es desconocida y tendrá que ser explorada en ensayos futuros.

La potencial relevancia clínica del uso de células endoteliales CD133+ en la angina viene avalada por estudios previos en los cuales se demostraba una relación directa entre la magnitud del efecto clínico de la inyección transendocárdica con el porcentaje de células CD133 positivas en la muestra inyectada. El estudio más significativo asignó de forma aleatoria a 92 pacientes sintomáticos sin más opción (con una FEVI \leq 45% e insuficiencia cardiaca o angina limitante) a recibir tratamiento convencional más inyección transendocárdica de placebo o a la administración de 100 millones de células mononucleares de médula ósea. El estudio no mostró diferencias significativas con respecto a sus variables resultado primarias (incremento en la FEVI, consumo de oxígeno máximo o reducción de los defectos de perfusión inducibles) pero en un análisis secundario claramente se observó una relación entre el incremento de la FEVI, con una diferencia absoluta de hasta 2,7%, y el porcentaje de células CD133+/CD34+ positivas inyectadas. Este hallazgo sugirió a los autores que este tipo celular podría tener un beneficio clínico en este tipo de pacientes¹³⁰.

Dejando aparte el tipo celular usado en el estudio PROGENITOR, los resultados favorables en términos de reducción de los episodios de angina y mejoría en la calidad de vida están en concordancia con otros estudios, la mayoría de los cuales emplearon poblaciones celulares no enriquecidas para el tratamiento de la angina refractaria. En un estudio fase II¹³¹ se asignaron aleatoriamente 50 pacientes a recibir por vía transendocárdica células mononucleares no seleccionadas de médula ósea (98 millones promedio) o placebo. A los 6

meses la clase Canadiense de la angina, la capacidad funcional o la FEVI medida por resonancia magnética cardiaca mejoraron significativamente en el grupo terapéutico. Tanto la calidad de vida como la perfusión evaluada por SPECT mejoró en ambos grupos pero el incremento documentado fue mayor en el grupo terapéutico. Con respecto a la mejoría en la perfusión en el grupo control, los autores especulan que pudo deberse a la estimulación angiogénica inducida mecánicamente en la inyección transendocárdica. Como se veía con anterioridad esta hipótesis no es corroborada por todos los investigadores y los estudios de la revascularización con láser transmiocárdico, tanto quirúrgico como percutáneo, no mostraron un beneficio clínico significativo, con resultados no congruentes sobre la mejoría de perfusión y claramente sin impacto en la supervivencia ¹³². En el estudio PROTECT-CAD, 28 pacientes fueron asignados de forma aleatoria a recibir transendocardicamente células mononucleares de médula ósea en dos concentraciones ($2 \times 10^6 / 0,1$ ml o $1 \times 10^6 / 0,1$ ml) o placebo. Se observó un incremento en la capacidad funcional (clase NYHA) y en la FEVI en el grupo terapéutico pero mostro un empeoramiento paradójico de la clase CCS en ambos grupos. Además no se documentaron cambios en los parámetros de perfusión evaluados por SPECT. ¹³³

El único estudio que ha utilizado hasta el momento células progenitoras endoteliales para el tratamiento de la angina refractaria ha sido el estudio ACT34-CMI. En este ensayo clínico fase II se incluyeron 167 pacientes con angina refractaria severa, clase III-IV, que fueron aleatorizados (1:1) a recibir dos dosis diferentes de una población seleccionada CD34+ (1×10^5 o 5×10^5 células/Kg) o placebo. Se registraron dos episodios de taponamiento cardiaco durante el procedimiento de los cuales uno de ellos llevo a la muerte a un paciente. Los resultados fueron sorprendentes al observarse que sólo las dosis bajas se asociaron a una mejoría clínica con una significativa reducción de los episodios de angina semanal, mejoría en el tiempo de

esfuerzo hasta la angina, en la puntuación de severidad de la angina evaluada por el cuestionario de Seattle y en la perfusión evaluado por SPECT (únicamente el sumatorio de la perfusión de estrés). Los autores argumentan que la discrepancia de efectos entre las dosis bajas y altas se deba en parte a la respuesta bifásica que se viene observando con la manipulación biológica de la angiogénesis. Por otro lado analizan las razones por las que no obtuvieron una mejora uniforme en los parámetros de perfusión como ocurrió en nuestro estudio. Además de las cuestiones anteriormente esgrimidas se enfatiza en la limitación del SPECT al ser una técnica validada únicamente para detectar reducciones del flujo sanguíneo coronario por estenosis coronarias y no por problemas de la microvascularización. Y es que el efecto beneficioso de la terapia celular radicaría en la potenciación del desarrollo microvascular y no se concentraría en los segmentos clásicos de irrigación coronaria. ¹³⁴⁻¹³⁵

