



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Medicina**

**TESIS DOCTORAL**

**SEGUIMIENTO A LARGO PLAZO DE PACIENTES  
CON MIOCARDIOPATÍA DILATADA IDIOPÁTICA  
TRAS INFUSIÓN INTRACORONARIA DE  
CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA**

**Tesis presentada por Flor Baeza Garzón para la obtención del grado  
de Doctor en Medicina**

**DIRECTORES: Dr. Miguel Ángel Romero Moreno**

**Dr. José Suárez de Lezo Cruz Conde**

**Córdoba, julio 2016**

TITULO: *SEGUIMIENTO A LARGO PLAZO DE PACIENTES CON  
MIOCARDIOPATÍA DILATADA IDIOPÁTICA TRAS INFUSIÓN  
INTRACORONARIA DE CÉLULAS DE MEDULA OSEA*

AUTOR: *Flor Baeza Garzón*

---

© Edita: UCOPress. 2016  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---





**TÍTULO DE LA TESIS: SEGUIMIENTO A LARGO PLAZO DE PACIENTES CON MIOCARDIOPATÍA DILATADA IDIOPÁTICA TRAS INFUSIÓN INTRACORONARIA DE CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA**

**DOCTORANDO/A: M<sup>a</sup> FLOR BAEZA GARZÓN**

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma)

Certificamos que este trabajo se ha realizado bajo nuestra dirección, habiendo generado las siguientes comunicaciones en congresos nacionales e internacionales

1. En **“El Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares” de la SEC 2014** (Santiago de Compostela, 30-31 octubre y 1 noviembre 2014) se presentó: **“Seguimiento a 4 años de pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática tratados con infusión intracoronaria de células mononucleares de médula ósea”** Autores: Flor Baeza Garzón, Miguel Romero, Concepción Herrera, Manuel Pan, Soledad Ojeda, Javier Suárez de Lezo, Francisco Mazuelos, José Suárez de Lezo. Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba.
2. En el **“Congreso Andaluz de Cardiología “ 2015 ( Granada, 14-16 mayo 2015)** se presentó: **“Células madre en pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática, resultados a largo plazo”**, Flor Baeza Garzón, Carmen Morenate Navío, Miguel Ángel Romero Moreno, Manuel Pan Álvarez-Ossorio, Concha Herrera, Javier Suárez de Lezo, Soledad Ojeda Pineda, Dolores Mesa Rubio, Mónica Delgado Ortega, José Suárez de Lezo. Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba.

3. En “**Heart Failure 2015**”( Congreso Europeo de Insuficiencia Cardíaca, Sevilla 23-26 mayo 2015) se presentó: “**Long term follow up of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy treated with intracoronary infusion of autologous bone marrow cells**”,Autors: F. Baeza Garzón, M.Romero Moreno, C.Herrera, M.Pan Álvarez-Ossorio, MD. Carmona, S.Ojeda Pineda, D.Mesa Rubio, Jr. Suárez de Lezo, F. Mazuelos Bellido, J Suárez de Lezo Cruz Conde. Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba.

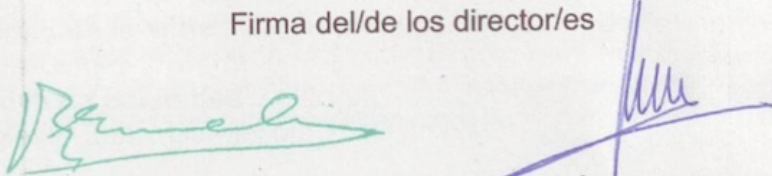
A su vez, este trabajo ha generado una publicación relacionada:

“ **Miocardopatía dilatada idiopática tratada con infusión intracoronaria de células autólogas de médula ósea: seguimiento a largo plazo**”, autores: Flor Baeza Garzón, Miguel Romero, Javier Suárez de Lezo, Soledad Ojeda, Concepción Herrera, José Suárez de Lezo. Revista Española de Cardiología, 2015,68(8): 726-8.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba,   27   de   julio   de   2016  

Firma del/de los director/es



Fdo.:José Suárez de Lezo                      Fdo.:Miguel Ángel Romero Moreno





## INDICE

<b>1. Introducción.....</b>	<b>5-36</b>
1.1 Historia natural de la enfermedad.....	6-8
1.2 Terapia de referencia.....	8-10
1.3 Experiencia preclínica con células madre.....	10-11
1.4 Indicaciones de la terapia celular.....	11-25
1.4.1.-Células madre en el infarto agudo de miocardio.....	13-18
1.4.2.-Células madre en la cardiopatía isquémica crónica.....	18-22
1.4.3.-Células madre en la miocardiopatía dilatada idiopática.....	22-24
1.4.4.-Células madre en la edad pediátrica.....	24-25
1.5 Terapia celular.....	26-32
1.5.1.- Tipos de terapia celular.....	26-28
1.5.2.- Mecanismos de acción.....	29-30
1.5.3.- Vías de administración.....	30-32
1.6 Resultados globales.....	32-34
1.7 Efectos indeseables asociados a la terapia.....	35-36
<b>2. Hipótesis y objetivos.....</b>	<b>37-39</b>
<b>3. Material y métodos.....</b>	<b>40-58</b>
3.1 Ensayo fase II: diseño inicial.....	41-42
3.2 Selección de los sujetos del ensayo.....	42-45
3.3 Terapia administrada.....	45-50



---

3.4 Seguimiento inicial de los sujetos.....	50-55
3.5 Valoración de los sujetos a largo plazo.....	55-57
3.6 Análisis estadístico.....	58
<b>4. Resultados.....</b>	<b>59-77</b>
4.1 Resultados inmediatos.....	60-69
4.2 Resultados a largo plazo.....	69-76
4.3 Limitaciones.....	77
<b>5. Discusión.....</b>	<b>78-89</b>
5.1 Resultados a largo plazo.....	79-82
5.2 Evolución de los respondedores y no respondedores en el seguimiento.....	82-83
5.3 Factores predictores de respuesta a largo plazo.....	83-89
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>90-91</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>92-132</b>



# **1. Introducción**

## 1.1 Historia natural de la enfermedad

Las enfermedades cardiovasculares suponen una de las causas más frecuentes de morbimortalidad en el mundo, con 17 millones de muertes cada año<sup>1</sup>, y dentro de ellas, la insuficiencia cardíaca (IC), es altamente prevalente. La principal causa de IC sigue siendo la cardiopatía isquémica aunque el origen idiopático supone un número no despreciable de casos. El tratamiento médico junto con otras medidas no farmacológicas han demostrado mejorar la función ventricular izquierda, el principal condicionante del pronóstico en estos enfermos. Algunas de estas alternativas terapéuticas, además, han demostrado conseguir un incremento de la supervivencia a corto-medio plazo. Sin embargo, hay pacientes que no consiguen mejoría significativa de la función ventricular a pesar del tratamiento “convencional” óptimo y persisten con clínica de IC, con los consecuentes ingresos hospitalarios. Estos pacientes suelen estar abocados como única alternativa al trasplante cardíaco en caso de cumplir los estrictos criterios de inclusión y de que surja un donante adecuado, con las implicaciones que éste supone en cuanto a calidad de vida, enfermedades asociadas y limitada durabilidad del injerto, junto a un pronóstico incierto.

El término cardiomiopatía ha sido utilizado desde hace décadas para nombrar a aquellas enfermedades que afectan directamente al músculo cardíaco provocando signos y síntomas de IC. Hasta 2006, las cardiomiopatías se habían dividido en tres grandes grupos, la *hipertrófica*, la *dilatada* (MD) y la *restrictiva*<sup>2</sup>; esta clasificación fue revisada y modificada tanto por la Asociación Americana de Cardiología<sup>3</sup> como por la Europea<sup>4</sup>, que incluyen otras entidades como la *miocardiopatía no compactada*, caracterizada por una excesiva trabeculación cuya afectación puede ser de uno o los dos ventrículos, y puede asociar dilatación y disfunción ventricular; existen formas esporádicas pero es común la asociación familiar, condicionada por mutaciones genéticas de proteínas sarcoméricas, entre otras. Otra entidad sería la cardiomiopatía de *Takotsubo* que supone una disfunción apical transitoria de origen no isquémico, con evolución variable. Según la última revisión americana<sup>3</sup> se considera que la MD presenta un origen mixto, provocada tanto por factores genéticos como no genéticos.

La MD presenta una prevalencia de 1 por cada 2500 individuos, siendo la tercera causa de IC y trasplante cardíaco. Se han postulado diversas causas de la misma, como infecciones, sobre todo virus como agentes causantes de miocarditis, del tipo coxsackievirus, adenovirus, parvovirus o VIH, aunque también pudiera deberse a afecciones miocárdicas provocadas por hongos, bacterias, micobacterias, rickettsias o parásitos como el *Trypanosoma cruzi* en la enfermedad de Chagas; otras causas posibles serían el consumo excesivo y prolongado de alcohol o la exposición a otros tóxicos como los quimioterápicos del tipo de las antraciclinas fundamentalmente, y otros agentes perjudiciales como el arsénico, el cobalto o el mercurio; otras enfermedades que se asocian a este tipo de afección cardíaca son las enfermedades neuromusculares tipo Duchenne o Becker entre otras distrofias, las enfermedades autoinmunes, mitocondriales o endocrino-metabólicas (como las asociadas al déficit de selenio o carnitina).

Según la clasificación europea<sup>4</sup> la MD supone una afectación primaria del miocardio que afecta a su estructura y función, produciéndose dilatación ventricular izquierda y disfunción sistólica, pudiendo también estar afectado el ventrículo derecho aunque esta condición no es necesaria para establecer el diagnóstico; todo ello sin existir ninguna causa subyacente conocida que pueda explicarlo (isquémica, hipertensiva o valvular) como refería anteriormente la clasificación americana<sup>3</sup>. Esta revisión hace que tengamos una clasificación dividida en dos, por un lado formas familiares o genéticas y por otro formas no familiares o no genéticas. También se describe aquí un término intermedio de *miocardiopatía dilatada congestiva*, para describir a pacientes con IC avanzada y disfunción sistólica ventricular izquierda severa que ocurre con hemodinámica no restrictiva y sin una excesiva dilatación ventricular izquierda. Otra forma sería la *miocardiopatía periparto*<sup>5</sup>, que ocurre en el último mes de embarazo o dentro de los primeros 5 meses después del parto. Entre sus causas se postulan la autoinmunidad generada por células fetales desde el niño a la madre durante el embarazo, el propio estrés hemodinámico que conlleva la gestación o que se trate de una miocarditis. Es más común en mayores de 30 años, múltiparas o embarazo gemelar, en presencia de hipertensión gestacional y tras el uso de tocolíticos.

En Europa se puede decir que el 50% de las MD presentan una etiología desconocida, hablando entonces de *MD idiopática*<sup>6</sup>; entre un 20% y un 35% han sido consideradas como familiares, y aunque existe variabilidad genética, predomina la herencia autosómica dominante<sup>7-9</sup>. Aunque algunos datos americanos apuntan a una cifra aproximada de 5.3 millones de personas de 20 años o más afectadas por esta patología, y sólo el 12% afectaría a personas de 80 o más años<sup>10</sup>. El pronóstico una vez se presenta la clínica de IC es poco alentador ya que entre un 40-60% aproximadamente fallecen a los 5 años, sobre todo si se asocian factores que condicionan la mala evolución de la MD como disfunción ventricular izquierda (la principal), trastornos de la conducción del tipo bloqueo de rama derecha o izquierda del haz de His, una presión telediastólica del ventrículo izquierdo (PTDVI) de más de 17 mmHg, un volumen telediastólico ventricular izquierdo (VTDVI) de más de 185 cc/m<sup>2</sup>, un índice cardíaco menor de 2,2 l/min/m<sup>2</sup>, o la presencia de cardiomegalia con un índice cardiorácio mayor a 0,53<sup>11</sup>.

La optimización del tratamiento médico, como se comentará a continuación, es capaz de mejorar el pronóstico y la clase funcional de estos enfermos<sup>12-14</sup> evitando la progresión hacia la clase funcional IV de la *New York Heart Association* (NYHA), hacia la muerte o el trasplante cardíaco<sup>15-16</sup>.

## 1.2 Terapia de referencia

En estos últimos años se han producido importantes avances terapéuticos que han contribuido a mejorar el infausto pronóstico de esta entidad<sup>17</sup>. Son los IECAS/ARA-II, los betabloqueantes y los antagonistas de la aldosterona los que han demostrado incrementar la fracción de eyección (FE) ventricular izquierda, el principal predictor de mortalidad<sup>18</sup>, como bien nos han mostrado diversos estudios como el CONSENSUS, ELITE, COPERNICUS, COMET o CHARM<sup>19-23</sup>. Además de éstos, estarían otros fármacos como son los diuréticos y la digital<sup>24</sup>, que han mostrado mejoría en los síntomas (disminuyendo la disnea o la congestión), la más reciente incorporación de la ivabradina<sup>25</sup>, con la importancia que tiene el control de la frecuencia cardíaca en esta entidad. A veces también se puede emplear la anticoagulación oral por la excesiva

dilatación ventricular con remanso de sangre que puede favorecer la formación de trombos en pacientes con taquiarritmias. Se está incrementando también el tratamiento con aminas vasoactivas para sujetos en clase funcional avanzada, concretamente con inotrópicos sensibilizadores al calcio (levosimendan) tanto en pacientes ingresados por descompensación aguda como en pacientes ambulatorios (con bombas de perfusión administradas a través de un port a cath) con el beneficio que supone<sup>26-28</sup>. A pesar de todo ello, en ocasiones hay pacientes que persisten en grado funcional II o más, para ellos existen otras opciones terapéuticas como la terapia de resincronización cardíaca (TRC) o trasplante cardíaco en pacientes muy seleccionados. Después del estudio CARE-HF<sup>29</sup>, sabemos que la TRC, es una técnica válida para el tratamiento de pacientes con disfunción ventricular e IC, mejorando la función, los signos y síntomas de IC, y el pronóstico, aunque también tiene dificultades, desde el procedimiento de la implantación del cable en seno coronario, que hasta en un 10 % no es posible, teniendo que implantarse epicárdico, hasta el hecho que un 30 % de los pacientes no responden a dicha terapia, además de ceñirse a indicaciones concretas, según nos muestran las guías de estimulación cardíaca<sup>30,31</sup>; y a todo esto añadimos que no siempre es fácil definir la necesidad o no de DAI asociado<sup>30</sup>. El trasplante cardíaco es un tratamiento que ha demostrado su eficacia en la IC terminal<sup>32,33</sup>, a pesar de las limitadas indicaciones así como otros problemas asociados (escasez de donantes, una supervivencia media del 50 % a 10 años, problemas derivados de la inmunosupresión crónica, etc) por lo que sólo se debe indicar en pacientes de alto riesgo, en los cuales se prevee una supervivencia dejada a su evolución natural inferior a la del nuevo injerto. Por otro lado estarían las asistencias ventriculares, empleadas en ocasiones ya no sólo como puente al trasplante sino como terapia de destino, con unas indicaciones y resultados iniciales también limitados.

Por todo esto parece razonable buscar alternativas terapéuticas a una enfermedad que hoy por hoy está desbancando a la cardiopatía isquémica como causa principal de trasplante cardíaco<sup>34</sup> y esta es la MD idiopática. Con ello nos referimos a la terapia regenerativa con células madre, que tras llevar dos décadas empleándose en casos de

cardiopatía isquémica<sup>35</sup>, se ha empezado a utilizar también en casos de origen idiopático, con resultados alentadores.

### **1.3 Experiencia preclínica con células madre**

Desde los años 90 se empezó a pensar en experimentar con diversos tipos de animales a los cuales se les inducía un infarto agudo, implantándoles células madre con el fin de regenerar el miocardio, y ya los primeros estudios al respecto mostraban un efecto beneficioso en cuanto a mejoría de la FE respecto a controles<sup>36-41</sup>. Algunos trabajos demostraron no sólo aumento de la FE sino también mejoría de la supervivencia<sup>42-44</sup>. Poco después se empezó a usar esta terapia en corazones animales no isquémicos, obteniendo buenos resultados tras una única inyección intramiocárdica de cardiomiocitos en ratas<sup>45</sup> o mejores incluso tras múltiples inyecciones intramiocárdicas<sup>46</sup>. También se comenzó a infundir vía intracoronaria mioblastos autólogos<sup>47</sup>, mioblastos no autólogos<sup>48</sup> y células embrionarias de ratón<sup>49</sup> en ratas con MD provocada por doxorubicina con la consecuente mejoría de la FE pocas semanas después. Otros estudios más recientes sobre MD inducida por este mismo quimioterápico, han mostrado el efecto beneficioso de las inyecciones únicas<sup>50</sup> o repetidas de células mesenquimales en ratas<sup>51</sup>, sobreviviendo el 100% de ellas además de conseguirse reducciones significativas del volumen telediastólico y aumentos de la FE. Otros estudios en perros<sup>52</sup> también mostraron buenos resultados empleando mioblastos de músculo esquelético. Varios autores han utilizado progenitores endoteliales para el tratamiento de MD autoinmune en ratas con aceptables resultados<sup>53</sup>. En la actualidad, algunos estudios experimentales en modelos animales de MD tratada mediante células autólogas de médula ósea (MO) o mioblastos (asociados o no a factores de crecimiento)<sup>54-56</sup> han mostrado resultados prometedores al igual que tras el uso de células mesenquimales cultivadas infundidas a conejos con mejoría de la FE<sup>57</sup>. También se ha estudiado el efecto del pretratamiento de células mesenquimales con 5-azacytidina en modelos murinos con resultados dispares<sup>58-60</sup>, dando a entender que una posible vía de actuación pudiera ser la inducción de miogénesis, angiogénesis e



inhibición de la fibrosis miocárdica; de acuerdo con estos resultados parece ser que los efectos beneficiosos, en concreto de las células mesenquimales en animales, podrían deberse tanto a su capacidad de diferenciación a cardiomiocitos y células endoteliales como a la posibilidad de liberar factores angiogénicos, mitóticos y antiapoptóticos.

La investigación en animales sobre terapia regenerativa sigue al orden del día. Uno de los últimos estudios publicados es el de Tao y colaboradores<sup>61</sup> en este año 2015. Comparan el efecto de la infusión en minipigs de células mononucleares de MO frente a células mesenquimales tras inducir un infarto agudo de miocardio (IM), sin diferencias de FE entre grupos en este caso pero con mejorías de la perfusión miocárdica valorada por técnicas de Medicina Nuclear. Estos son sólo algunos ejemplos de lo más representativo en cuanto a estudios experimentales se refiere, cuya importancia reside en ser el preámbulo o experiencia previa a su uso en seres humanos.

#### **1.4 Indicaciones de la terapia celular**

En los últimos años se ha producido un incremento en la utilización de la terapia regenerativa para contribuir al tratamiento de diversas enfermedades. Para ello se han estudiado las células madre o “stem cells” que están presentes en la mayoría de los tejidos con capacidad de regenerar el daño tisular. Su uso se encuentra más extendido en la patología cardíaca, quizás debido a la importancia que tienen las enfermedades cardiovasculares en la población dada su alta prevalencia y elevada morbimortalidad, asociado al hecho que disponemos de diversas exploraciones complementarias útiles para evaluar el efecto que provocan las células madre a este nivel y hacer así más evidentes los resultados. Desde hace más de una década se está utilizando la terapia regenerativa con células madre en el IM, posteriormente en la IC de origen isquémico para emplearse más tarde en la IC de origen no isquémico, aunque no hay uniformidad entre los diferentes trabajos publicados en cuanto a la vía de administración, tipo y número de células a infundir, momento idóneo para administrarla, sus principales indicaciones e incluso los factores que puedan estar relacionados con una mejor respuesta a la misma, lo que hace difícil el poder comparar resultados entre todos ellos,

esto añadido a la dificultad por el desconocimiento de los mecanismos de acción exactos de las células madre a nivel cardíaco que, a pesar de las teorías propuestas, sigue siendo una incógnita<sup>62</sup>.

El primer escenario clínico “cardiológico” en el que se comenzó a investigar nuevas terapias biológicas fue en la cardiopatía isquémica. Se pensó en la posibilidad de sustituir el tejido necrosado por miocardio normofuncionante, teniendo en cuenta que la pérdida de algo más de mil millones de miocardiocitos puede implicar la aparición de IC, y que el miocardio aunque lo intenta, tiene poca capacidad por sí mismo de regenerarse de forma natural (mediante la movilización de células madre de MO que migran hasta el corazón para diferenciarse in situ a miocardiocitos). Por todo ello, los avances de los últimos años en este campo se han dirigido a facilitar ese proceso y se han basado en la administración de células madre, fundamentalmente progenitoras mononucleadas de MO. Dentro de la cardiopatía isquémica este tratamiento puede emplearse en casos con IM en su fase aguda o en casos con IM “crónico” revascularizado o incluso en enfermedad coronaria no revascularizable, que desarrollen IC secundaria a la disfunción ventricular izquierda residual. Es en el primero donde parece existir mayor aplicabilidad a este tipo de tratamiento, basándonos en la teoría de que ese miocardio presenta mayor capacidad regenerativa de forma espontánea por mecanismos de quimiotaxis. De esta manera, numerosas células madre son capaces de acudir a la llamada y una vez anidadas allí regenerar el miocardio lesionado. Si aprovechando ese contexto tan favorable se infunden artificialmente células madre, sería una contribución añadida a este proceso que ya se está produciendo de manera natural.

El otro escenario clínico sería la IC en la MD no isquémica (refiriéndonos a la de causa desconocida o idiopática), sobre la cual hay menos experiencia en el campo de la terapia celular y sobre la que hay mayor desconocimiento en cuanto a sus resultados a largo plazo o los factores predictores de respuesta se refiere.

Otro punto a considerar, sería el uso de la terapia regenerativa en la infancia como tratamiento coadyuvante de la IC motivada por diversas causas.

### 1.4.1.- Células madre en el infarto agudo de miocardio

La **Tabla 1** muestra una revisión de la literatura con los principales trabajos publicados sobre terapia celular en el IM agudo. Se muestran una serie de datos de interés como el número de pacientes incluidos (si se hizo con grupo control o no), el número de células madre utilizadas (y en concreto las que son CD34+), el tiempo desde el infarto hasta la administración de la terapia, la FE basal media de la que parten los pacientes, su ganancia en porcentaje en un tiempo determinado y, por último, el método de medida.

Desde hace varios años diversos autores nos han mostrado como tras un IM agudo la infusión de células madre han supuesto beneficios no sólo con el incremento de los índices de perfusión de los segmentos infartados sino también con mejoría en la contractilidad regional y global contribuyendo al rescate del miocardio hibernado con la reducción de la fibrosis miocárdica<sup>66</sup>, por mecanismos hoy en día en parte desconocidos. Si bien es cierto que la apertura precoz de la arteria responsable tras un IM mejora la supervivencia tanto a corto como a largo plazo así como la situación clínica<sup>117-119</sup>, esa terapia de reperfusión precoz aunque es primordial, no es suficiente en muchos casos para conseguir la mejoría de la FE ventricular izquierda requerida para evitar la IC<sup>67</sup> ya que el remodelado ventricular que se produce tras el evento agudo producido principalmente por la transformación necrótica y otra serie de cambios que se producen en el tejido perinfarto y que da lugar a la dilatación y disfunción ventricular izquierda<sup>64</sup> es el responsable de dicha IC postinfarto y es lo que condiciona el principal determinante del mal pronóstico en estos sujetos. Para revertir en parte este remodelado adverso entrarían en juego la neovascularización y neoformación de miocardiocitos que ocurre tras el IM de manera natural. Por ello comenzaron a postularse teorías que posteriormente han mostrado su beneficio clínico sobre el efecto que podrían tener las células madre derivadas de MO o los progenitores hematopoyéticos derivados de sangre periférica (sobre lo que más se ha estudiado), entre otros precursores celulares, sobre la regeneración miocárdica y la neovascularización del miocardio isquémico<sup>65</sup> y así combatir ese remodelado ventricular que resulta tan perjudicial; a su vez, la contribución de estos progenitores a la reducción del área infartada, también ayuda a ese

propósito<sup>80,90</sup>. El incremento de la FE se muestra independiente a la reserva contráctil del miocardio por lo que el efecto resultante del rescate del miocardio hibernado con la reperfusión no es suficiente para explicar los beneficios observados, por lo que podrían ser atribuibles al efecto de la terapia celular<sup>67</sup>, y a pesar de ser un punto que se ha tenido en cuenta en diferentes ensayos clínicos, es difícil diferenciar ambos efectos<sup>81</sup> y cuantificar los resultados reales por separado.

Así, el 30 de marzo de 2001, Strauer y colaboradores<sup>63</sup> mostraron por primera vez el resultado obtenido tras la infusión intracoronaria de células madre mononucleadas de MO en un varón de 46 años que había sufrido un IM agudo. Aunque son muchos los trabajos publicados desde entonces, nuestro grupo también tiene amplia experiencia en ese campo. Suárez de Lezo y colaboradores en 2007<sup>81</sup>, presentó quizás unos de los resultados más optimistas de la literatura, mostrando una serie de 30 pacientes con recanalización precoz de la arteria responsable. Los pacientes fueron asignados a 3 grupos: 10 a grupo control, 10 a infusión intracoronaria de  $9 \pm 3 \times 10^8$  células mononucleadas de MO de los cuales  $17 \pm 13 \times 10^6$  fueron CD34+ administrados en el día 7 ( $\pm 2$  días) tras sufrir el IM y otros 10 a una infusión de una cantidad similar de progenitores pero tras emplear durante 10 días desde el día 5 tras el IM, factor estimulante de colonias (G-CSF). A los 3 meses se midió el efecto mediante angiografía y se comprobó una ganancia de FE del 20% en el grupo de infusión de los progenitores hematopoyéticos, mientras que en los controles mejoró un 6% y en los que se administró el G-CSF para la movilización de progenitores sólo mejoró un 5%; así en el primer grupo se obtuvo una mayor recuperación de la FE que a su vez se relacionó con una mayor reserva contráctil manifestada con la mejoría de la función postextrasistólica.

Hay que tener en cuenta que la mejoría de la FE tras la revascularización del miocardio es bastante variable. En cualquier caso no suele ser inmediata y no siempre se produce, pudiendo ocurrir una recuperación completa o parcial; hay una proporción no despreciable de casos en los que la FE incluso empeora, y este aspecto ha de tenerse en cuenta a la hora de interpretar resultados.

De todos los trabajos que se muestran en la **Tabla 1**, podríamos destacar también el de Janssen publicado en 2006<sup>80</sup> por ser el primer ensayo doble ciego aleatorizado y controlado. También alguno de estos trabajos relata la importancia de la mejoría no sólo de la FE global sino de la deformación regional introduciendo términos ecocardiográficos de strain<sup>88</sup>. La mayoría han empleado la infusión de células madre vía intracoronaria, salvo Nogueira<sup>89</sup> y Silva<sup>97</sup>, ambos trabajos publicados en 2009, que emplearon la vía intracoronaria e intravenosa, el primero no encontró diferencias entre ambos grupos y el segundo obtuvo resultados favorables sólo en el abordaje intracoronario. Casi la totalidad de los estudios muestran resultados a corto-medio plazo, siendo más escasos los que ofrecen seguimientos a largo plazo<sup>101, 108</sup> a 3 años, a 4 años<sup>96</sup> o el ensayo TOPCARE AMI publicado en 2011, a 5 años<sup>109</sup> con una ganancia neta de la FE del 11%. Yousef en 2009<sup>98</sup> también realiza un largo seguimiento de 5 años aunque con resultados más discretos. Algunos trabajos recogen a su vez otros beneficios tras la administración de células madre, como la mejoría del grado funcional según la clasificación de la NYHA o en el test de los 6 minutos marcha<sup>120</sup> así como en los parámetros de la ergometría con consumo de oxígeno con incrementos de los valores del VO2 máximo<sup>103,120</sup>.

**Tabla 1.** Terapia regenerativa en el IM

Autor	Nº pacientes	CMN infundidas (x10 <sup>6</sup> )	CD34+ infundidas (x10 <sup>6</sup> )	IAM-terapia (días)	FE basal (%)	Ganancia FE	Método medida
Strauer <sup>63</sup> (2001)	1 terapia No controlado	0.12	--	6	--	16% (3 meses)	SPECT
Strauer <sup>64</sup> (2002)	10 terapia 10 controles	0.28	0.59±0.78	7±2	57±8	5% (3 meses) (ns)	ANGIO
Assmuss <sup>65</sup> (2002) TOPCARE-AMI	19 terapia 11 controles	--	7.35±7.31	4.3±1.5	52 ±10	<b>8%</b> (4 meses)	ANGIO
Britten <sup>66</sup> (2003)	28 terapia No controlado	2.38 ± 0.79	5.5±2.8	4.7±1.7	44±10	<b>5%</b> (4 meses)	RMN
Schächinger <sup>67</sup> (2004) TOPCARE AMI	59 terapia No controlado	2.13 ± 0.75	2.6±2.5	4.9±1.5	50±10	<b>9%</b> (12 meses)	RMN
Fernández <sup>68</sup> Avilés (2004)	20 terapia 13 controles	0.78 ± 0.41	78±0.41	13.5±5.5	51±7	<b>6%</b> (6 meses)	RMN
Chen <sup>69</sup> (2004)	34 células 35 controles	540 ± 85	--	18	49±9	<b>18%</b> (6 meses)	SPECT
Wollert <sup>70</sup> (2004) BOOST	30 terapia 30 controles	24.6 ± 9.4	9.5±6.3	4.8±1.3	50±10	<b>7%</b> (6 meses)	RMN
Ruan <sup>71</sup> (2005)	9 terapia 11 controles	--	--	≤7	53±9	<b>6%</b> (6 meses)	ECO
Bartunek <sup>72</sup> (2005)	35 terapia No controlado	--	15.4±3.3x10 <sup>6</sup>	11.6±1.4	45±2	<b>7%</b> (4 meses)	ANGIO
Lunde <sup>73</sup> (2006)	50 terapia 50 controles	0.68(mediana)	0.7(mediana)	6±1.3	42±11	<b>8%</b> (6 meses)	SPECT
Schächinger <sup>74</sup> (2006) REPAIR-AMI	95 terapia 92 controles	2.36±1.74	3.6±3.6(mediana)	4.4±1.3	48±9	<b>6%</b> (4 meses)	ANGIO
Ge <sup>75</sup> (2006)	10 terapia 10 controles	0.4	0.19x10 <sup>7</sup>	≤7	53±9	<b>5%</b> (6 meses)	ECO
Kang <sup>76</sup> (2006) MAGIC	25 terapia 25 controles	10-20	7x10 <sup>7</sup>	7±1	52±10	<b>5%</b> (6 meses)	RMN
Meluzin <sup>77</sup> (2006)	22 terapia 22 terapia 22 controles	1 0.1	--	≤7	42	<b>6%</b> (3 meses)	SPECT
Meyer <sup>78</sup> (2006) BOOST	30 terapia 30 controles	24.6	9.5±6.3	4.8±1.3	50±10	<b>7%</b> (6 meses)	RMN
Huang/Yao <sup>79</sup> (2006)	20 terapia 20 controles	1.8	--	≤7	44±7	<b>7%</b> (6 meses)	RMN
Janssens <sup>80</sup> (2006)	33 terapia 34 controles	1.72±0.72	2.8±1.7	≤7	48±7	<b>3%</b> (4 meses)	RMN
Suárez de Lezo <sup>81</sup> (2007)	10 terapia 10 GCSF 10 controles	9±3	17±13	7±2	37±5	<b>20%</b> (3 meses)	ANGIO
Penicka <sup>82</sup> (2007)	17 terapia 10 control	26.4	1.3	4-11	39±6	<b>15%</b> (4 meses) ns	ECO

Autor	Nº pacientes	CMN infundidas (x10 <sup>8</sup> )	CD34+ infundidas (x10 <sup>6</sup> )	IAM-terapia (días)	FE basal (%)	Ganancia FE	Método medida
Lj <sup>83</sup> (2007)	35 terapia 23 controles	0.725	--	>7	50±8	7% (6 meses)	ECO
Choi <sup>84</sup> (2007)	10 terapia 63 controles	20.3±6.9	3.12±2.19x10 <sup>6</sup>	5.9±2.7	40±6	9% (6 meses)	ECO
Tatsumi <sup>85</sup> (2007)	18 terapia 36 controles	50	0.12±0.2	<5	43±12	9% (6 meses) ns	ECO
Huikuri <sup>86</sup> (2008) FINCELL	40 terapia 40 controles	4±2	2.6±1.6x10 <sup>6</sup>	2.9±1.5	59±11	7% (6 meses)	ANGIO
Lunde <sup>87</sup> (2008) ASTAMI	50 terapia 50 controles	0.68 (mediana)	0.7 (mediana)	6±1.3	42±11	3% (12 meses) ns	ECO
Herbots <sup>88</sup> (2009)	33 terapia 34 controles	1.72±0.72 (mononucleadas) 3.04±1.28 (nucleadas)	--	≤24h ICP (3.7h IM)	56±7	4% (4 meses) ns	ECO
Nogueira <sup>89</sup> (2009)	14 terapia (a) 10 terapia (v) 6 controles	1	--	5.5±1.28 (a) 6.1±1.37 (v)	48±10 (a) 49±7 (v)	7% (6 meses) ns	ECO
Lipiec <sup>90</sup> (2009)	39 sujetos 2:1 terapia vs controles	--	--	3-10		¿! (6 meses) ns	SPECT
Plewka <sup>91</sup> (2009)	40 terapia 20 controles	1.4±0.5	3.06±2.18	≤7	35±6	10% (6 meses) 11% (12 meses) 10% (24 meses)	ECO
Tendera <sup>92</sup> (2009) REGENT	80 terapia (no seleccionada) 80 terapia (CD34+) 40 controles	1.78x10 <sup>8</sup>	1.90x10 <sup>6</sup>	2-9	35±2	5% (6 meses) ns	RMN
Dill <sup>93</sup> (2009) REPAIR AMI	27 terapia 27 controles	--	--	--	--	7% (12 meses)	RMN
Hare <sup>94</sup> (2009)	39 terapia 21 controles	2.5x10 <sup>6</sup>	--	--	47±3	10% (6 meses) ns	RMN
Yao <sup>95</sup> (2009)	12 terapia 1 dosis 15 terapia 2 dosis 12 controles	1.9±1.2 2±1.4 + 2.1±1.7 (3 meses)	2.4±0.9%	4.3±1.3	34±5	12% (12 meses) (mejor 2 dosis)	RMN
Cao <sup>96</sup> (2009)	41 terapia 45 controles	0.5±0.12	1.8±0.6%	7	39±3	9% (6 meses) 9% (12 meses) 11% (4 años)	ECO
Silva <sup>97</sup> (2009)	14 terapia ic 10 terapia iv 6 controles	100	--	5.5±1.3 6.1±1.4	41±10	6% (6 meses)	SPECT
Yousef <sup>98</sup> (2009) BALANCE	62 terapia 62 controles	0.61±0.39	--	7±2	52±11	7% (3 meses) 6% (6 meses) 5% (60 meses)	ANGIO
Castellani <sup>99</sup> (2010)	5 terapia 5 terapia + G-CSF 5 controles	0.059	No usadas	11-15	--	6 y 12 meses (ns)	SPECT
Grajek <sup>100</sup> (2010)	31 terapia 14 controles	23.4±12	3.89±1.45	4-6	50±10	6 y 12 meses (ns)	ECO
Wohrle <sup>101</sup> (2010)	29 terapia 13 controles	3.8±1.3	0.8±0.3	7±3	54±9	6,12 y 36 meses (ns)	RMN