A diferencia de otros escenarios, como la insuficiencia cardiaca o el infarto agudo de miocardio ^{136,-137}, la terapia celular ha mostrado de forma homogénea buenos resultados en el tratamiento de la angina refractaria. Como en nuestro caso la mayoría de los estudios han presentado limitaciones metodológicas en el tamaño muestral o en la evaluación de los resultados, pero todos han mostrado beneficios en términos clínicos. Otros tratamientos, ya aprobados para la angina, también han sido publicados reflejando limitaciones terapéuticas o resultados discrepantes. Así por ejemplo la Ranolazina ¹³⁸, un nuevo antianginoso con capacidad de inhibir las corrientes de sodio tardías, incrementa el tiempo de esfuerzo hasta la angina en unos 24 segundos de promedio pero no modifica el tiempo hasta la depresión del segmento ST y su efecto sobre la perfusión cardiaca no ha sido evaluada. En nuestro estudio el tiempo hasta la angina también se incrementó de forma significativamente en el grupo terapéutico, en unos 3 minutos de promedio, sin modificarse el tiempo total de ejercicio. La

Ivabradina, un inhibidor de las corrientes If, produce bradicardia sin producir efectos inotrópicos negativos. En el estudio SIGNIFY ¹³⁹ se observó que 10mg cada 12h (dosis máximas) no disminuía la incidencia de la variable combinada de muerte por causa cardiovascular o infarto de miocardio. Es más en pacientes con angina limitante la incidencia del “end-point” fue significativamente mayor en los pacientes tratados. Por último el dispositivo de oclusión del seno coronario se ha asociado de forma significativa a una mejoría en la clase funcional de la angina CCS a los 6 meses sin mostrar diferencias en el tiempo de ejercicio hasta la angina o mejoría en el índice de contractilidad parietal (WMI). ¹⁴⁰

En este estudio no se observaron cambios significativos durante el seguimiento, en ninguno de los brazos de asignación, ni en la FEVI ni en la función contráctil regional. Con respecto a la fracción de eyección en promedio basalmente estaba conservada en ambos grupos, principalmente en el control, por lo que no se esperaba que este parámetro fuera a modificarse sustancialmente en el tiempo. Por otro lado especulamos que es difícil estimar la mejoría de la contractilidad segmentaria con la terapia celular sabiendo que su estimación es muy subjetiva y que por su efecto de acción angiogénico no es posible un efecto vigoroso circunscrito al extenderse entre segmentos adyacentes sin concentrarse en uno exclusivamente.

Otras características que son particulares del estudio, que difieren con respecto a otros similares, son por un lado que en todos los casos las células fueron procesadas e inyectadas el mismo día evitando los posibles efectos deletéreos del almacenaje y por otro que no se realizaron inyecciones transendocárdicas en el grupo placebo con el fin de evitar la posible estimulación de la angiogénesis mecánica disminuyendo además el riesgo de perforación. Finalmente el acortamiento lineal evaluado por el sistema NOGA se incrementó en el grupo

terapéutico en las zonas inyectadas aunque sin alcanzar la diferencia significación estadística con respecto al grupo control. La evaluación del acortamiento lineal ha sido criticada por algunos investigadores, al ser muy dependiente del número de puntos o de “visitas” a la superficie endocárdica y de la posición de la punta con respecto a la superficie, pero ha sido empleado en varios estudios como parámetro de efecto ¹⁴¹ y cumpliéndose los estándares de calidad indudablemente constituye una variable con menor subjetividad que la contractilidad segmentaria evaluada por eco o resonancia magnética ¹⁴².

Limitaciones

La principal limitación del estudio fue su pequeño tamaño muestral. Se trata de una limitación relativa pues nos encontramos ante un estudio de viabilidad y seguridad de la técnica con ambiciones exploratorias (estudio piloto) sobre la eficacia clínica con el objetivo de abrir una puerta a un estudio multicéntrico de mayor tamaño muestral. Sin embargo, el tamaño pudo condicionar el análisis estadístico al no observarse un beneficio neto de la terapia entre grupos y sí un claro beneficio dentro del grupo terapéutico sin cambios en el grupo control. Es por ello que nos inclinamos a pensar que la probabilidad del error tipo II, esto es la probabilidad de aceptar la ausencia de diferencias siendo falso, fuese elevada. Además el sistema de aleatorización 2:1 empleado incrementa sustancialmente la posibilidad de no arrojar significación estadística pese a existir diferencias manifiestas. No obstante consideramos correcto y ético maximizar la posibilidad de beneficio clínico en el mayor número de pacientes. Es indudable que los análisis empleando covariables ante desequilibrios en los grupos resta potencia al estudio y pese a que la aleatorización tiende a formar grupos equilibrados, en nuestro estudio la edad, un claro factor confundidor, era más alta en el grupo terapéutico.

Por otro lado el hecho que los implantadores no fueran ciegos a la terapia empleada, pues no se utilizó placebo, puede constituir un potencial sesgo de medición si dichos operadores evalúan algún parámetro del seguimiento pero esto no ocurrió pues las mediciones fueron realizadas por investigadores que desconocían el tratamiento asignado.

El estudio no puede aportar ninguna evidencia sobre si la inyección transendocárdica “per se” podría tener efectos angiogénicos por daño tisular. Estudios previos de revascularización transmiorcárdica con láser fracasaron al no mostrar efectos beneficiosos con ésta técnica pero es cierto que varios grupos han mostrado efectos clínicos beneficiosos en los sujetos control a los que se les realizo una inyección transendocárdica de placebo ¹³¹.

Por último en los estudios in vitro las células seleccionadas CD133+ mostraron su capacidad angiogénica y su predisposición a diferenciarse a células endoteliales maduras. Sin embargo el cocultivo con células endoteliales de vena umbilical (HUVEC) puede haber contribuido a dichos efectos y no se puede imputar totalmente los hallazgos a las células cultivadas CD133+. ¹⁴³

CONCLUSIONES

Pese a los grandes avances realizados en la Cardiología, la enfermedad vascular arterioesclerótica continúa siendo el enemigo más importante de la salud cardiovascular. No sólo es una de las principales causas de muerte en el mundo occidental sino que determina estados de gran incapacidad y demanda como son la insuficiencia cardiaca y la angina refractaria, ambas con opciones terapéuticas limitadas y no del todo satisfactorias.

Con el descubrimiento y el desarrollo de la terapia celular se ha abierto la puerta de la esperanza a un tratamiento eficaz y seguro para ambas patologías. Sin embargo el entusiasmo inicial ha chocado con el muro de la realidad y la diversidad de resultados o los eventos adversos han obligado a la comunidad científica a apoyarse de forma más estrecha en la investigación experimental.

A este respecto el conocimiento crítico sobre el papel que juegan los progenitores endoteliales en la reparación vascular de los tejidos isquémicos y la capacidad para seleccionar poblaciones de progenitores endoteliales sin limitaciones para la angiogénesis o la vasculogénesis, como serían las células CD133, motivaron el desarrollo de este ensayo clínico. Su objetivo esencial fue evaluar la seguridad y la eficacia de esta terapia en pacientes con angina de pecho sin opción a un tratamiento revascularizador convencional y sin una respuesta satisfactoria al tratamiento médico. El método de liberación mediante la realización de un mapa electroanatómico e inyección transendocárdica se concibió como idóneo a la luz de la seguridad observada en estudios previos, la posibilidad de alcanzar segmentos irrigados por vasos coronarios ocluidos y la posibilidad de reconfirmar que los segmentos eran viables, es decir con un “mismatch” entre el acortamiento local y el voltaje unipolar.

Los resultados muestran que se trata de un procedimiento factible y seguro, al no observarse diferencias entre los grupos en los eventos adversos, que por otro lado fueron los esperados a tenor de las características de los pacientes y de tratarse de un procedimiento invasivo. Sin embargo no dejamos de enfatizar que la seguridad de este tipo de procedimientos es muy dependiente de la formación y de los medios tecnológicos por lo que no consideramos que pueda constituir un tratamiento rutinario y sí un tratamiento para pacientes muy seleccionados.

En cuanto a la eficacia el estudio no mostro diferencias estadísticamente significativas en todos los parámetros evaluados entre grupos y todo a pesar de la mejoría clínica, de perfusión, del tiempo hasta la angina y del acortamiento lineal claramente observado en el grupo terapéutico. No obstante la naturaleza del estudio no permitió disponer de la potencia estadística necesaria como para poder concluir si la terapia celular para el tratamiento de la angina refractaria es realmente útil o no.

El estudio PROGENITOR ¹⁴⁴ permite afirmar que la terapia con células CD133+ administradas por inyección transendocárdica es un procedimiento factible y seguro en pacientes con angina refractaria y sin opción. La terapia presenta unos efectos beneficiosos prometedores que tendrían que ser validados en ensayos clínicos de mayor tamaño.

BIBLIOGRAFIA

1-Melanie N, Townsend N, Scarborough P, Rayner M, Leal J and Luengo-Fernandez R. European Cardiovascular Disease Statistics, 2012 edition.

2-Heart Disease and Stroke Statistics—2014 Update-. *Circulation*. 2013; 129: e28-e292

3-Mukherjee D, Bhatt DL, Roe MT, Patel V, Ellis SG. Direct myocardial revascularization and angiogenesis --how many patients might be eligible? *Am J Cardiol*. 1999;84: 598-600.

4-Rizzello V, Poldermans D, Boersma E, Biagini E, Schinkel AF, Krenning B, Elhendy A, Vourvouri EC, Sozzi FB, Maat A, Crea F, Roelandt JR, Bax JJ. Opposite patterns of left ventricular remodeling after coronary revascularization in patients with ischemic cardiomyopathy: role of myocardial viability. *Circulation*. 2004;110: 2383-8.

5-Di Carli MF, Maddahi J, Rokhsar S, Schelbert HR, Bianco-Batlles D, Brunken RC, Fromm B. Long-term survival of patients with coronary artery disease and left ventricular dysfunction: implications for the role of myocardial viability assessment in management decisions. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998; 116:997-1004.

6-Rizzello V, Poldermans D, Biagini E, Schinkel AF, Elhendy A, Leone AM, Crea F, Maat A, Roelandt JR, Bax JJ. Relation of improvement in left ventricular ejection fraction versus improvement in heart failure symptoms after coronary revascularization in patients with ischemic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2005; 96 :386-9.