Autor	Nº pacientes	CMN infundidas (x10 <sup>8</sup> )	CD34+ infundidas (x10 <sup>6</sup> )	IAM-terapia (días)	FE basal (%)	Ganancia FE	Método medida
Traverse <sup>102</sup> (2010)	30 terapia 10 controles	1	1.6±0.73	3-10	49±10	<b>6.2%</b> (6 meses)	RMN
Piepoli <sup>103</sup> (2010)	19 terapia 19 controles	4.2	2	4±1	39±1	<b>9%</b> (12 meses)	SPECT
Hirsch <sup>104</sup> (2011)	69 terapia MO 66 terapia S.P. 65 controles	2.96±1.64 2.87±1.37	4 0.3	3-8	43±9	4 meses (ns)	RMN
Quyumi <sup>105</sup> (2011)	16 terapia 15 controles	5, 10 o 15	5, 10 o 15	8.3	48±10	<b>5%</b> (6 meses)	RMN
Roncali <sup>106</sup> (2011) BONAMI	52 terapia 49 controles	--	98.3±8.7	9.3±1.7	36±7	6 meses (ns)	ECO RMN
Traverse <sup>107</sup> (2011) lateTIME	58 terapia 29 controles	1.5	1.73	17.4	36±6	6 meses (ns)	RMN
Beitnes <sup>108</sup> (2011) ASTAMI	50 terapia 50 controles	0.068	--	5-8	46±9	3 años (ns)	ECO
Leistner <sup>109</sup> (2011) TOPCARE AMI	55 terapia No controlado	--	7.35±7.31	4.3±1.5	46±10	<b>11%</b> (5 años)	RMN
Srimahachota <sup>110</sup> (2011)	11 terapia 12 controles	4.2	--	--	34±8	<b>1%</b> (6 meses) (ns)	RMN
Maki <sup>112</sup> (2012) FINCELL-INSIGHT	11 terapia 8 controles		2.9±2	3	67±5	6 meses (ns)	RMN SPECT
Turan <sup>113</sup> (2012)	42 terapia 20 controles	96±32	438±152	7	43±10	<b>11%</b> (12 meses)	ANGIO
Sürder <sup>114</sup> (2013)	66 terapia (precoz) 67 terapia (tardía) 67 controles	0.5-5	1.6-1.45	5-7 días vs 3-4 sem	35±16	4 meses (ns)	RMN
Lee <sup>115</sup> (2014)	33 terapia 36 controles	0.72±0.09	--	25±2.4	48±8	<b>6%</b> (6 meses)	SPECT
San Román <sup>116</sup> (2015) TECAM	30 terapia 30 G-CSF 29 terapia+GCSF 31 controles	0.83 5.60	1.03	7-8	45-49	<b>6%</b> (12 meses) (ns)	RMN

ns: no estadísticamente significativo; MO: médula ósea; SP: sangre periférica; im: vía de administración intramiocárdica; ic: vía de administración intracoronaria

#### 1.4.2.- Células madre en cardiopatía isquémica crónica

Los principales ensayos clínicos publicados sobre terapia celular en IC crónica de origen isquémico se exponen en la **Tabla 2**.



**Tabla 2.** Terapia celular en el IM crónico

Autor	Nº pacientes	CMN infundidas (x10 <sup>6</sup> )	CD34+ infundidas (x10 <sup>6</sup> )	IAM-terapia (días)	FE basal (%)	Ganancia FE	Método medida
Menasche <sup>121</sup> (2003)	10 células	8.71	--	--	24±1	<b>8%</b> (10 meses)	ECO
Perin <sup>122</sup> (2003)	14 células 7 controles	0.26±0.06	2.44	--	30±6	<b>6%</b> (2 meses)	ECO
Erbs <sup>123</sup> (2005)	13 células 13 controles	0.69±0.14	--	225±87	52±4	<b>14%</b> (3 meses)	RMN
Strauer <sup>124</sup> (2005) IACT Study	18 células 18 controles	0.90	--	823.5±945	52±9	<b>8%</b> (3 meses)	ANGIO
Patel <sup>125</sup> (2005)	10 células 10 controles	0.22	22	--	29±4	<b>17%</b> (6 meses)	ECO
Katritsis <sup>126</sup> (2005)	11 células 11 controles	0.02-0.04	--	242±464	42±8	<b>2%</b> (4 meses) (ns)	ECO
Hendrikx <sup>127</sup> (2006)	10 células 10 controles	0.006±0.003	1.42	217±162	43±10	-- (4 meses) (ns)	RMN
Kang <sup>128</sup> (2006) MAGIC cell-3-DES	16 células 16 controles	10-20+G-CSF	7	517±525	49±13	<b>1%</b> (6 meses) (ns)	RMN
Assmus <sup>129</sup> (2006)	24 células SP 28 células MO 23 controles	2.05±1.1	--	2470±2196	41±11	<b>2%</b> (3 meses)	ANGIO
Mocini <sup>130</sup> (2006)	18 células 18 controles	2.92±2.32	--	>6 meses	46	<b>5%</b> (3 meses)	ECO
Fuchs <sup>131</sup> (2006)	27 células No controlado	0.28±0.27	2.2	<6 meses	48±9	<b>2%</b> (3 meses) (ns)	SPECT
Gao <sup>132</sup> (2006)	14 células 14 controles	0.04	1.3	--	34±2	<b>11%</b> (3 meses)	ECO
Stamm <sup>133</sup> (2007)	11 células 4 controles	0.011- 0.84	29.5	40-50 (mediana)	39±9	<b>11%</b> (6 meses) <b>9%</b> (18 meses)	ECO
Manginas <sup>134</sup> (2007)	12 células 12 controles	--	8±4	43.9±38.4 meses	27±7	<b>3%</b> (28 meses)	ECO
Tse <sup>135</sup> (2007) PROTECT-CAD trial	10 células 9 células 9 controles	0.17±0.034 vs 0.42±0.28	0.79±0.66 vs 1.38±1.70 (ns)	--	52±9	<b>5%</b> (6 meses)	RMN
Beeres <sup>136</sup> (2007)	15 células	0.94±0.14	--	--	23±8	<b>4%</b> (3 meses)	SPECT
Diederichsen <sup>137</sup> (2008)	32 células	6.47±3.82	9.7±6.3	--	33±9	<b>1%</b> (8 meses) (ns)	ECO
Yao <sup>138</sup> (2008)	24 células 24 controles	1.80	--	13±8 meses	--	-- (6 meses) (ns)	RMN
Zhao <sup>139</sup> (2008)	18 células 18 controles	6.59±5.12	--	--	36±7	<b>13%</b> (6 meses)	ECO

Autor	Nº pacientes	CMN infundidas (x10 <sup>6</sup> )	CD34+ infundidas (x10 <sup>6</sup> )	IAM-terapia (días)	FE basal (%)	Ganancia FE	Método medida
Ang <sup>140</sup> (2008)	21 células im 21 células ic 20 controles	0.85±0.56	0.14±0.17 vs 0.25±0.25	>180	25-28±8	(6 meses) (ns)	RMN
Van Ramshorst <sup>141</sup> (2009)	25 células 25 control	0.98±0.06	2.4±0.9	--	56±12	<b>3%</b> (3 meses) (ns)	RMN
Akar <sup>142</sup> (2009)	25 células 25 controles	12.9±0.9	31.9±4.4	397±467	25±4	<b>11%</b> (6 meses) <b>9%</b> (12 meses)	ECO
Pokushalov <sup>143</sup> (2010)	55 células 54 controles	0.41±0.16	--	--	27.8±3.4	<b>4%</b> (12 meses)	--
Strauer <sup>144</sup> (2010) STAR	191 células 200 controles	0.07±0.03	--	8.5±3.2 años	29±13	<b>7%</b> (3 meses) <b>9%</b> (12 meses) <b>8%</b> (60 meses)	ANGIO
Suárez de Lezo <sup>145</sup> (2010)	19 células No controlado	10.02±0.9	23.5±3.7	>30	27±8	<b>5%</b> (6 meses) <b>10%</b> (6 meses)	ANGIO ECO
Rivas-Plata <sup>146</sup> (2010)	23 células 11 controles	4.07	--	>30	26±4	<b>11%</b> (26 meses)	ECO
Yerebakan <sup>147</sup> (2011)	35 células 20 controles	0.06 CD133+	--	>14	41±8	<b>9%</b> (6 meses)	ECO
Chugh <sup>148</sup> (2012) SCIPIO trial	20 células 13 controles	0.01x10 <sup>6</sup>	--	--	27±2	<b>8%</b> (4 meses) <b>14%</b> (12 meses)	RMN
Hansen <sup>149</sup> (2014)	32 células No controlado	0.015±0.76	15±5 vs 32±9	>6 meses	33±9	<b>1%</b> (7 años) (ns)	ECO
Oi Z <sup>150</sup> (2015)	24 células 18 controles	--	--	--	36±1	<b>13%</b> (6 meses) (ns)	ECO

ns: no estadísticamente significativo; MO: médula ósea; SP: sangre periférica; im: vía de administración intramiocárdica; ic: vía de administración intracoronaria

La IC de origen isquémico está en aumento debido al incremento de la supervivencia por las técnicas de revascularización tanto percutánea como quirúrgica asociadas al tratamiento médico óptimo<sup>62,151-153</sup>. Tradicionalmente el incremento de la FE en el IM ha sido generalmente del 3-4%<sup>152,154</sup>. Para mejorar esto se comenzaron a proponer otras alternativas terapéuticas, y empezaron a realizarse estudios en fase I y II que han demostrado la seguridad y factibilidad de la terapia regenerativa en la cardiopatía isquémica crónica. Se han realizado otros estudios con revascularización y concomitantemente administración de células madre siendo aún más difícil evaluar el efecto por separado de la revascularización coronaria y de la administración de células, al igual que ocurría en el IM agudo<sup>125,127,139,155</sup>.

En el caso del infarto crónico el remodelado ventricular ya está establecido condicionando la disfunción ventricular izquierda que provoca clínica de IC y aboca al mal pronóstico de esta entidad; en este caso no existen los procesos inflamatorios que ocurrían en el IM agudo con movilización de factores quimiotácticos y a su vez de células madre residentes que favorezcan el efecto de las células infundidas<sup>145</sup>, de ahí que el preconditionamiento miocárdico provocando isquemia con la dilatación de balón en el momento de la infusión de células provocaría en estos casos un nicho apropiado para el anidamiento de las células administradas<sup>144</sup>. Son pocos los trabajos que comparan ambos escenarios, el IM agudo y el crónico. El autor Kang en 2006<sup>128</sup> nos compara el efecto de la terapia en ambos contextos, resultando significativo el incremento de FE en los casos de IM agudo pero no en los de IM crónico, y explican que esa diferencia pudiera residir en el hecho que en el primer caso se movilizan mayor número de células progenitoras, con mayor cantidad de progenitores endoteliales que promueven la angiogénesis. También argumentan que en el IM crónico el tejido viable es sustituido por escara y aunque en una pequeña proporción se promueva la angiogénesis, tiene menos repercusión sobre la FE. Todo ello se asocia a que los cambios tisulares producidos durante la isquemia aguda favorecen la diferenciación de células y su mayor anidamiento. Destacar también que el trabajo de Losordo en 2007<sup>156</sup>, que mostró el primer ensayo en humanos en fase I/II en el que se realizó inyección intramiocárdica de CD34+ en pacientes con angina intratable. Igual que ocurría con el IM agudo, en la IC isquémica crónica la mayoría de los trabajos nos muestran resultados a corto-medio plazo, y son pocos los que presentan seguimientos más largos, como Strauer en 2010<sup>144</sup> (5 años de seguimiento) o Hansen en 2014 (7 años de seguimiento)<sup>149</sup>.

En total, en ninguno de los ensayos se incrementó la mortalidad y decir que, al igual que en los ensayos de IM agudo, no sólo valoraron la mejoría de la FE o la reducción de los volúmenes ventriculares, variables comunes en la mayoría de los estudios que utilizan este tipo de tratamiento independientemente de la etiología de la enfermedad, sino que también se cuantificaba la disminución de los episodios de angina, y sólo los tratados con células lo consiguieron en varios ensayos<sup>156-158</sup>. En algunos estudios se valoró

además la clase funcional según la clasificación de la NYHA y de manera genérica, era mejor en los que recibieron la terapia<sup>135,143,159,160</sup>. Hay que resaltar que no todos los estudios mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a mejoría de la FE entre el grupo tratado y el grupo control<sup>141,160</sup>.

#### **1.4.3.- Células madre en la miocardiopatía dilatada idiopática**

En la **Tabla 3** se muestra un resumen con los principales trabajos publicados sobre terapia celular en MD no isquémica. En 2006 se aprobó el uso experimental de células madre en MD no isquémica<sup>185</sup>, y desde entonces se comenzaron a realizar varios ensayos clínicos que nos han mostrado, al igual que en el caso de la cardiopatía isquémica, incrementos de la FE en más de un 3%, según reflejan varios metanálisis<sup>62,186</sup>. Son pocas las revisiones sistemáticas publicadas en la literatura que recojan información concisa sobre este tema<sup>187,188</sup>, las cuales muestran resultados globales buenos en cuanto a mejoría de la FE ventricular izquierda, de la calidad de vida, de los parámetros funcionales como el test de los 6 minutos marcha, la necesidad de trasplante cardíaco en el seguimiento o incluso la reducción de la mortalidad (algo cuestionable). Podemos destacar de todos ellos el artículo publicado por Seth en 2006<sup>161</sup>, al ser el primer estudio piloto que muestra la seguridad y eficacia de la terapia celular en MD idiopática. Por otro lado tenemos que mencionar el trabajo de Vrtovec en 2013<sup>182</sup>, que incluyó a 55 sujetos a los que se les infundió células madre, con un seguimiento de 5 años aproximadamente y un grupo control compuesto por otros 55 sujetos. La terapia administrada estaba compuesta sólo por células del tipo CD34+ movilizadas y estimuladas con G-CSF a sangre periférica; lograron unos resultados aceptables, partiendo de una media de FE del 24% y alcanzaron un valor medio de FE del 30% (ganancia neta del 6%). En esos 5 años este autor nos muestra también los eventos adversos de toda la serie; 27 pacientes murieron (25%), 13 por IC y 14 por muerte súbita de origen cardíaco. El grupo control presentó mayor mortalidad a largo plazo (35%) en relación al grupo de células madre (14%); 9 pacientes (8%) precisaron ser trasplantados.