7-Rivard A, Fabre JE, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M, Magner M, Asahara T, Isner JM. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation*. 1999; 99:111-20.

8-Sabia PJ, Powers ER, Ragosta M, Sarembock IJ, Burwell LR, Kaul S. An association between collateral blood flow and myocardial viability in patients with recent myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1992; 327: 1825–1831.

9-Charney R, Cohen M. The role of the coronary collateral circulation in limiting myocardial ischemia and infarct size. *Am Heart J*. 1993; 126: 937–945.

10-Habib GB, Heibig J, Forman SA, Brown BG, Roberts R, Terrin ML, Bolli R. Influence of coronary collateral vessels on myocardial infarct size in humans: results of phase I Thrombolysis In Myocardial Infarction (TIMI) trial: the TIMI Investigators. *Circulation*. 1991; 83: 739–746.

11-Nathoe HM, Buskens E, Jansen EW, Suyker WJ, Stella PR, Lahpor JR, van Boven WJ, van Dijk D, Diephuis JC, Borst C, Moons KG, Grobbee DE, de Jaegere PP. Role of coronary collaterals in off-pump and on-pump coronary bypass surgery. *Circulation*. 2004;110:1738-42

- 12-Schwartz H, Leiboff RH, Bren GB, Wasserman AG, Katz RJ, Varghese PJ, Sokil AB, Ross AM. Temporal evolution of the human coronary collateral circulation after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1984;4: 1088-1093
- 13-Herzog S, Sager H, Khmelevski E, Deylig A, Ito WD. Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283: H2012–H2020.
- 14-Gorge G, Schmidt T, Ito BR, Pantely GA, Schaper W. Microvascular and collateral adaptation in swine hearts following progressive coronary artery stenosis. *Basic Res Cardiol.* 1989; 84: 524–535.
- 15-Boatwright RB, Williams DO, Rugh KS, Sarazan RD, Ross CR, Garner HE, Griggs DM. Distribution of coronary collateral blood flow at different levels of collateral growth in conscious ponies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1992; 263: H1145–H1153.
- 16-Perin EC, Silva GV. Stem cell therapy for cardiac diseases. *Curr Opin Hematol.* 2004; 11: 399-403.
- 17- Gneccchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanism in Adult Stem Cell signaling and therapy. *Circ Res.* 2008; 103:1204-121.
- 18-Maseri A, Crea F, Kaski JC, Crake T. Mechanisms of angina pectoris in Syndrome X. *J Am Coll Cardiol.* 1991; 17: 499–506.
- 19-Klassen GA, Armour JA, Garner JB. Coronary circulatory pressure gradient. *Can J Physiol Pharmacol.* 1987; 65: 520–531.
- 20-Dunker DJ, Ishibashi Y, Bache RJ. Effect of treadmill exercise on transmural distribution of blood flow in hypertrophied left ventricle. *Am J Physiol.* 1998; 275: 1274–82.
- 21-Lupi A, Buffon A, Finocchiaro ML, Conti E, Maseri A, Crea F. Mechanisms of adenosine-induced epicardial coronary artery dilatation. *Eur Heart J.* 1997; 18: 614–17.
- 22- Kuo L, Chilian WM, Davis MJ. Coronary arteriolar myogenic response is independent of endothelium. *Circ Res.* 1990; 66: 860–866.
- 23-Meredith IT, Currie KE, Anderson TJ, Roddy MA, Ganz P, Creager MA. Postischemic vasodilation in human forearm is dependent on endothelium-derived nitric oxide. *Am J Physiol.* 1996; 270: 1435–40.
- 24-Braunwald E. Control of myocardial oxygen consumption: physiologic and clinical considerations. *Am J Cardiol.* 1971; 27: 416–432.

25-Gould KL, Lipscomb K, Hamilton GW. Physiologic basis for assessing critical coronary stenosis. Instantaneous flow response and regional distribution during coronary hyperemia as measures of coronary flow reserve. *Am J Cardiol.* 1974; 33: 87–94.

26-Uren NG, Melin JA, De Bruyne B et al. Relation between myocardial blood flow and the severity of coronary-artery stenosis. *N Engl J Med.* 1994; 330: 1782–1788.

27-Maseri A, Davies G, Hackett D, Kaski JC. Coronary artery spasm and coronary vasoconstriction: the case for a distinction. *Circulation.* 1990; 81: 1983–1991.

28-Tonino PA, De Bruyne B, Pijls NH, Siebert U, Ikeno F, van' t Veer M, Klauss V, Manoharan G, Engstrøm T, Oldroyd KG, Ver Lee PN, MacCarthy PA, Fearon WF. Fractional flow reserve versus angiography for guiding percutaneous coronary intervention. *N Engl J Med.* 2009; 360: 213-224.

29-Tomai F, Crea F, Chiariello L, Giofrè PA. Ischemic preconditioning in humans: models, mediators, and clinical relevance. *Circulation.* 1999; 100: 559–563.

30-Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner SF. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest.* 1975; 56: 978–985.

31-Wijns W, Vatner SF, Camici PG. Mechanisms of disease: hibernating myocardium. *N Engl J Med.* 1998; 339:173–181.

32-Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest.* 1999; 103: 1231–1236.

33-Heberden W. Some account of a disorder of the breast. *Med Trans.* 1772; 2: 59–67.

34-Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, et al. Guidelines on management of stable angina pectoris. *Eur Heart Journal.* 2013; 34: 2949–3003

35-IUIS-WHO Nomenclature Subcommitte. Nomenclature for clusters of differentiation (CD) of antigens on human leukocyte populations. *Bull World Health Organ.* 1984; 62: 809-815.

36- Bolov L, de la Vega O, de Remedios C, Mulligan SP, Christopherson RI. Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray. *Cancer Research.* 2001;61: 4483-89

37-Goligorsky M, Salven P. Concise Review: Endothelial stem and progenitor cells and their habitats. *Stem Cell Translational Medicine.* 2013; 2: 499-504.

38-Ashara 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; 275:964-67.

- 39- Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB.. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascuogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 288-293.
- 40- Qi H, Pei D. The magic of four: induction of pluripotent stem cells from somatic cells by Oct4, Sox2, Myc and Klf 4. *Cell Research.* 2007; 17: 578-580.
- 41- Montarras D, Morgan J, Collins C, Relaix F, Zaffran S, Cumano A, et al. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science.* 2005; 309: 2064-7.
- 42-Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science.* 1992; 255: 1707-10.
- 43-Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963; 197: 452-4.
- 44-Caspi O, Huber I, Kehat I. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardil performance in infarcted rat hearts. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 1884-93.
- 45- Quiani F, Urbanek K,Beltrami A, Finato N, Beltrami C, Nadal-Ginard B. et al. Chimerism of the trasplanted heart. *N England J Med.* 2002; 346: 5-15.
- 46-Deb A, Wang S, Skelding KA, Miller D, Simper D, Caplice NM. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation.* 2003; 107: 1247-9.
- 47-Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, et al. Adult cardiac stem cell are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003; 114: 763–776.
- 48-Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001; 410: 701-5.
- 49-Sanganalmath SK, Bolli R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circ Res.* 2013; 113: 810-34.
- 50- Hughes S. Cardiac stem cells. *J Pathol.* 2002; 197:468-78.
- 51- Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther.* 2002; 9:754-8.
- 52-Choi D, Oh HJ, Chang UJ, et al. In vivo differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. *Cell Transplant.* 2002; 11:359-68.

- 53- Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest.* 2001; 107:1395-402.
- 54- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine D, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann Y Acad Sci.* 2001; 938:221-9.
- 55- Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* 2001; 7:430-6.
- 56- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998; 279:1528-30
- 57- Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002; 123:1132-40.
- 58- Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation.* 1999; 100:247-56
- 59- Nishida M, Li TS, Hirata K, Yano M, Matsuzaki M, Hamano K. Improvement of cardiac function by bone marrow cell implantation in a rat hypoperfusion heart model. *Ann Thorac Surg.* 2003; 75: 768-73
- 60- Hamano K, Li TS, Kobayashi T, Hirata K, Yano M, Kohno M, Matsuzaki M. Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. *Ann Thorac Surg.* 2002; 73: 1210-5.
- 61- Folkman, J. Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs. *Circulation* 1998; 97:1108–10.
- 62- Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature Med* 1999; 5: 434–438.
- 63- Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalk-Moll WM, Silve M, Kearney M, Li T, Isner JM, Ashara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97:3422–3427.
- 64- Silva GV, Litovsky S, Assad JA, Sousa AL, Martin BJ, Vela D, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation.* 2005 18; 111: 150-6 .
- 65- Coffin JD, Harrison J, Schwartz S, Heimark R. Angioblast differentiation and morphogenesis of the vascular endothelium in the mouse embryo. *Dev Biol.* 1991; 148:51-62.

- 66- Robert B, St. John PL, Hyink DP, Abrahamson DR. Evidence that embryonic kidney cells expressing flk-1 are intrinsic, vasculogenic angioblasts. *Am J Physiol.* 1996;271:F744-753.
- 67- Caprioli A, Jaffredo T, Gautier R, Dubourg C, Dieterlen-Lievre F. Blood-borne seeding by hematopoietic and endothelial precursors from the allantois. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95 :1641-1646
- 68- Kennedy M, Firpo M, Choi K, Wall C, Robertson S, Kabrun N, Keller G. A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature.* 1997; 386: 488–493.
- 69- Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, N. & Keller, G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development.* 1998; 125 :725–732. |
- 70- Elefanty, A.G., Robb, L., Birner, R. & Begley, C.G. Hematopoietic-specific genes are not induced during in vitro differentiation of scl-null embryonic stem cells. *Blood.* 1997; 90: 1435–1447.
- 71- Labastie, M.C., Cortes, F., Romeo, P.H., Dulac, C. & Peault, B. Molecular identity of hematopoietic precursor cells emerging in the human embryo. *Blood.* 1998; 92: 3624–3635.
- 72- Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood.* 1997; 90: 5013-5021
- 73- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 1997; 90: 5002-5012
- 74- Almeida J, Bueno C, Alguero M. C, Sanchez M. L, Canizo M. C, Fernandez M., et al. Extensive characterization of the immunophenotype and pattern of cytokine production by distinct subpopulations of normal human peripheral blood MHC II+/lineage- cells. *Clin Exp Immunol* 1999;118:392-401.
- 75- Gehling U. M, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000;95: 3106-12.
- 76- Menendez P., Prosper F., Bueno C., Arbona C., San Miguel J. F., Garcia-Conde J., et al. Sequential analysis of CD34+ and CD34- cell subsets in peripheral blood and leukapheresis products from breast cancer patients mobilized with SCF plus G-CSF and cyclophosphamide. *Leukemia* 2001;15:430-9.
- 77- Irollo E, Pirozzi G. CD133: to be or not to be, is this the real question? *Am J Transl Res.* 2013; 5 : 563-8.