**Tabla 3.** Terapia celular en MD idiopática

Autor	Nº pacientes	CMN infundidas (x10 <sup>6</sup> )	CD34+ infundidas (x10 <sup>6</sup> )	Vía	FE basal (%)	Ganancia FE	Método medida
Seth <sup>161</sup> (2006)	24 células 20 controles	0.28±0.16	1.6	i.c.*	20±7	5% (12 meses)	ECO
Argüero <sup>162</sup> (2006)	3 células No controlado	--	--	i.m.**	38±14	9% (6 meses)	--
Wang <sup>163</sup> (2006)	12 células 12 controles	0.18	--	i.c.	30±9	1% (3 y 6 meses) (ns)	ECO
Huang <sup>164</sup> (2006)	10 células 8 controles	5.76	--	i.c.	30±13	1% (3 y 6 meses) (ns)	RMN
Kirillov <sup>165</sup> (2007)	16 células No controlado	--	--	i.c.	--	2% (6 meses) (ns)	--
Schannwell <sup>166</sup> (2008)	10 células 10 controles	--	--	i.c.	--	9% (3 meses)	--
Kalil <sup>167</sup> (2008)	9 células No controlado	0.96±0.26	1.5±0.7	i.m.	21±16	-0.5% (12 meses)	ECO
Chen <sup>168</sup> (2008)	71 células 187 controles	2.05	--	i.c.	32±9	1% (24 meses) (ns)	ECO
Fischer-Rasokat <sup>169</sup> (2009)	33 células No controlado	2.59±1.35	--	i.c.	30±4	3% (12 meses)	ANGIO
Arom <sup>170</sup> (2009)	35 células 17 controles	0.34±0.36	--	i.m.	24±6	4% (6 meses)	ECO RMN
Sant'Anna <sup>171</sup> (2010)	15 células	0.96±0.26	1.5±0.7	i.m.	19±12	9% (3 meses)	RMN
Martino <sup>172</sup> (2010)	24 células No controlado	1.77±1.25	1.3±0.7	i.c.	24±5	-- (6 meses) (ns)	ECO RMN
Bocchi <sup>173</sup> (2010)	23 células+GCSF 17 controles	--	--	i.c.	22±4	9% (15 meses)	ECO
Benetti <sup>174</sup> (2010)	10 células No controlado	--	--	i.m.	274	8% (40 meses)	ECO
Seth <sup>175</sup> (2010)	44 células 41 controles	1.68±0.96	2.7±1.5	i.c.	22±8	6% (36 meses)	ECO
Fatkutdinov <sup>176</sup> (2010)	6 células 8 controles	--	--	i.c.	--	-- (8 meses) (ns)	--
Ruengsakulrach <sup>177</sup> (2011)	52 células No controlado	--	--	i.m.	--	4% (13 meses)	--
Vrtovec <sup>178</sup> (2011)	28 células 27 controles	1.23±0.23	123±23	i.c.	25±7	5% (12 meses)	ECO
Xiao <sup>179</sup> (2012)	33 células 20 controles	5.0	--	i.c.	34±4	7% (1 mes)	SPECT

Autor	Nº pacientes	CMN infundidas (x10 <sup>8</sup> )	CD34+ infundidas (x10 <sup>6</sup> )	Vía	FE basal (%)	Ganancia FE	Método medida
Suárez de Lezo <sup>180</sup> (2013)	27 células No controlado	10.2±2.9	40.4±23.6	i.c.	28±9	<b>9%</b> (6 meses)	ANGIO
Vrtovec <sup>181</sup> (2013)	20 células 20 células	1.03±0.27 1.05±0.31	103±27 105±31	i.c. i.m.	27±5 25±5	<b>4%</b> (6 meses) <b>8%</b> (6 meses)	ECO
Vrtovec <sup>182</sup> (2013)	55 células 55 controles	1.13±0.26	113±26	i.c.	24±6	<b>6%</b> (60 meses)	ECO
Westphal <sup>183</sup> (2014)	24 células No controlado	4.54±0.89	--	i.c.	27±5	<b>9%</b> (3 meses) <b>10%</b> (6 meses) <b>14%</b> (12 meses)	ECO
Lezaic <sup>184</sup> (2015)	21 células No controlado	0.001-0.005	--	i.c.	25±7	<b>4%</b> (6 meses)	ECO

ns: no estadísticamente significativo; i.c.: administración de la terapia vía intracoronaria; i.m.: administración de la terapia vía intramiocárdica

#### 1.4.4.- Células madre en la edad pediátrica

La terapia regenerativa con células madre también se ha planteado como parte del arsenal terapéutico en niños con IC de diversa índole<sup>189</sup>. La principal causa de IC en la infancia es la MD idiopática, seguida de la hipertrófica. Concretamente en la edad pediátrica tiene una incidencia comprendida entre el 0.5 y el 1.2 por cada 100000 niños, siendo más frecuente en lactantes<sup>190</sup>. A esta edad presentan peor pronóstico aún a pesar de los avances médicos de los últimos años<sup>191-193</sup>. Hay datos que nos hablan que hasta un 40% no responden al tratamiento médico convencional<sup>194</sup> y muchos de ellos fallecen o precisan un trasplante cardíaco dentro del primer año en el que se realiza el diagnóstico; algunas series incluso nos hablan de una mortalidad del 13.6% y un porcentaje de trasplante de hasta el 12.7% dentro de los 2 primeros años desde el diagnóstico o incluso cifras más desalentadoras con una incidencia de muerte o retrasplante al año del 69% y del 46% a los 10 años<sup>193,195</sup>. Con todo esto y con las limitaciones conocidas del trasplante cardíaco, se comenzó a usar asistencias ventriculares como el *EXCOR Berlin Heart* como soporte para mantener vivo al paciente hasta el trasplante<sup>196-199</sup>, con resultados dispares. Todo ello ha hecho que se

comenzara a utilizar en estos casos también los progenitores hematopoyéticos con resultados alentadores lo que podría ofrecer un mayor tiempo de espera en lista de trasplante cardíaco e incluso hacer innecesario el mismo. Su empleo en niños comienza en 2009, con buenos resultados, como refleja el trabajo de Olgunturk<sup>200</sup> o el de Rupp<sup>201</sup> ese mismo año y en otro estudio de 2010<sup>202</sup>; describen una mejoría significativa de la FE en niños con MD tras la administración de CD34+ vía intracoronaria. Rivas<sup>189</sup> demostró como en 2 lactantes, en mala situación clínica (NYHA IV) que precisaron inicialmente tratamiento con ventilación mecánica invasiva e inotropos, a los cuales se les infundió, tras movilización con G-CSF, células progenitoras mononucleadas autólogas por vía intracoronaria, se consiguió una mejoría clínica y ecocardiográfica (con una reducción de los volúmenes ventriculares y mejoría de la FE desde un 30% a un 40% en uno de ellos y desde un 22% hasta un 60% en el otro), a las pocas semanas de la infusión. Otros autores que emplearon células CD34+ movilizadas a sangre periférica tras administrar el factor G-CSF en niños con grupo control<sup>203</sup> han conseguido ganancias de la FE de hasta el 15% de media<sup>204</sup>. Su uso ha resultado satisfactorio también en algunos casos seleccionados con cardiopatías congénitas<sup>205</sup> como demostró nuestro grupo en un caso de un niño con origen anómalo de la arteria coronaria izquierda, que procedía de la arteria pulmonar que acusaba disfunción ventricular y clínica de IC, y tras el tratamiento de la misma percutáneamente asociado a la infusión intracoronaria de células madre mononucleadas, mejoró 14 meses después. Nuestro grupo también ha utilizado este tipo de terapia en niños en otros contextos clínicos, concretamente en un caso de un niño con síndrome de Kawasaki complicado con infarto agudo de miocardio y disfunción ventricular izquierda severa y en una niña con MD idiopática ya con tratamiento médico óptimo que mantenía disfunción ventricular severa, ambos tratados con una infusión vía intracoronaria de células mononucleares autólogas de MO, tras lo cual lograron normalizar la FE pocos meses después.

## 1.5 Terapia celular

### 1.5.1.- Tipos de terapia celular

Desde hace casi dos décadas comenzó a emplearse la terapia regenerativa como tratamiento coadyuvante en el IM agudo<sup>64,65,70,74,206-208,153</sup>. Posteriormente se pensó en la posibilidad de restaurar los cardiomiocitos a partir de células autólogas de MO para mejorar la IC de origen no isquémico y que pudiera suponer el tratamiento idóneo de una enfermedad que a día de hoy no lo tiene. A vista de los resultados iniciales, está considerada una terapia prometedora y segura<sup>62,153,207,209</sup> también en MD no isquémica<sup>169-171,175,178,210</sup> y aunque la experiencia en humanos en estos casos es más limitada que en cardiopatía isquémica, en las recomendaciones de la “Task Force of the European Society of Cardiology” de 2006 en relación con uso de células madre autólogas en cardiopatías en la práctica clínica, se incluye su uso en estos casos como una de las prioridades actuales en investigación en terapia regenerativa<sup>185</sup>.

Se han utilizado diversos tipos celulares en modelos animales con aceptables resultados demostrando su beneficio funcional, aunque no todos los tipos de progenitores presentan la misma aplicabilidad en humanos, por ejemplo, el uso de células embrionarias sigue suponiendo un tema controvertido desde el punto de vista ético además de la hipótesis sobre la posible formación de tumores o los casos en los que se ha utilizado cardiomiocitos ya diferenciados, con los problemas de inmunidad que podrían suponer o algunos casos de arritmias fatales documentados con el uso de mioblastos esqueléticos<sup>211</sup>. Algunos autores comenzaron a cuestionar la teoría hasta entonces extendida sobre la ausencia de reproducibilidad de los miocitos<sup>212</sup> comprobando la posibilidad de regeneración del miocardio tras un IM agudo a partir de sus propias células residentes, no obstante se han estudiado diversos tipos celulares. Fundamentalmente disponemos de células de MO del tipo hematopoyéticas, mesenquimales (éstas últimas existen también en otros tejidos pero se emplean más las de MO)<sup>213-214</sup> y endoteliales que son las que más han demostrado que puedan diferenciarse a cardiomiocitos<sup>215-217</sup>. Además de las de la MO estarían los mioblastos esqueléticos, células residentes cardíacas, las derivadas del tejido adiposo, del cordón



umbilical y otras de origen embrionario<sup>218</sup>. De todas ellas<sup>64,219</sup> las más empleadas y por tanto de las que disponemos más información en cuanto a seguridad y eficacia son las mononucleadas extraídas directamente de MO<sup>63-66,81-82,133-135,141,144-145,161,167-169,175,180</sup>, o tras su movilización a sangre periférica<sup>85,128,181-182</sup>. Las células madre hematopoyéticas de MO las podemos catalogar como tales porque expresan unos marcadores concretos, como el CD34+ o el CD133+, entre otros. La ventaja del uso de células madre hematopoyéticas de MO es que se trata de una fuente renovable, autóloga y accesible, y por ser las que han demostrado mayor capacidad para diferenciarse a células miocárdicas y por presentar mayor capacidad angiogénica<sup>206,217,220-222</sup>. Los progenitores endoteliales de MO también pueden expresar el marcador CD34+ o el CD133+, pero además también co-expresan el VEGF (factor de crecimiento endotelial) y el receptor-2.

Se ha comprobado que las células madre multipotenciales que existen en los distintos órganos como las de MO, al igual que ocurre con las células madre hepáticas, gastrointestinales o del sistema nervioso entre otros, son capaces de diferenciarse hacia tejidos funcionales y, a pesar de estar en controversia, algunas de estas células adultas tienen potencialidad para diferenciarse hacia la mayoría de tejidos del organismo adulto<sup>223-227</sup>. Según algunos autores, las células madre cardíacas podrían tener poco impacto en los pacientes con IM agudo, el contexto más estudiado<sup>228</sup>. El uso directo de miocardiocitos es infrecuente<sup>120-148</sup>. El grupo de Menasché en junio del año 2000 fue pionero en el uso de mioblastos esqueléticos autólogos en un paciente que había sufrido un IM<sup>229</sup> y otros les han seguido posteriormente<sup>230</sup>; aunque es difícil de comprobar su eficacia real pues en la mayoría de los casos se han administrado asociados a terapia de revascularización, sobre todo quirúrgica, sin poder discernir el efecto real de cada procedimiento<sup>213</sup>. También podrían usarse mioblastos extraídos de grasa cardíaca, con el inconveniente de problemas de perforación y la génesis de arritmias, así como la necesidad de cultivo previo<sup>231</sup>.

En la práctica totalidad de los casos se emplean células madre autólogas, y en raras ocasiones las alogénicas, con el inconveniente de inmunidad que pueden conllevar. En un trabajo publicado en 2006 por Wang<sup>163</sup> se utilizaron células de MO autólogas frente a

alogénicas en sujetos con MD idiopática, y en otro estudio posterior de Kirillov en 2007<sup>165</sup> se emplearon mioblastos esqueléticos alogénicos también en este tipo de pacientes. En esta línea entrarían las células embrionarias totipotentes del cordón umbilical, que está considerado como uno de los mayores reservorios de células progenitoras y además de ser usado como tratamiento de diversas enfermedades hematológicas, también se ha ampliado el espectro y se usa en enfermedades degenerativas o inmunológicas, con ventajas como las de poder ser criopreservadas y el hecho de no transmitir enfermedades virales o mutaciones somáticas que sí pudieran ocurrir con células adultas<sup>232-235</sup>, además de poder diferenciarse teóricamente hacia prácticamente cualquiera de los tejidos que existen en el organismo, pero, debido a que deben ser extraídas de embriones nacidos muertos o creados únicamente para ese fin - con los problemas éticos que ello supone-, su potencial inmunogénico y arritmogénico, la posibilidad de generar tumores in vivo, además de presentar diferenciaciones no tan controladas como las de las mononucleares autólogas de MO, hace que no se usen habitualmente<sup>236</sup>.

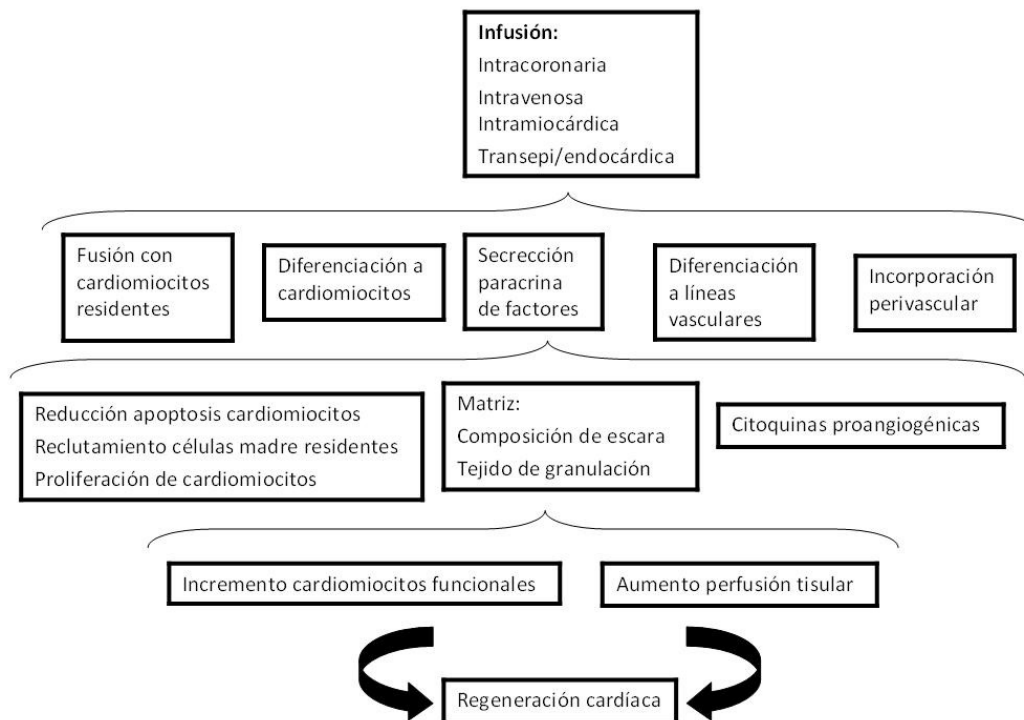
También se han publicado algunos estudios que hablan de la posibilidad de administrar factor G-CSF que promueva la liberación de progenitores desde su origen hasta el miocardio para sustituir zonas necrosadas. Los resultados traducidos en mejoría de FE en el seguimiento de estos enfermos no son muy alentadores. Esto quizás sea debido a pérdida de propiedades intrínsecas celulares tras la movilización, las células no se dirigen al destino previsto o provocan otras reacciones inflamatorias que formen tejido cicatricial no contráctil<sup>81,237-239</sup>. Este tema no está exento de controversia y los resultados son dispares, existiendo también opiniones a favor de su uso<sup>128,237,238,240-243</sup>. En la MD idiopática también hay diversas opiniones al respecto. Algunos autores refieren que es más eficaz la infusión de células madre solamente, a pesar que el empleo de citoquinas podría suponer una alternativa menos invasiva<sup>244</sup>; lo cierto es que se precisan más estudios en ese campo.

### 1.5.2.- Mecanismos de acción

El modo por el que actúan las células madre a nivel cardíaco sigue estando en controversia. Se han postulado varios mecanismos biológicos para intentar explicar los efectos de la infusión de células de MO sobre la función miocárdica que va desde la transdiferenciación en miocitos cardíacos, a la activación de células troncales cardíacas residentes por citoquinas derivadas de las células de MO<sup>206</sup>, la proliferación de miocitos viables residuales por efecto paracrino a partir de las células de MO<sup>245</sup> o la fusión entre las células medulares y los miocitos supervivientes<sup>246-248</sup>. Se ha postulado que un conjunto de células no-hematopoyéticas en la MO con fenotipo CXCR4<sup>+</sup> / lin<sup>-</sup> / CD45<sup>-</sup> que expresan marcadores precoces de célula cardíaca (Nkx2.5/Csx, GATA-4 y MEF2C) y que parecen poseer, por tanto, un compromiso de línea hacia la diferenciación miocárdica, las llamadas células de origen mesenquimal, han despertado recientemente un extraordinario interés al haberse podido comprobar su capacidad de diferenciarse hacia diversos tejidos, incluido hacia células miocárdicas. Igualmente se ha comprobado tanto in vitro como in vivo esa misma capacidad de diferenciación con las hematopoyéticas de MO o las endoteliales circulantes<sup>249-250</sup>. Por otro lado, el efecto beneficioso para algunos tipos celulares sería su potencial efecto angiogénico<sup>72,133,134,147,251-254</sup>. Es decir, el efecto beneficioso mostrado sería debido tanto por la aportación de células miocárdicas útiles como de diversas líneas vasculares<sup>220,255-259</sup>. También se ha demostrado cómo en el IM agudo<sup>120,207</sup> las células madre cardíacas residentes (Kit<sup>+</sup>) infundidas en el lugar del infarto pierden su fenotipo hematopoyético y adquieren cualidades de las líneas cardiogénicas y endoteliales, dando lugar a cardiomiocitos y estructuras vasculares. Hay quienes formulan que se podrían inducir modificaciones genéticas que pudieran mejorar la capacidad regenerativa de las células madre infundidas, una apuesta que pudiera tener aplicación en un futuro próximo.

Los pacientes con MD no isquémica se ha demostrado que presentan una reducción del flujo coronario y de la función microvascular<sup>261-262</sup>. Dicha disfunción puede estar implicada en la patogénesis y el pronóstico de la enfermedad. En este contexto algunos trabajos muestran mejoría tras la administración intracoronaria de células madre de MO

pues ello se asocia a una mejoría en la función de la microvasculatura del miocardio<sup>169</sup>. En realidad, hoy en día se desconocen los mecanismos exactos de actuación de las células madre a nivel cardíaco. Un resumen de los posibles mecanismos por los que podrían actuar quedan reflejados en la **Figura 1**.



**Figura 1.** Resumen de los mecanismos teóricos de actuación de las “stem cells”

### 1.5.3.- Vías de administración

Se han empleado diversas vías para administrar células madre con el fin de conseguir su anidamiento en el tejido miocárdico. En la **Figura 2** se muestra de forma ilustrativa la forma en la que las células madre alcanzan el miocardio por diferentes vías:

- La **vía intramiocárdica**. Tiene la ventaja de la escasa exposición sistémica de las células administradas o la posibilidad de ser inyectadas en la zona del miocardio de

interés, incluso en territorios donde la arteria esté ocluída. Como inconvenientes estarían el riesgo de una diferenciación no deseada cuando se administra sobre una zona de escara o la génesis de arritmias. A pesar de que las inyecciones intramiocárdicas se realicen en zonas concretas del ventrículo, las mejorías funcionales parecen ser globales<sup>171</sup>.

- La **vía transepicárdica**, durante o después de realizar cirugía de revascularización coronaria, y en el caso sobre todo del IM crónico<sup>127,130,133,139,142,146,150,263,264</sup>. Presenta las ventajas de la vía intramiocárdica con una técnica más sencilla, pero con el inconveniente de la necesidad de realizar una toracotomía.

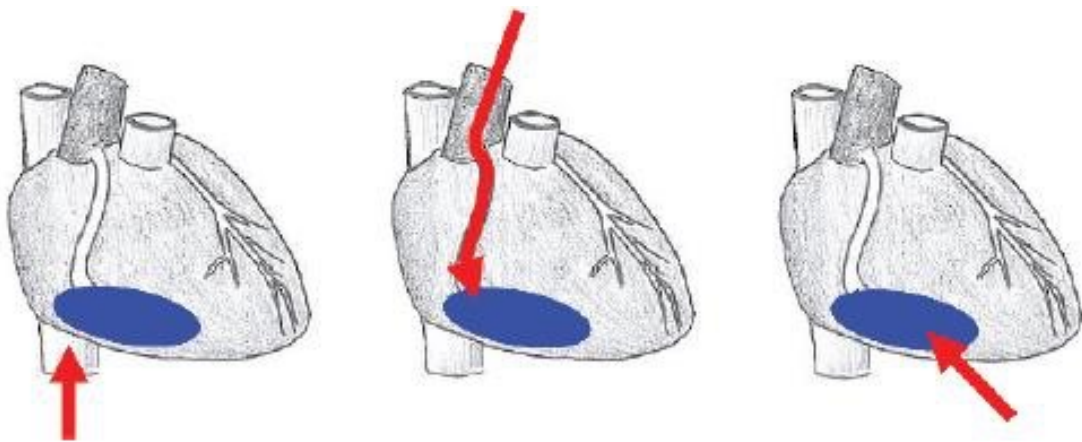
- La **vía transendocárdica**. Aunque es más compleja y con riesgo de perforación, y aunque también es aplicable a cualquier escenario clínico, ha sido más empleada en casos de IC isquémica crónica<sup>135,136,141,143,147,156,158,265</sup>. Son pocos los grupos de trabajo que la han utilizado en MD idiopática<sup>162,167,170-171,174,177,266</sup>.

- La **vía intracoronaria** es la más usada tanto en cardiopatía isquémica, aguda o crónica, como en MD idiopática. Es una técnica relativamente simple, con escasa exposición sistémica de las células, las cuales quedan directamente en el territorio coronario y son arrastradas a través de las arterias coronarias infundidas hacia territorios del miocardio con suministro de oxígeno preservado. Como inconvenientes tendríamos que el anidamiento o “homing” de las células depende de la liberación de las señales quimiotácticas adecuadas, la incapacidad de llegar a zonas donde la arteria esté ocluída, el riesgo de microinfartos o la posibilidad de dañar el endotelio vascular en los casos que se infunda con inflado de balón<sup>213</sup>. Trabajos como el de Vrtovec en 2013<sup>181</sup> compara la vía intracoronaria y la intramiocárdica en MD no isquémica, resultando superior la segunda en cuanto a mejorías de la FE.

- La **vía intravenosa**<sup>94</sup> es la menos usada; es simple, no invasiva, no hay inconveniente en usar dosis repetidas. Como desventajas estaría la mayor pérdida sistémica del producto con un menor porcentaje de células que lleguen realmente a entrar en la circulación coronaria con lo que para asegurarlo se necesitarían grandes cantidades de células, además que su mayor o menor anidamiento dependería también de las señales

producidas en el miocardio. Como principal efecto indeseable estaría la producción de microembolias.

Al igual que existe disparidad de opiniones en cuanto a tipos y número de células infundidas, también las hay sobre la vía empleada para su administración, aunque la opción más eficaz y segura parece ser la infusión intracoronaria de células madre mononucleares de MO autóloga, con mayor anidamiento de las células administradas y con mayor contribución a la cardiogénesis y vasculogénesis miocárdica<sup>206,217,220-222</sup>.



**Figura 2.** Esquema comparativo de 3 vías principales de administración de la terapia regenerativa: intravenosa, intracoronaria e intramiocárdica.

### 1.6. Resultados globales

En la IC es fundamental combatir el tejido fibroso no contráctil en el que se convierte el área infartada tras un evento coronario agudo y que hace desembocar en la MD isquémica<sup>267,268</sup> o intentar revertir el remodelado negativo que también se produce en la MD idiopática. La disfunción microvascular ha sido reconocida como factor de riesgo independiente de muerte y de progresión de la IC<sup>269</sup> y una FE deprimida a la vez que un volumen telesistólico elevado se comportan como predictores de mortalidad<sup>149,270-271</sup> además, la FE es el único factor de riesgo asociado a muerte súbita tras un IM

agudo<sup>272-273</sup>. También se ha asociado la presencia de una pobre respuesta vasodilatadora con la probabilidad de pasar de una IC con FE conservada a disfunción ventricular izquierda<sup>274</sup>. Así pues, el efecto beneficioso más estudiado por ser el más importante que se puede conseguir con la terapia celular sería la **mejoría de la FE**, parámetro fundamental en los 3 contextos clínicos (**Tablas 1, 2 y 3** del infarto agudo, crónico y MD idiopática donde se muestran los valores obtenidos en los principales ensayos clínicos). De manera genérica, según nos muestran diferentes revisiones, la mejoría global en IM agudo y crónico de la FE oscila entre el 3% y el 5%<sup>58,62,123,153,207,209,275-277</sup>. Algunos autores<sup>153,207</sup> postulan incluso que puede ser necesario dosis repetidas en el tiempo para conseguir el efecto deseado o para mantener su efecto beneficioso a largo plazo como parte del tratamiento de la IC. En los ensayos en los que además se ha administrado G-CSF como se explicó antes, los resultados han sido variables, desde la ausencia de significación estadística en cuanto al incremento de FE<sup>99,116</sup> hasta llegar incluso a obtener peores resultados en los pacientes a los cuales se les administró dicho factor con menor ganancia de FE incluso que los controles<sup>81</sup>. No se ha empleado apenas en casos de infarto crónico por lo que hay poco con lo que poder obtener conclusiones, y algún trabajo en MD idiopática se ha publicado con mejorías de la FE de hasta un 9% asociando células madre al factor<sup>173</sup>; son por tanto resultados bastantes dispares y extraídos de series pequeñas por lo que las conclusiones habrán que ser tomadas con cautela.

Otros estudios realizados con pacientes isquémicos han mostrado **reducción del tamaño del infarto**<sup>62,153,207,209</sup>. Varios trabajos concluyen que las células madre pueden contribuir a una reducción del número de **reinfartos** o la necesidad de nueva revascularización<sup>74,271</sup>. Un efecto beneficioso común obtenido en muchos ensayos es la **reducción de los volúmenes ventriculares** (asociado o no a mejorías significativas de la FE)<sup>62,67,153,209,267-268</sup> fundamentalmente suele producirse una disminución del VTS<sup>66,96,207</sup> algo importante en IC donde en pacientes isquémicos, normalmente tras un IM los volúmenes ventriculares al año pueden llegar a incrementarse más de un 20%, tanto el VTS como el VTD<sup>67</sup>; este beneficio también se ha observado en MD no isquémica, fundamentalmente con la reducción del VTS<sup>161,183</sup>. Otros efectos

encontrados han sido la **mejoría de síntomas**, como queda reflejado con la reducción de episodios anginosos<sup>135,156,265,276</sup> junto con mejoría en la **capacidad de ejercicio** y de la **clase funcional** según la clasificación de la NYHA<sup>98,113,135,139,142-143,146,156,158,265,276</sup>, con similares resultados en series de MD idiopática<sup>161,167,170,172-178,181</sup>. En ese mismo camino estaría la mejoría en otras pruebas funcionales como el aumento del consumo de oxígeno<sup>173</sup> o del test de los 6 minutos marcha<sup>184,168</sup>, cambios encontrados tanto en pacientes isquémicos como no isquémicos.

Otro efecto comentado en algunos ensayos clínicos realizados con pacientes isquémicos sería la reducción de la **mortalidad**. En esta línea incluiríamos el estudio más grande realizado, el STAR, publicado por Strauer y colaboradores en 2010<sup>144</sup> que muestra los efectos a largo plazo de la infusión de células madre vía intracoronaria en 191 pacientes con IC tras 5 años de seguimiento y, aunque no obtuvo mejorías significativas en los diversos parámetros hemodinámicos analizados (incluidos la FE o el índice cardíaco) ni en la capacidad de ejercicio o el consumo de oxígeno; lo que se obtuvo fue una significativa disminución de la mortalidad a largo plazo de los pacientes tratados en relación al grupo control. En MD no isquémica, también han sido reportadas cifras inferiores de mortalidad tras la administración de la terapia en relación al grupo control, tanto a corto<sup>178</sup> como a largo plazo<sup>182</sup>. Pero no podemos hacer firmes conclusiones al respecto con el resultado de unos pocos ensayos clínicos<sup>74,188,271</sup>.

Un tema poco tratado y que apenas unos cuantos trabajos han valorado sería el estado de la función vascular mediante la medida invasiva de la **reserva coronaria** tras la administración de células madre. Nuestro grupo no obtuvo cambios significativos en la misma si comparamos el momento de la infusión y la reevaluación pocos meses después<sup>281,180,238</sup>; algunos autores sí han encontrado mejoría en este parámetro tras la administración de progenitores<sup>65,76</sup>. También nuestro grupo ha intentado correlacionar la regeneración miocárdica y la recuperabilidad de la función vascular con la terapia regenerativa, sin obtener resultados estadísticamente significativos al respecto.



### 1.7 Efectos indeseables asociados a la terapia celular

Casi todos los autores coinciden que la terapia regenerativa es en general, segura y factible. Aunque sí se ha descrito en algún caso episodios de taquicardia ventricular con el uso sobre todo de mioblastos<sup>277</sup>, la mayoría de los ensayos han comprobado la ausencia de los *efectos proarrítmicos* tras la administración de células madre de diversa índole en IC isquémica<sup>278,65,67,70,145,153,161,180,271,278-279</sup> e idiopática, sin encontrar diferencias con lo que hubiera ocurrido por la historia natural de la enfermedad<sup>170,178,180,183</sup>. Un punto de discusión en la terapia con células madre en el caso de la cardiopatía isquémica revascularizada sería si tras la infusión de células se pudiera producir un incremento de la *reestenosis del stent*<sup>68</sup> pudiendo deberse a que las células movilizadas se anidaran en forma de células musculares lisas en la zona revascularizada y cubierta por el stent, un efecto que pocos autores han documentado<sup>72</sup> en cuyo caso probablemente estuviera asociado con el uso de células CD133+ que parecen ser más proclives a tal evento. En la experiencia de nuestro grupo no ha ocurrido<sup>81,238</sup> ni siquiera a pesar de haber empleado el factor G-SCF en algunos pacientes, con la teoría que éste pudiera favorecer la restenosis, quizás debido a que en nuestros pacientes se administraba a partir del 5º día tras el IM y se tardaba 5 días más en movilizar células madre junto con el efecto “protector” del uso de stents cubiertos con rapamicina<sup>237</sup>. Múltiples autores también han desestimado tal efecto indeseable<sup>70,76,78,86-87,103,153</sup>. No se ha documentado aumento de la incidencia de *neoplasias* en los pacientes tratados con las células madre habituales<sup>271</sup>. Por último decir que, la causa por la cual un pequeño porcentaje de enfermos sufre un *empeoramiento de la clase funcional* tras la terapia celular no se conoce y los casos en los que ocurre pudiera deberse al propio daño por reperfusión o a microinfartos celulares<sup>280</sup>, o simplemente a una falta de respuesta a la misma y lo que realmente se objetiva es un deterioro como parte de la evolución natural de la enfermedad.

Para concluir esta larga introducción a nuestro trabajo<sup>281</sup> decir que el tratamiento con células madre es una terapia prometedora, factible, viable y segura desde que se empezara a utilizar en cardiopatía isquémica. A pesar del desconocimiento sobre su

mecanismo exacto de actuación, su inmediata aplicabilidad y los buenos resultados clínicos conseguidos hasta el momento hacen de ella una terapia prometedora en el tratamiento de pacientes con IC no isquémica.

## **2. Hipótesis y objetivos**

## **Hipótesis**

Hoy en día existen en la literatura pocos datos sobre el resultado a largo plazo de la terapia regenerativa con infusión intracoronaria de células progenitoras de MO en pacientes con MD de causa no isquémica. Así mismo, se desconocen los factores predictores de buena respuesta tardía al tratamiento.

## **Objetivos**

El *objetivo principal* será evaluar la respuesta clínica y la aparición de eventos adversos en el seguimiento a largo plazo (mortalidad, necesidad de TRC, necesidad de trasplante cardíaco o ingreso hospitalario por IC) de los 27 pacientes enrolados en nuestro ensayo clínico con MD no isquémica tratados mediante infusión intracoronaria de progenitores hematopoyéticos de MO (código EudraCT: 2007-003088-36; Clinical-Trials.gov: NCT00629096).

Los *objetivos secundarios* serán: 1) Valorar los cambios en la función ventricular izquierda mediante angiografía a los 6 meses de la inyección intracoronaria de células progenitoras de MO autóloga obtenidas mediante centrifugación en gradiente de densidad en pacientes con MD de origen idiopático; 2) Determinar los cambios de la función ventricular izquierda mediante ecocardiografía a los 3, 6, 12 meses y en los años sucesivos desde la terapia celular; 3) Valorar la mejoría clínica tras el tratamiento mediante el análisis de la evolución del grado funcional según la clasificación de la NYHA, ergoespirometría y determinación de péptido natriurético (BNP), a los 3, 6, 12 meses y en los años sucesivos. 4) Investigar los mecanismos de regeneración miocárdica a corto plazo (6 meses) mediante la correlación entre parámetros clínicos y hemodinámicos de función ventricular y los relacionados con el tipo y la funcionalidad de las células infundidas. 5) Analizar factores determinantes de buen resultado al seguimiento a largo plazo investigando la correlación del resultado clínico y la evolución de la función ventricular mediante ecocardiografía con los diferentes parámetros clínicos, angiohemodinámicos y biológicos del estudio.