- 78- Peichev M., Naiyer A. J., Pereira D., Zhu Z., Lane W. J., 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, 952-8.
- 79- Friedrich E, Walenta K, Scharlau J, Nickenig G, Werner N. CD34-/CD133+/VEGFR-2+ Endothelial Progenitor Cell Subpopulation with potent Vasoregenerative Capacities. *Circ Res.* 2006; 98: e20-e25.
- 80- Perin E, Silva GV, Sarmiento-Leite R, Sousa LS, Howell M, Muthupillai, et al. Assessing myocardial viability and infarct transmuralty with left ventricular electromechanical mapping in patients with stable coronary artery disease: validation by delayed-enhancement magnetic resonance imaging. *Circulation* 2002; 106:957-61.
- 81- Smits P, van Langenhove G, Schaar M, et al. Efficacy of percutaneous intramyocardial injections using a nonfluoroscopic 3-D mapping based catheter system. *Cardiovasc Drugs and Ther* 2002; 527:527-533.
- 82- Rutanen J, Rissanen T, Markkanen J, et al. Adenoviral catheter-mediated intramyocardial gene transfer using the mature form of vascular endothelial growth factor-D induces transmural angiogenesis in porcine heart. *Circulation* 2004; 109:1029-1035.
- 83- Vale P, Losordo D, Milliken C, McDonald MC, Gravelin LM, Curry CM, Esakof DD, Maysky M, Symes JF, Isner JM. Randomized, single blind, placebo-controlled pilot study of catheter based myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electromechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103:2138-2143.
- 84- Perin EC, Dohmann R, Borojevic R, Silva SA, Soussa AL, Mesquita CT, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003; 107:2294-2302.
- 85- Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 2003; 107: 461-468.
- 86- Lessick J, Kornowski R, Fuchs S, Ben-Haim SA. Assessment of NOGA catheter stability during the entire cardiac cycle by means of a special needle-tipped catheter. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2001; 52(3): 400-6.
- 87- Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 2001; 104: 1046–52.

- 88- Chazaud B, Hittinger L, Sonnet C, Champagne S, Le Corvoisier P, Benhaïem-Sigaux N, et al. Endoventricular porcine autologous myoblast transplantation can be successfully achieved with minor mechanical cell damage. *Cardiovascular Research* 2003;58: 444–450.
- 89- Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, et al. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*. 2002;105:2012-2018.
- 90- Smits PC, Nienaber C, Colombo A, Ince H, Carlino M, Theuns Da, et al. Myocardial repair by percutaneous cell transplantation of autologous skeletal myoblast as a stand alone procedure in post myocardial infarction chronic heart failure patients. *Eurointervention* 2006;1(4):417-24.
- 91- Moreno J, Quintanilla JG, López-Farré A, Archondo T, Cervigón R, Aragoncillo P, et al. Skeletal myoblast implants induce minor propagation delays, but do not promote arrhythmias in the normal swine heart. *Europace*. 2010 Nov;12(11):1637-44.
- 92- Kastrup J, Jorgensen E, Ruck A, Tägil K, Glogar D, Ruzyllo W, et al. Direct Intramyocardial Plasmid Vascular Endothelial Growth Factor-A165 Gene Therapy in Patients with Stable Severe Angina Pectoris (the EUROINJECT-ONE multicenter double-blind randomized study). *JACC* 2005;45:982-8.
- 93- Gyongyosi M, Khorsand A, Zamini S, Sperker W, Strehblow C, Kastrup J, et al. NOGA-guided analysis of regional myocardial perfusion abnormalities treated with intramyocardial injections of plasmid encoding vascular endothelial growth factor A-165 in patients with chronic myocardial ischemia: subanalysis of the EUROINJECT-ONE multicenter double-blind randomized study. *Circulation*. 2005; 112 (9 Suppl): I157-65
- 94- Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999.100 (Suppl II): II247–II256.
- 95- Jackson, K.A., Majka, S.M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C.J., Majesky, M.W., Entman, M.L., Michael, L.H., Hirschi, K.K., Goodell, M.A. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J. Clin. Invest.* 2001; 107: 1395– 1402.
- 96-Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, Shou M, Pierre A, Tio FO, Weissman NJ, Leon MB, Epstein SE, Kornowski R. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2001;37: 1726– 32.
- 97- Liu Y, Guo J, Zhang P, Zhang S, Chen P, Ma K, Zhou C. Bone marrow mononuclear cell transplantation into heart elevates the expression of angiogenic factors. *Microvasc Res*. 2004; 68: 156-60.