En definitiva, con esta tesis pretendemos comprobar la aplicabilidad de la terapia regenerativa con células madre en casos de MD idiopática en nuestro medio así como conocer qué pacientes se beneficiarían más de esta terapia a largo plazo. Todo ello permitiría diseñar nuevos ensayos clínicos que ayuden a conocer mejor los posibles efectos beneficiosos de este tipo de tratamiento en el manejo de la IC.

### **3. Material y Métodos**

### 3.1 Ensayo fase II: diseño inicial

Nuestra serie la componen los pacientes que participaron en el estudio fase II denominado **“Efecto de la Infusión Intracoronaria de Células Progenitoras de Médula Ósea Sobre la Regeneración Miocárdica en Pacientes con Miocardiopatía Dilatada. Estudio Clínico-Biológico”**, (con código EudraCT: 2007-003088-36) que fue registrado en Clinical-Trials.gov (NCT00629096) en el que se incluyeron sujetos con MD idiopática que cumplieran con una serie de requisitos y que mostraron su conformidad con la participación en el mismo. Se trataba por tanto de un ensayo no controlado (en el cual no existían técnicas de enmascaramiento) en el que se pretendía obtener los resultados de eficacia del tratamiento en las que se valoraba la evolución de la función ventricular de los pacientes al seguimiento frente a su propia condición basal, definida como la inmediatamente precedente a la infusión de células progenitoras de la MO.

Entre marzo 2008 y diciembre 2010 se procedió a la inclusión de los sujetos seleccionados y se les realizó una infusión intracoronaria del medicamento de terapia celular propósito del ensayo que consiste en una suspensión de células mononucleadas de la MO autóloga que se obtienen mediante centrifugación en gradiente de densidad, sin adición de ningún producto que afecte su funcionalidad biológica. El número total de enfermos incluidos y que completaron el seguimiento de los 12 meses previsto fue de 27, aunque en el diseño del ensayo se había calculado inicialmente un tamaño muestral de 30 enfermos.

Los pacientes recibieron de forma concomitante el tratamiento farmacológico establecido por la buena práctica clínica, por lo que se presuponía mejoría debida al tratamiento farmacológico o no farmacológico de demostrada eficacia según se ha comentado previamente en el apartado sobre la terapia de referencia. Sin embargo, se trata de pacientes con MD establecida en los que es difícil encontrar nueva mejoría de la función ventricular que no se hubiera conseguido ya con los tratamientos habituales si éstos estaban efectivamente ya optimizados. En cualquier caso, todos los pacientes fueron tratados médicamente de forma similar con IECAS o ARA II, beta-bloqueantes,

antialdosterónicos y diuréticos como indican las guías de IC<sup>282</sup>. Por tanto se consideró para este estudio prescindir de grupo control, ya que los resultados de mejoría de la función ventricular se compararían con el basal del propio paciente, asumiendo que el grupo control tendría una ganancia de función igual a 0.

### **3.2 Selección de los sujetos del ensayo**

Se incluyeron pacientes de ambos sexos con edades comprendidas entre 18 y 80 años diagnosticados de MD idiopática en el Servicio de Cardiología del Hospital Reina Sofía de Córdoba, y tratados de forma óptima según lo anteriormente expuesto durante al menos 6 meses, que cumplieran una serie de criterios de inclusión y no presentaran ninguno de los criterios de exclusión incluidos en el protocolo del ensayo, y que a su vez aceptaron participar de forma voluntaria en el mismo con la firma del consentimiento informado correspondiente proporcionado por el médico responsable en cuestión.

#### **Criterios de Inclusión**

- 1.- Pacientes diagnosticados de MD establecida, con síntomas y/o signos de IC, de etiología idiopática, diagnosticada mediante una valoración clínica además de pruebas no invasivas y un estudio hemodinámico que valorase volúmenes ventriculares, FE y la ausencia de lesiones coronarias significativas.
- 2.- Presentar una FE ventricular izquierda menor del 50% y alteraciones de la distensibilidad.

#### **Criterios de Exclusión**

- 1- MD de origen tóxico, o presentar alguna enfermedad por depósito o cardiopatía isquémica.
- 2- Antecedente reciente de miocarditis (con el fin de descartar pacientes con una posible evolución favorable de forma espontánea).



- 3- Pacientes que fueran susceptibles de tratamiento con TRC.
- 4- Pacientes en lista de espera activa de trasplante cardíaco.
- 5 - Pacientes mayores de 80 años o menores de 18 años.
- 6 - Coexistencia de otras enfermedades sistémicas graves.
- 7- Coexistencia de cualquier tipo de enfermedad hematológica.
- 8- Mujeres embarazadas, en periodo de lactancia, o en edad fértil que no estuvieran utilizando un método anticonceptivo eficaz.
- 9- Pacientes que estuvieran participando en ese momento o que hubieran finalizado su participación en un ensayo clínico en un periodo inferior a 3 meses desde la inclusión en el presente estudio.
- 10- Pacientes con tumores malignos o pre-malignos.

Todos los pacientes incluidos presentaban una evolución clínica crónica y estable previa a su participación en el ensayo, y llevaban al menos 6 meses con tratamiento médico óptimo. Las características basales de los pacientes se muestran en la **Tabla 4**.

Al ser incluido en el ensayo, el paciente debía de tener un estudio finalizado con:

- Determinación basal del grado funcional según la clasificación de la NYHA (I-IV).
- Analítica que incluía hemograma, velocidad de sedimentación globular (VSG), estudio de coagulación, péptido natriurético (BNP), bioquímica general (con glucosa, creatinina, urea, iones, proteína C reactiva, determinaciones seriadas de CPK y troponina I, enzimas hepáticas como son la AST, ALT, GGT y FA, LDH, bilirrubina y perfil lipídico con fracciones de HDL-colesterol, LDL-colesterol y triglicéridos).
- Electrocardiograma de 12 derivaciones.
- Monitorización cardíaca con un Holter de 24 horas.

---

- Ecocardiograma realizado por dos ecocardiografistas expertos y basándose en las guías Zoghbi de 2003<sup>283</sup> (realizándoles un estudio completo con el equipo Phillips iE33, Phillips Ultrasound, Phillips Healthcare, Massachussets, Estados Unidos). En todos los casos, se efectuaba un estudio con adquisición digital de imágenes bidimensionales del ventrículo izquierdo (3 ciclos cardíacos en las proyecciones apical 4 cámaras y apical 2 cámaras), así como en la proyección paraesternal, en eje largo y eje corto tanto a nivel basal, medio y apical. Se optimizó el sector de exploración y la profundidad para obtener al menos una frecuencia de 60 imágenes por segundo. Estos dos expertos ecocardiografistas midieron la FE ventricular izquierda y los volúmenes ventriculares mediante el método de Simpson biplanar; se utilizaron ecopotenciadores para conseguir una adecuada visualización del endocardio en casos de mala calidad de imagen basal así como la insuficiencia mitral en los casos en los que la hubiera, siendo cuantificada en grados de I a IV.

- Prueba de esfuerzo con análisis de consumo de oxígeno con el protocolo Naughton según lo establecido en las guías Gibbons de 1997<sup>284</sup>, registrándose el tiempo de ejercicio en minutos y la capacidad de ejercicio mediante la captación de oxígeno máxima medida en ml/kg/minuto expresada en valores absolutos y en porcentajes en relación a los valores normales esperados según edad y superficie corporal (se realizaba la prueba con un sistema Marquette Case 8000, GE Healthcare, Burr Ridge, Illinois, Estados Unidos), también se determinó el intercambio de gases respiratorios durante un esfuerzo máximo mediante un ergoespirómetro (Oxycon Pro/Delta, Viasys Healthcare; Hochberg; Alemania).

- Estudio angiográfico que descartara la presencia de enfermedad coronaria.

Se reclutaron 20 varones y 7 mujeres, con una edad comprendida entre 31 y 74 años (media de  $53 \pm 12$  años). A 3 de ellos se les había implantado desfibrilador en prevención primaria. Todos estaban con tratamiento médico óptimo según se expuso anteriormente; además el 30% de ellos (8) estaban anticoagulados con acenocumarol, el 70% (19) estaban antiagregados con ácido acetilsalicílico, un 44% (12) estaban tratados con digital y un 33% (9) estaban en tratamiento con estatinas por hiperlipemia. A lo largo de

los primeros 12 meses desde la inclusión a 20 de los 27 enfermos no hizo falta realizar reajuste de medicación, a 6 pacientes se les redujo por mejoría y a 1 de ellos se le incrementó por empeoramiento de la IC.

**Tabla 4.** Características basales de los pacientes

Edad (años)	53 ± 12
Mujeres	7 (26)
Clase funcional NYHA III-IV	10 (37)
Péptido natriurético cerebral (pg/ml)	422 ± 522
Diabetes mellitus	7 (26)
Fumadores	13 (48)
Hipertensión arterial	10 (37)
Hiperlipemia	9 (33)
Colesterol total (mg/dl)	174 ± 40
cLDL (mg/dl)	106 ± 26
cHDL (mg/dl)	34 ± 11
Triglicéridos (mg/dl)	155 ± 106
Fracción de eyección (%)	28 ± 9
Insuficiencia mitral no severa	12 (44)

\*cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; NYHA: New York Heart Association  
Los datos se expresan en forma de n (%) o media ± desviación estándar

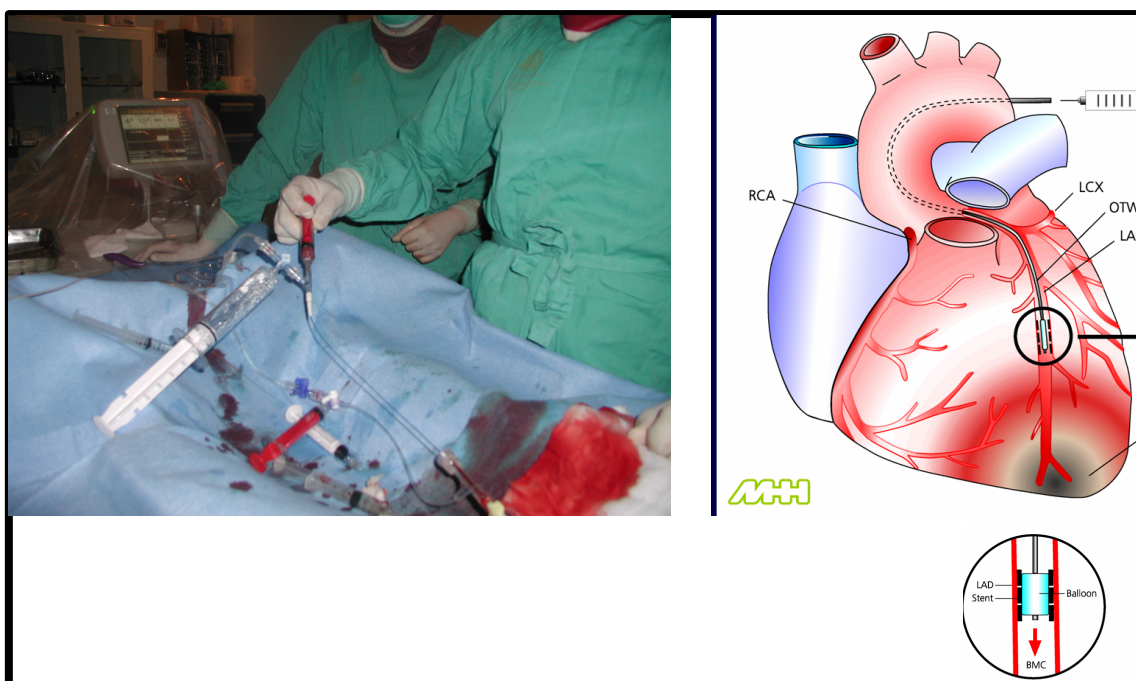
### 3.3 Terapia administrada

Las células mononucleadas de MO autóloga usadas como terapia ya habían sido empleadas con éxito por el equipo investigador anteriormente en pacientes con

disfunción ventricular izquierda secundaria a IM, por lo que la propuesta con este proyecto era valorar su eficacia terapéutica en MD no isquémica y con este fin se valoraron a todos pacientes con sospecha de padecer una MD y se estudiaron de acuerdo con el protocolo estándar para pacientes con MD vigente en el Servicio de Cardiología del Hospital Reina Sofía (en el cual se incluye descartar enfermedad coronaria como origen de la IC). Cuatro horas antes del cateterismo de infusión celular se obtenía la MO autóloga por parte de un hematólogo experto. La MO del paciente se obtuvo mediante aspiraciones repetidas sobre la cresta ilíaca posterior bajo anestesia local, hasta alcanzar un volumen aproximado de 100 ml. La médula obtenida se recolectaba en una bolsa de transferencia conteniendo solución ACD-A como anticoagulante en una proporción de 1:5 del volumen de MO. El procesamiento consistía únicamente en la eliminación de plasma, hematíes y granulocitos, obteniéndose exclusivamente células mononucleares. El procedimiento se realizó mediante una centrifugación en gradiente de densidad sobre Ficoll-Hypaque densidad 1077, en una procesadora de células semiautomática COBE-2991. La suspensión de células mononucleares obtenida se sometió a dos lavados con albúmina humana al 4% en la misma máquina con el fin de eliminar el Ficoll. Tras los dos lavados, las células eran sometidas a una última centrifugación destinada a reducir el volumen de la suspensión celular, y eran finalmente resuspendidas en 10 ml de CINA al 0.9% con 1% de heparina libre de preservativo. Una vez filtradas a través de un filtro de 150 $\mu$ , con el fin de eliminar posibles microagregados eran distribuidas en dos o más jeringas destinadas a la descendente anterior y a la coronaria derecha o circunfleja según cada caso. Se obtenían muestras para recuento celular, viabilidad y control microbiológico de cada uno de los injertos, así como las necesarias para fines investigacionales. La suspensión celular final distribuida en las correspondientes alícuotas se transportaba en condiciones de esterilidad por personal sanitario hasta la Unidad de Hemodinámica para su inmediata administración al paciente mediante cateterismo cardíaco. Toda la manipulación se realizaba bajo estrictas condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar ubicada en el Laboratorio de Terapia Celular que dispone de aire filtrado mediante filtros H E P A .

Todos los pacientes seleccionados de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión y que aceptaron el protocolo y firmaron el consentimiento informado, recibieron el tratamiento propuesto mediante un cateterismo, en el cual además se evaluaron los parámetros hemodinámicos basales. La infusión celular se realizaba en las arterias coronarias en función de la dominancia: descendente anterior, circunfleja o coronaria derecha practicando un procedimiento de “stop-flow”, es decir administrando la suspensión celular en condiciones de flujo coronario estancado. En la **Figura 3** queda ilustrado el procedimiento.

La dosis total de células a administrar no está establecida en la literatura. De acuerdo con la propia experiencia del equipo investigador y los datos publicados en cardiopatía isquémica, la administración de la totalidad de las células mononucleadas obtenidas a partir de 100 ml de MO se encuentra entre  $5$  y  $7 \times 10^8$  células totales. La suspensión celular se administraba en un volumen constante de 10 ml de suero salino al 0.9% de uso farmacéutico habitual, sin ningún otro aditivo.



**Figura 3** . Imágenes de la infusión intracoronaria de las células autólogas de médula ósea asociando la técnica de “stop-flow”

Así, dependiendo de la anatomía coronaria observada, se tomó la decisión de dividir la suspensión celular según la arteria dominante como hemos comentado, por lo que se infundió un total de  $10,2 \pm 2,9 \times 10^8$  células mononucleadas en las arterias coronarias, de la siguiente forma: el 50% de la suspensión de células se infundió en la arteria descendente anterior izquierda y el 50%, en la arteria coronaria derecha de 4 pacientes (15%); el 50% de la suspensión de células se infundió en la arteria descendente anterior izquierda y el 50%, en la arteria circunfleja dominante de 6 pacientes (22%); se infundió el 50% de la suspensión de células en la arteria descendente anterior izquierda, el 25% en la arteria coronaria derecha y el 25% en la arteria circunfleja de 16 pacientes (59%), y se distribuyó a partes iguales (el 33% para cada una) la suspensión de células en las tres arterias coronarias de 1 paciente (4%) que tenía una arteria descendente anterior izquierda pequeña. La infusión selectiva en cada arteria se hizo con un microcatéter, que posteriormente se colocó en un segmento proximal de cada arteria coronaria. Cada infusión intracoronaria duró entre 2 y 4 min, sin condiciones de estancamiento del flujo. Después de la infusión, se trasladó a los pacientes a planta para una monitorización continua durante 24 horas y la realización de determinaciones seriadas de enzimas cardíacas (troponina y CK) cada 6 horas hasta 3 determinaciones.

En cuanto a la terapia administrada concomitantemente a la infusión de células madre, estaba el tratamiento médico convencional de la IC de cada sujeto (ya anteriormente comentado), que incluía IECAS o ARA II (según tolerancia), beta-bloqueantes, antialdosterónicos y diuréticos.