98- Bhakta S, Greco NJ, Finney MR, Scheid PE, Hoffman RD, Joseph ME, Banks JJ, Laughlin MJ, Pompili VJ. The safety of autologous intracoronary stem cell injections in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *J Invasive Cardiol.* 2006;18: 212-8.

99- Goodchild T, Pang W, Tondato F, Cui J, Otsuka Y, Frowein S, Unger M, Robinson K, Poznansky M, Chronos N. Safety of intramyocardial injection of autologous bone marrow cells to treat myocardial ischemia in pigs. *Cardiovasc Revasc Med.* 2006;7:136-145.

100- Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Simeone BR, Francisco JC, Miyague N, Olandoski M. Functional outcome of bone marrow stem cells: mononuclear versus mesenchymal stem cells after cellular therapy in myocardial scar in Wistar rats. *Transplant Proc.* 2006;38:1953-4.

101- Yokoyama S, Fukuda N, Li Y, Hagikura K, Takayama T, Kunimoto S, Honye J, Saito S, Wada M, Satomi A, Kato M, Mugishima H, Kusumi Y, Mitsumata M, Murohara T. A strategy of retrograde injection of bone marrow mononuclear cells into the myocardium for the treatment of ischemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;40:24-34.

102- Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet.* 2002; 360:427-35.

103- Strauer B, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation.* 2002; 106:1913-8.

104- Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J, Fernandez ME, Peñarrubia MJ, de la Fuente L, et al. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res.* 2004; 95: 742–748.

105- 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;364:141–148.

106- Schächinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Abolmaali ND, 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;44:1690–1699.

107- 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: 1199-209.

108- 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: 113-21.

109- Schächinger 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: 1210-21.

110- Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002; 106: 3009-17

111- 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; 361:47-9.

112- Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Silva GV, et al. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2004;110:II213-8.

113- Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*. 2001;7:430-6.

114-Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10344-9.

115-Pompilio G, Cannata A, Peccatori F, Bertolini F, Nascimbene A, Capogrossi MC, Biglioli P. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for myocardial regeneration: a novel strategy for cell collection and surgical injection. *Ann Thorac Surg*. 2004;78:1808-12.

116-Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*. 2003; 361:45-6.

117-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.

118-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: 1727-30.

119- Devine SM, Carter S, Soiffer RJ, Pasquini MC, Hari PN, Stein A, et al. Low risk of chronic Graft-versus-Host disease and relapse associated with T-Cell-depleted peripheral blood stem

cell transplantation for Acute Myelogenous Leukemia in first remission: results of the Blood and Marrow transplant clinical trials network protocol 0303. *Biology of blood and Marrow Transplantation* 2011;17: 1343-1351.

120- Cerqueira MD, Weissman NJ, Dilsizian V, Jacobs AK, Kaul S, Laskey WK, et al. Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart. A statement for healthcare professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. *Int J Cardiovasc Imaging* 2002;18: 539-43.

121- Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. American Society of Echocardiography recommendations for chamber quantification: A report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 2005; 18: 1440-63.

122- Spertus J, Windor J, Dewhorst T, Deyo R, Prodzinski CJ, McDonnell M, Fihn S. Development and evaluation of the Seattle Angina Questionnaire: A new functional status measure for coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 1995; 25: 333-41.

123- Handler CE, Sowton E. A comparison of the Naughton and modified Bruce treadmill exercise protocols in their ability to detect ischaemic abnormalities six weeks after myocardial infarction. *Eur Heart J.* 1984; 5:752-5

124- Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Writing Group on the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2012;33:2551-2567.

125- Ferrero de Loma-Osorio A, Díaz-Infante E, Macías Gallego A. Registro Español de Ablación con Catéter. XII Informe Oficial de la Sección de Electrofisiología y Arritmias de la Sociedad Española de Cardiología. *Rev Esp Cardiol.* 2013;66: 983-992.

126- Moss AJ, Zareba W, Hall EJ, Klein H, Wilber DJ, Cannom DS, et al. Prophylactic Implantation of a Defibrillator in Patients with Myocardial Infarction and Reduced Ejection Fraction. *N Engl J Med.* 2002; 346: 877-83.

127- Andrell P, Ekre O, Grip L, Währborg P, Albertsson P, Eliasson T, et al. Fatality, morbidity and quality of life in patients with refractory angina pectoris. *Int J Cardiol.* 2011 Mar 17; 147: 377-82.

128- Dilsizian V, Arighi JA, Diodarti JG, et al. Myocardial viability in patients with chronic coronary artery disease. Comparison of 99mTc-Sestamibi with Thallium reinjection and 18F-fluorodeoxyglucose. *Circulation*. 1994; 89: 578-587.

129- Kurbonov U, Dustov A, Bortouov A, Khidirou M, Mirojov G, Rahimov Z, et al. Intracoronary Infusión of Autologous CD133+ cells in miocardial infarction and Tracing bu Tc99m MIBI Scintigraphy of the Heart áreas involved in Cell Homing. *Stem CellsInt*. 2013; 2013 (582527):1-9.