#### **Determinaciones de laboratorio de la terapia administrada:**

Se obtuvieron alícuotas de la suspensión celular infundida a cada uno de los pacientes con los siguientes fines:

1. Cultivo microbiológico.
2. Recuento celular automático para determinación de la celularidad total infundida.

3. Determinación mediante citometría de flujo de la composición celular en cuanto al contenido en progenitores inmaduros, progenitores de línea endotelial, progenitores de línea mesenquimal y expresión de moléculas de adhesión. La expresión de los diversos marcadores de membrana se determinó mediante citometría de flujo con tres colores. Previo al estudio de marcadores por citometría, se determinó la viabilidad celular mediante Ioduro de propidio o mediante 7-AAD. Alternativamente se emplearon para estudios de viabilidad DRAQ5, lo que permitió estudios de ciclo celular sobre células vivas. Para el estudio citofluorométrico, alícuotas de  $1-5 \times 10^5$  de células mononucleares se lavaban con salino tamponado con fosfato (PBS)+0.5% de albúmina sérica +0.2% de azida sódica (PBA). A continuación las células eran marcadas con anticuerpos monoclonales unidos a ficoeritrina-cianina-5 (PE-Cy5) o peridina-clorofil-proteína (Per-CP) frente a CD34 humano, y los siguientes anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína isotiocianato o ficoeritrina: CD146, CD31, CD133, VEGFR2, CXCR4, CD90, CD38, CD117, HLA-DR, CD45, CD105, CD73, CD14 y CD79-alfa. Tras diez minutos de incubación en la oscuridad, las células eran lavadas en PBA y analizadas inmediatamente en un citómetro de flujo FACScalibur con doble láser mediante el Cell-Quest software. Al menos 2000 eventos se analizaron por cada marcador.
  
4. Marcaje fenotípico y diferenciación in vitro de los progenitores endoteliales (EPCs). Para el estudio fenotípico, se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-VEGFR2 y anti-CD144/RECA1 según la técnica que acabamos de exponer. Para la caracterización funcional, inmediatamente después de su extracción, las células se resuspendían en medio EBM-2 con antibióticos y suero fetal de ternera (FCS) al 20%. Las células ( $1 \times 10^6$  células/ml) se depositaban en placas pretratadas con fibronectina y se cultivaban durante dos semanas, con cambio de medio cada 48 horas. Trascorrido este periodo, las EPCs ya habían formado colonias para ser cuantificadas mediante recuento en microscopio invertido.

5. Para el análisis funcional de la capacidad quimiotáctica de las células infundidas, la alícuota correspondiente a las células infundidas a cada paciente se resuspendía en medio libre de suero (SFM) y se equilibraba durante 10 minutos a temperatura ambiente. La cámara inferior de una placa de 24-pocillos Transwell con membrana de Matrigel, diámetro de 6.5 mm y filtro con poros de 5µM cargado con SFM+ 5% albúmina + SDF-1 (factor de crecimiento 1 derivado de estroma) (200ng/ml) o VEGF (factor de crecimiento vascular-endotelial) o con medio solo. Las placas eran incubadas a 37°C, con 95% de humedad y 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas, transcurridas las cuales y tras observación bajo un microscopio invertido, las células eran contadas y recuperadas para análisis citofluorométrico, según la técnica previamente descrita y utilizando los mismos anticuerpos monoclonales.
6. Se determinó la expresión de marcadores de línea cardio-específicos en la totalidad de la población celular infundida, en las células mesenquimales cultivadas a partir de las células infundidas y en las células migradas en la cámara de Matrigel mediante inmunocitoquímica. Para ello las células eran fijadas en 1% de paraformaldehído durante 30 minutos, permeabilizadas con Tritón X-100, e incubadas durante la noche a 4°C con anticuerpos primarios de conejo anti-Gata-4 y anti-Nkx2.5/Csx. Para la detección de estos dos marcadores se empleaban a continuación anticuerpos secundarios marcados con FITC y TRITC. Las células positivas se contaban con un microscopio de fluorescencia, y eran expresadas como porcentaje de la celularidad total infundida al paciente.

### **3.4 Seguimiento inicial de los sujetos**

La terapia celular era administrada en una única dosis al inicio del estudio. Por tanto no era posible que el sujeto dejara de tomar el tratamiento en cuestión, pero sí cabía la posibilidad de abandono del paciente del seguimiento previsto. En este sentido, el paciente se le ofrecía la posibilidad de abandonar el estudio en cualquier momento, por razones médicas o éticas si fuera aconsejable según el buen criterio del investigador,



continuando con la atención médica prevista para todos los pacientes con MD idiopática por parte del Servicio de Cardiología de nuestro hospital. En este caso, no se produjo abandono de ninguno de los sujetos incluidos en el ensayo. Los enfermos fueron evaluados tanto clínica como ecocardiográficamente en la visita basal y luego a los 3, 6 y 12 meses tras la infusión celular, y posteriormente periódicamente cada año o en algunos casos con más frecuencia, todo en función de las descompensaciones cardíacas u otros eventos que sufriera cada enfermo en cuestión. Además, tras la administración de la terapia celular se efectuaba un nuevo estudio Holter de 24 horas antes del alta.

Tras ser dado de alta del hospital, existía en todo momento una conexión telefónica con el paciente y su familia con el equipo investigador para todo tipo de consulta. Se les realizó una primera revisión a los *tres meses* después de la administración del medicamento de terapia celular, con métodos no invasivos de exploración de la función ventricular. La revisión ambulatoria a los 3 meses del tratamiento incluía determinación del grado funcional, un electrocardiograma basal y un Holter, una analítica completa similar a la de la inclusión, un ecocardiograma y prueba de esfuerzo con consumo de oxígeno, del mismo modo que la visita basal. La revisión de los *seis meses* del tratamiento tenía lugar mediante un ingreso para la realización de un estudio hemodinámico con valoración de la función ventricular por métodos angiográficos, incluyendo el análisis de la reserva contráctil. Fueron revisados nuevamente a los *doce meses* desde la administración del medicamento de terapia celular, una visita que de nuevo incluía métodos no invasivos de exploración de la función ventricular, con determinación del grado funcional, un electrocardiograma y Holter, analítica, ecocardiograma y prueba de esfuerzo con consumo de oxígeno (por los mismos procedimientos que en la visita basal).

Las evaluaciones angiográficas fueron realizadas en dos momentos del ensayo clínico. El ventriculograma basal se obtenía justo antes de la infusión de células, mientras que el ventriculograma tardío se efectuaba a los 6 meses de seguimiento. Durante cada ventriculograma de estudio, realizado en proyección oblicuo-anterior derecha 30°, se intentaba obtener un latido sinusal y otro post-extrasistólico para análisis, con vistas a

estudiar la reserva contráctil del ventrículo izquierdo. Los latidos post-extrasistólicos eran obtenidos mediante la inducción de latidos prematuros con el propio catéter “pigtail”, una vez obtenido un ciclo cardíaco sinusal bien opacificado. En todas las ocasiones, a través de la monitorización electrocardiográfica durante el cateterismo, el intervalo R-R’ del latido prematuro inducido y de la pausa post- extrasistólica fue registrado y medido. Los cálculos y medidas de la función ventricular fueron efectuados en nuestro propio laboratorio, donde las siluetas telediastólica y telesistólica eran dibujadas mediante el sistema CASS por 2 expertos angiografistas. Se obtuvieron tanto los volúmenes ventriculares como la función ventricular, además se analizó la motilidad regional. Se utilizó el método de Sheehan<sup>285</sup> para el estudio de la asinergia, dividiendo las siluetas superimpuestas en 100 radios de acortamiento sistólico de la pared, desde telediástole a telesístole, definiéndose el segmento de contracción anormal (SCA) como el porcentaje de radios que mostraran aquinesia o disquinesia (**Figuras 4 y 5**). Se evaluó la competencia de la válvula mitral y en el caso de existir incompetencia se definía en grados del I al IV.

Las variables cuantitativas utilizadas para la valoración de la función ventricular fueron la FE y el número de cuerdas con contracción anormal. El grado de recuperabilidad funcional obtenido al seguimiento se calculaba como la diferencia funcional obtenida en dicho seguimiento menos la condición basal. De igual forma, se obtuvieron en ambas condiciones tanto la presión de llenado ventricular izquierda como la reserva coronaria en las tres coronarias principales (arteria coronaria descendente anterior, arteria coronaria derecha y arteria coronaria circunfleja) medida tras la inyección intracoronaria de adenosina. Se analizaron estos parámetros pues se suponía que ocurrirían cambios en relación con la posible neovascularización propiciada por la angiogénesis prevista tras la administración de la terapia.

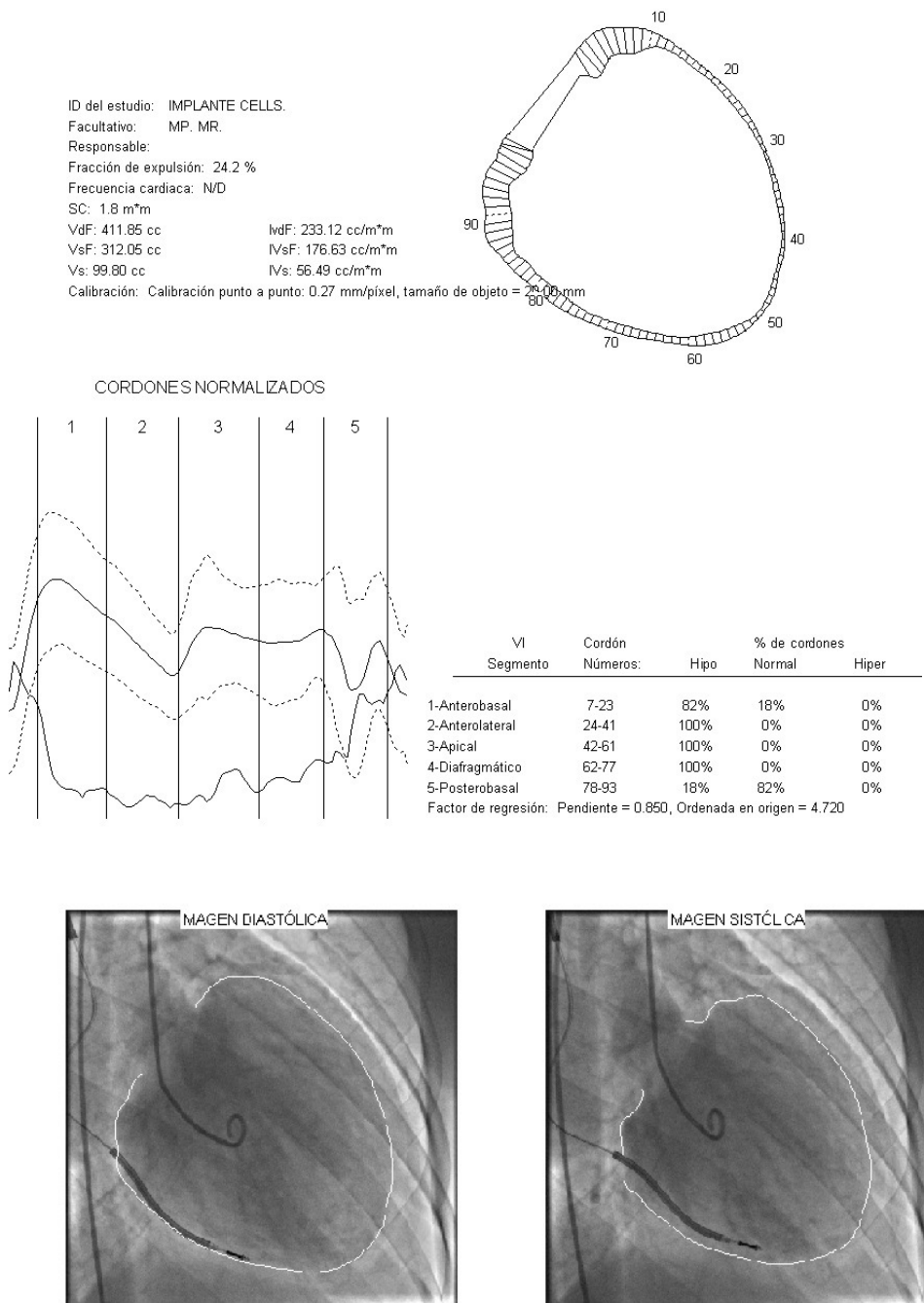
Para la medición de la velocidad de flujo y reserva coronaria se utilizó el sistema FloMap® (Cardiometrics; Mountain View; California). Los estudios de reserva coronaria (CFR) fueron realizados antes de la infusión de células y a los 6 meses de seguimiento. En cada arteria, se introducía una guía Doppler de 0.014” cuya punta se

ubicaba en el tercio proximal de su recorrido epicárdico, registrándose velocidades de flujo de forma continua. El pico medio de velocidad se obtenía basalmente y tras la administración de un bolo intracoronario de 60  $\mu\text{g}$  de adenosina en la coronaria izquierda y de 40  $\mu\text{g}$  en la coronaria derecha, calculándose el CFR en cada condición de estudio como la relación entre la máxima velocidad de flujo durante el efecto pico de la adenosina y la velocidad de flujo basal.



**Figura 4.** Valoración angiográfica de la función ventricular realizada en el momento basal (previa a la infusión intracoronaria de células madre) con la silueta telediastólica y telesistólica. También se muestra como ambas siluetas quedan divididas en 100 radios de acortamiento sistólico para el cálculo del segmento de contracción anormal (método de

Sheehan) junto a la imagen del momento de la infusión de progenitores en la parte proximal de la arteria descendente anterior.



**Figura 5.** Imágenes dibujadas con el sistema CASS: las siluetas telediastólica y telesistólica y queda cuantificada la FE en cada momento, así como las siluetas divididas en 100 radios de acortamiento sistólico para el cálculo del segmento de contracción anormal (método de Sheehan).

**Variables secundarias:**

Se llevó a cabo un seguimiento estrecho para objetivar la evolución de la clase funcional y para detectar posibles eventos adversos tras la administración de la terapia, que aunque ésta haya sido empleada en cientos de pacientes con cardiopatía isquémica, y ha demostrado ser segura tanto en lo referido a la vía de administración intracoronaria, como en el tipo de células administradas, podrían ocurrir eventos tales como arritmias, daño miocárdico tras la infusión de células, desarrollo de proliferación celular vascular en el árbol coronario, estimulación tumoral o efectos adversos derivados de la vía de abordaje para el cateterismo: hematoma inguinal que necesitara transfusión sanguínea y/o pseudoaneurisma femoral que precisara tratamiento mecánico. Se analizó el grado de mejoría clínica por la ausencia de eventos cardíacos mayores durante el seguimiento, definidos como *muerte de causa cardíaca* o empeoramiento clínico que implicase *ingreso hospitalario*, presencia de *arritmias malignas* o la inclusión del paciente en programa de *trasplante cardíaco*.

**3.5 Valoración de los sujetos a largo plazo**

Para analizar resultados y eventos a largo plazo y poder estudiar factores determinantes de buen resultado tardío se realizaron revisiones clínicas y valoración ecocardiográfica de la función ventricular izquierda periódicas anuales desde la finalización del período determinado en el ensayo clínico (1 año) a todos los enfermos de nuestra serie.

El seguimiento medio final desde que fueran incluidos entre marzo 2008 y diciembre 2010 hasta que finalizó la nueva valoración de todos ellos en 2014 fue de 5 años aproximadamente ( $53 \pm 14$  meses). Todos los pacientes fueron seguidos periódicamente por su cardiólogo desde que salieron del estudio, pero fueron reclamados de nuevo para este análisis tardío del ensayo.

**Valoraciones realizadas:**

-*Evaluación clínica*, determinando su grado funcional según la clasificación internacional de la NYHA (catalogada en grados del I al IV).

-*Análisis sanguíneo* en el que se han determinado un hemograma completo, el valor del *BNP*, un estudio de coagulación y una bioquímica general (con glucosa, creatinina, iones, urea, perfil lipídico con fracciones de HDL-colesterol, LDL-colesterol y triglicéridos, proteína C reactiva, enzimas hepáticas- AST, ALT, GGT y FA-, LDH, bilirrubina y proteínas).

-*Evaluación ecocardiográfica* completa, en la cual se incluye fundamentalmente la FE ventricular izquierda y los volúmenes ventriculares por el método de Simpson biplanar; la insuficiencia de la válvula mitral también fue cuantificada. Se empleó contraste intravenoso para mejor delimitación de endocardio en los casos con mala calidad de imagen (la **Figura 6** muestra un ejemplo de ello). En esta ocasión fue realizado por un solo ecocardiografista experto y se utilizó el mismo equipo que en la evaluaciones previas (equipo Phillips iE33, Phillips Ultrasound, Phillips Healthcare, Massachusetts, Estados Unidos)<sup>286</sup>.

- Registro de los *eventos mayores* en dicho período de seguimiento, considerando como tales eventos a: 1) *muerte* (especificando su causa como cardíaca o no cardíaca) y el momento de la misma en el seguimiento, 2) la necesidad de al menos un *ingreso hospitalario motivado por IC*, 3) el haber precisado implante de *TRC* (con o sin desfibrilador asociado según la indicación en cada caso) y 4) la necesidad de *trasplante cardíaco*.