130- Perin E, Willerson J, Pepine C, Henry T, Ellis S, Zhao D, et al. Effect of Transendocardial Delivery of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells on Functional Capacity, Left ventricular Function and Perfusion in Chronic Ischemia Heart Failure: The FOCUS-CCTRN Trial. *JAMA*. 2012; 307: 1717-1726.

131- Van Ramshorst J, Bax JJ, Beeres SL, Dibbets-Schneider P, Roes SD, Stokkle MP, et al. Intramyocardial bone marrow cell injection for chronic myocardial ischemia: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2009; 301: 1997-2004.

132- Liao L, Sarria-Santamera A, Matchar DB, Huntington A, Lin S, Whellan DJ, Kong DF. Meta-analysis of survival and relief of angina pectoris after transmymocardial revascularization. *Am J Cardiol*. 2005; 95: 1243-5.

133- 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; 28:2998-3005.

134- Losordo DW, Henry TD, Davidson C, Lee J, Acosta M, Boss T, et al. Intramyocardial, Autologous CD34+ Cell Therapy for Refractory Angina. *Cir Res*. 2011; 109: 428-436.

135- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004; 350:2335–2342.

136- Traverse H, Henry TD, Pepine CT, Wilerson JT, Zhao DX, Ellis SG, et al. Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTRN). 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: 2380-2389.

137- Heldman AW, DiFede DL, Fishman JE, Zambrano JP, Trachtenberg BH, Karantalis V, et al. Transendocardial mesenchymal stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TC-HFT randomized trial. *JAMA*. 2014; 311:62-73.

138-Chaitman BR, Pepine CJ, Parker JO, et al. Combination Assessment of Ranolazine in Stable Angina (CARISA) Investigators. Effects of ranolazine with atenolol, amlodipine o diltiazem on exercise tolerance and angina frequency in patients with severe chronic angina: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2004; 291: 309-316.

139- Fox K, Ford I, Steg PR, Tardif JC, Tendera M, Ferrari R; SIGNIFY Investigators. Ivabradine in stable coronary artery disease without clinical heart failure. *N Engl J Med* 2014; 371: 1091-9.

140- Verheye S, Julicoeur EM, Behan MW, Pettersson T, Sansbury P, Hill J, et al. Efficacy of a Device to Narrow the Coronary Sinus in Refractory Angina. *N Engl J Med*. 2015; 372: 519-27.

141-Jiménez-Quevedo P, González Ferrer JJ, Perín E. What to do when everything has failed: alternative treatment strategies for failure revascularisations. *EuroIntervention*. 2009; 5 Suppl D: 139-48.

142-Kornowski R, Hong MK, Leon MB. Comparison between left ventricular electromechanical mapping and radionuclide perfusión imaging for detection of myocardial viability. *Circulation*. 1998; 98: 1837-1841.

143- Premer C, Hare JM. Can Endothelial Progenitor Cells Treat Patients with Refractory Angina?. *Circ Res*. 2014;115:904-907.

144- Jiménez-Quevedo P, González-Ferrer JJ, Sabate M, Garcia-Moll X, Delgado-Bolton R, Llorente L, Bernardo E, Ortega-Pozzi A, Hernández-Antolín R, Alfonso F, Gonzalo N, Escaned J, Bañuelos C, Regueiro A, Marín P, Fernández-Ortiz A, Das Neves B, del Trigo M, Fernández C, Tejerina T, Redondo S, García E, Macaya C. Selected CD133+ Progenitor Cells to Promote Angiogenesis in Patients With Refractory Angina. Final Results of the PROGENITOR Randomized Trial. *Circ Res*. 2014; 115: 950-60.

PUBLICACIONES DEL ESTUDIO Y FUENTES DE FINANCIACIÓN

Fuentes de financiación

- **Beca sin restricciones de la Dirección General de Terapias Avanzadas y Trasplantes.**
Ministerio de Salud y política Social. “Ayudas para el Fomento de la Traslación de la Aplicación Terapéutica de Medicamentos Huérfanos y Terapias Avanzadas”.
- **Beca sin restricción de la Fundación Mutua Madrileña.**

Publicaciones

- Jiménez-Quevedo P, González Ferrer JJ, Perín E. What to do when everything has failed: alternative treatment strategies for failure revascularisations. **EuroIntervention. 2009; 5 Suppl D: 139-48.**
- Jiménez-Quevedo P, González-Ferrer JJ, Sabate M, Garcia-Moll X, Delgado-Bolton R, Lorente L, Bernardo E, Ortega-Pozzi A, Hernández-Antolín R, Alfonso F, Gonzalo N, Escaned J, Bañuelos C, Regueiro A, Marín P, Fernández-Ortiz A, Das Neves B, del Trigo M, Fernández C, Tejerina T, Redondo S, García E, Macaya C. Selected CD133+ Progenitor Cells to Promote Angiogenesis in Patients With Refractory Angina. Final Results of the PROGENITOR Randomized Trial. **Circ Res. 2014; 115: 950-60.**