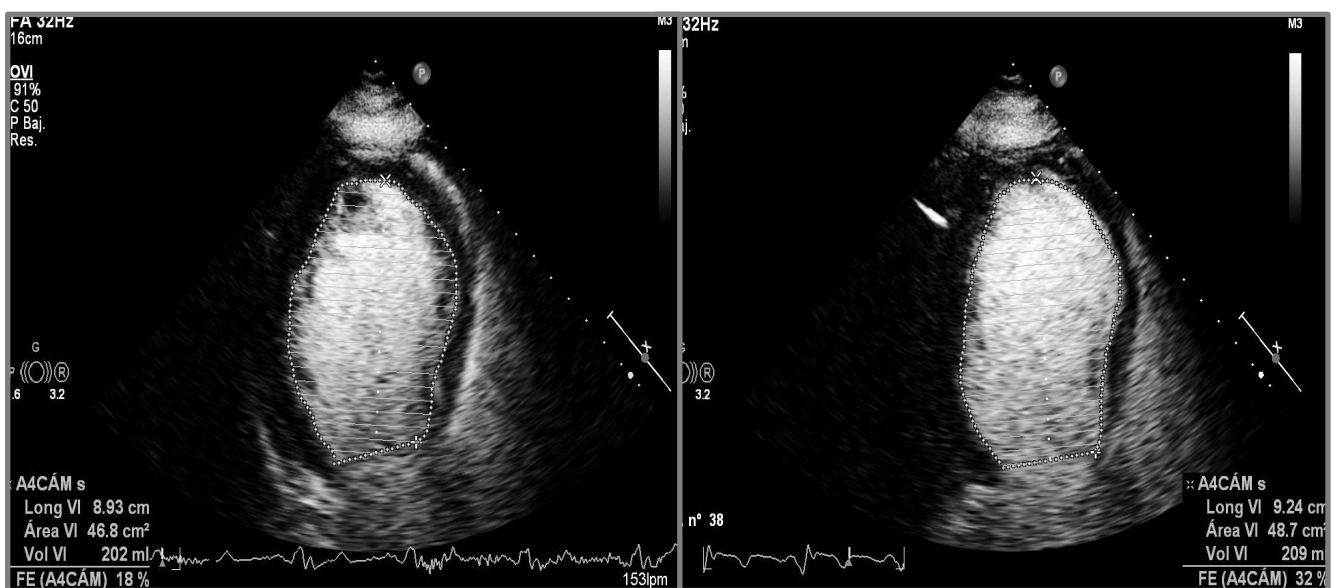
- Asimismo, hemos analizado de nuevo una serie de datos basales en el momento de la infusión intracoronaria de células de MO como son la edad, el sexo, la presencia de factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, diabetes mellitus, hiperlipidemia o hábito tabáquico), el grado funcional según la clasificación NYHA que presentaban en la inclusión, parámetros analíticos básicos (hemograma, VSG, estudio de coagulación, BNP, bioquímica general con glucosa, creatinina, urea, iones, proteína C reactiva,

determinaciones seriadas de CPK y troponina I, enzimas hepáticas, AST, ALT, GGT y FA, LDH, bilirrubina y perfil lipídico con fracciones de HDL-colesterol, LDL-colesterol y triglicéridos).

- También se han recopilado de nuevo datos ecocardiográficos, hemodinámicos y angiográficos basales, tanto en un latido sinusal como en un latido post-extrasistólico para ser correlacionados con los eventos al seguimiento.

- Se volvieron a rescatar los diversos parámetros biológicos iniciales ya expuestos anteriormente relacionados con la terapia administrada para estudiar su posible correlación con la buena o mala respuesta a la misma.

Se realizó un análisis univariable de los factores que pudieran estar asociados con la buena respuesta al seguimiento así como los eventos sufridos por los sujetos.



**Figura 6.** Ecocardiograma que muestra la fracción de eyección basal por el método Simpson con imagen mejorada con ecopotenciador (imagen de la izquierda) comparada con la del último seguimiento (imagen de la derecha); la primera imagen muestra una FE del 18% y la segunda una FE del 32% casi 5 años después de la infusión de células madre de MO autóloga.

### **3.6 Análisis estadístico**

#### **Análisis estadístico inicial:**

Los datos se expresan en forma de media  $\pm$  desviación estándar y las diferencias entre los porcentajes se calcularon con la prueba de Chi cuadrado o el test exacto de Fisher, según procediera. Se utilizaron test no paramétricos para comparar medias (como la prueba de la U de Mann-Whitney y la prueba de Wilcoxon, para datos independientes y apareados respectivamente). Las diferencias encontradas en los métodos no invasivos de un mismo enfermo entre las 3 fases del seguimiento se analizaron con la prueba de Friedman y con la prueba de Pearson se estableció la correlación lineal entre variables cuantitativas. Se consideró como estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ . El programa estadístico empleado fue SPSS versión 15.0.

#### **Análisis estadístico empleado para el seguimiento tardío:**

El análisis descriptivo nos proporcionó datos expresados en forma de media  $\pm$  desviación estándar. Para obtener las diferencias entre porcentajes se usó el test de Chi cuadrado. Como test no paramétricos fueron empleados la U de Mann-Whitney para datos independientes y el test de Wilcoxon para datos apareados. También se han obtenido curvas de Kaplan Meier, unas de supervivencia y otras de tiempo libre de eventos (globales y por grupos según respuesta a la terapia administrada) así como un gráfico representativo de la evolución de la FE durante los casi 5 años de seguimiento. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo. Para este análisis se ha utilizado el programa estadístico SPSS versión 17.0.



## **4. Resultados**

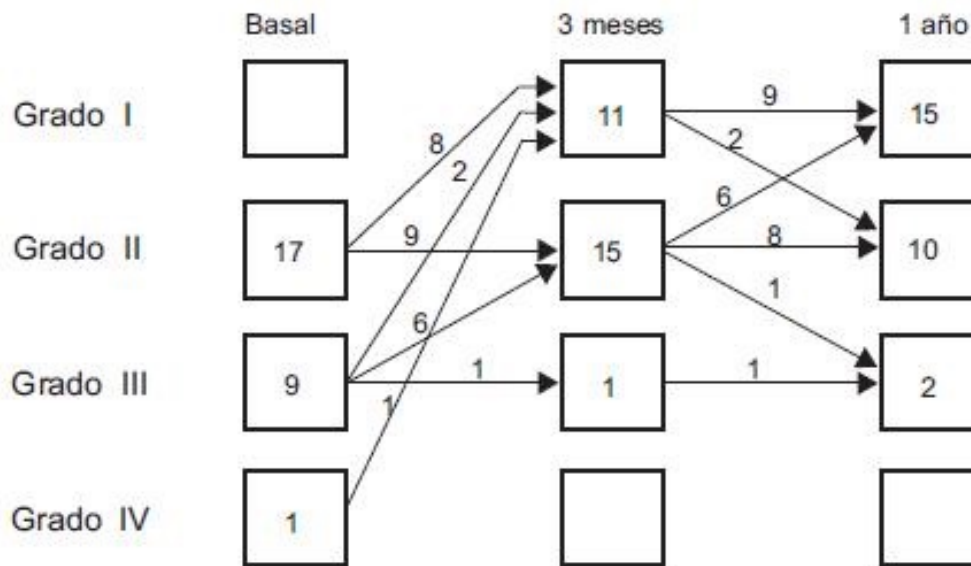
---

## 4.1 Resultados inmediatos

### Resultados clínicos

No se registraron eventos adversos durante los primeros 12 meses con ninguno de los procedimientos diagnósticos ni tampoco se produjeron acontecimientos indeseables relacionados con la terapia administrada salvo episodios de bradicardia de corta duración y leve hipotensión en 5 pacientes durante la infusión de las células de MO que igualmente permitieron continuar el estudio. Ninguno presentó arritmias severas durante la monitorización hospitalaria de 24 horas posterior al cateterismo de infusión de la terapia.

El valor analítico máximo de troponina tras la infusión celular se mantuvo en rangos prácticamente normales ( $0.03\pm 0.04$  ng/ml). En el seguimiento a corto-medio plazo (durante los primeros 12 meses) sólo un enfermo reingresó por descompensación de su IC. En cuanto a la evolución de la clase funcional según la clasificación de la NYHA, en clase II se encontraban 17 pacientes de los 27 totales, mientras que al año lo estaban sólo 10 pacientes. En clase III basal se encontraban 9 enfermos mientras que al año sólo 2 pacientes lo estaban. El único enfermo que se incluyó en clase IV pasó, tras los 3 primeros meses, a clase I de la NYHA; la **Figura 7** es bastante ilustrativa para comprender la evolución de la clase funcional durante el primer año tras la administración de la terapia celular. A su vez se produjo una reducción significativa del valor del BNP a lo largo del seguimiento inicial, partiendo de un basal medio de  $403\pm 417$  pg/ml hasta reducirse a un valor medio significativamente inferior a los 12 meses de  $122\pm 190$  pg/ml.



**Figura 7.** Evolución de la clase funcional según la clasificación de la NYHA de los 27 sujetos de la serie durante el primer año.

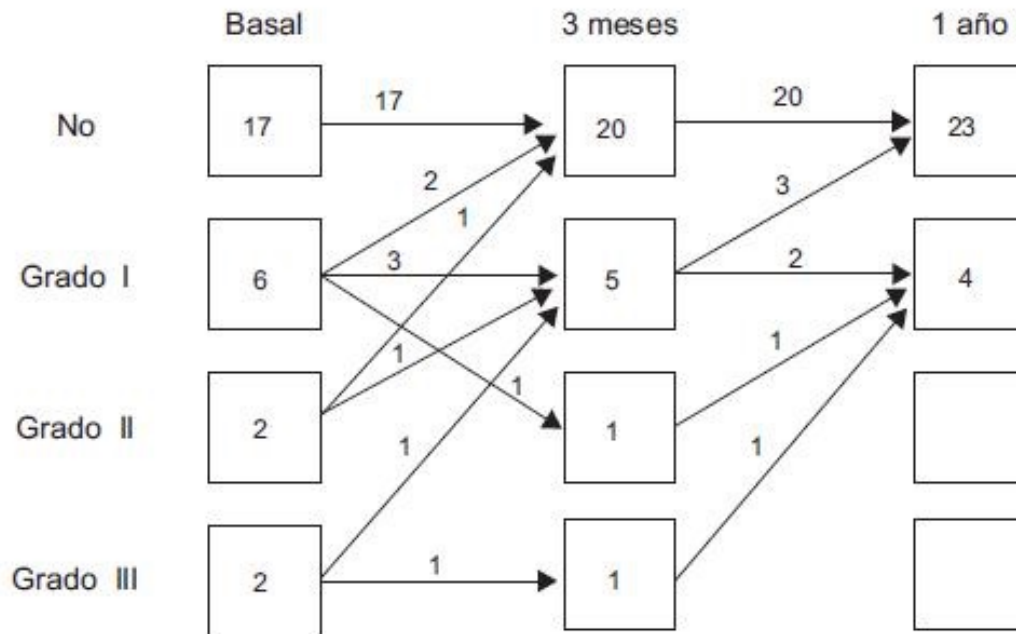
### Resultados en métodos no invasivos

La capacidad de ejercicio mejoró en la mayor parte de los pacientes y la captación de oxígeno máxima teórica y el tiempo de ejercicio también. Se redujeron los volúmenes ventriculares y se incrementó la FE en la mayoría de ellos, el resumen de estas valoraciones quedan reflejadas en la **Tabla 5**. En cuanto a la valoración de la insuficiencia mitral también por ecocardiograma sufrió modificaciones, basalmente la presentaban en grado I 6 enfermos, en grado II 2 enfermos y en grado III otros 2 enfermos mientras que 17 enfermos no presentaban insuficiencia mitral; un año después de la terapia, 23 enfermos no presentaban ningún grado de insuficiencia mitral y 4 sólo la presentaban en grado I (**Figura 8**).

**Tabla 5.** Evolución de los parámetros de valoración no invasivos durante el primer año

<b>Prueba de esfuerzo en cinta sin fin</b>	<b>Basal</b>	<b>3 meses</b>	<b>1 año</b>	<b>p</b>
<i>Captación de oxígeno máxima (ml/min/kg)</i>	20.21 ± 5.1	21.36 ± 4	22.32 ± 4.9	0.16
<i>Captación de oxígeno máxima teórica (%)</i>	73 ± 17	77 ± 16	83 ± 18	0.04
<i>Tiempo de ejercicio (min)</i>	11 ± 5	15 ± 4	15 ± 3	0.002
<b>Ecocardiograma</b>				
<i>Volumen telediastólico (ml)</i>	178 ± 63	161 ± 60	176 ± 78	0.57
<i>Volumen telesistólico (ml)</i>	131 ± 55	107 ± 47	112 ± 65	0.05
<i>Fracción de eyección* (%)</i>	27 ± 7	35 ± 11	38 ± 11	0.001

Los datos se expresan en forma de media ± desviación estándar. \* Calculada mediante el método de Simpson



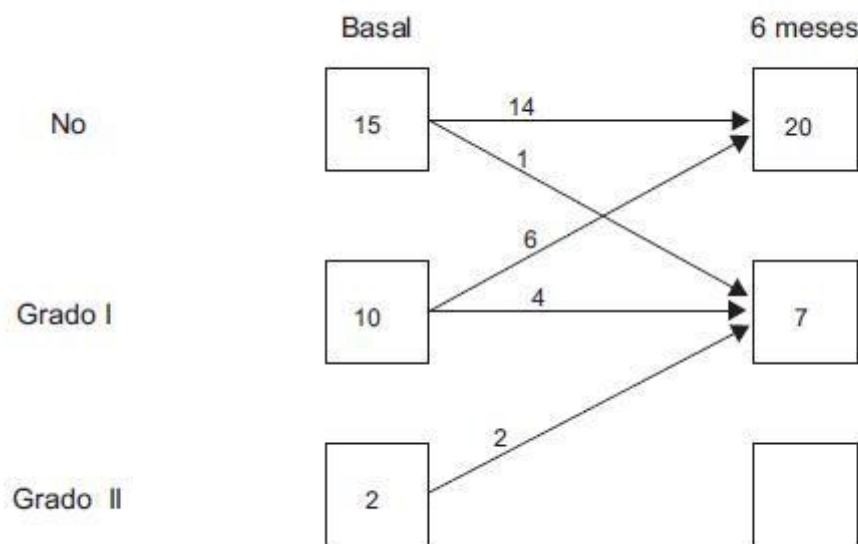
**Figura 8.** Evolución de la insuficiencia mitral valorada por ecocardiograma.

### Resultados en la evaluación hemodinámica

En cuanto al análisis de la ventriculografía, se produjeron reducciones significativas de los volúmenes ventriculares y aumentos significativos de la FE; esa ganancia en la FE coincidió con una reducción del acortamiento regional anormal de la pared, un  $12.9 \pm 20\%$  de reducción media de los radios hipoquinéticos y también se produjo una reducción de los segmentos acinéticos a los 6 meses en los casos ya presentes en el estudio basal ( $7.1 \pm 9.4$  de media de reducción de segmentos de contractilidad anormal) todo esto medido en latido sinusal, mientras que en latido post-extrasistólico se pudo comprobar mejoría en la reserva contráctil ventricular en el seguimiento inicial. No se produjeron cambios en la reserva de flujo coronario ni en la velocidad de flujo máxima por doppler en ninguna de las 3 arterias coronarias evaluadas. En cuanto a los cambios producidos en el grado de insuficiencia mitral valorada por ventriculografía, 10 pacientes basalmente presentaban en la ventriculografía insuficiencia grado I, a los 6 meses tras la administración de la terapia 7 pacientes los presentaban y los 2 pacientes

que al inicio presentaban insuficiencia mitral grado II, pasaron a tener grado I a los 6 meses de seguimiento (**Figura 9**). El valor medio de reserva de flujo coronario se mantuvo por tanto estable en los siguientes valores: en la arteria descendente anterior izquierda  $2.6\pm 0.8$  basal y  $2.5\pm 0.4$  a los 6 meses, en la arteria coronaria derecha  $2.5\pm 0.8$  basal y  $2.8\pm 0.8$  a los 6 meses, en la arteria circunfleja  $2.3\pm 0.6$  basal y  $2.7\pm 1$  a los 6 meses. Los cambios funcionales obtenidos mediante la valoración invasiva quedan recogidos en la **Tabla 6**.

En función de los resultados obtenidos pudimos dividir a los pacientes en dos grupos, los “respondedores” y los “no respondedores” a la terapia administrada. El primer grupo lo constituyeron 21 de los 27 pacientes incluidos en el ensayo (78%) que mostraron mejora significativa a los 6 meses de la infusión de células madre (la ganancia media de la FE medida por angiografía fue de  $14\pm 7\%$ ), frente a los 6 sujetos restantes (22%) que no mostraron respuesta a dicha terapia (con una ganancia media de la FE de  $-5\pm 3\%$ ). La evolución de la FE ventricular izquierda en ambos grupos queda ilustrada en la **Figura 10**.

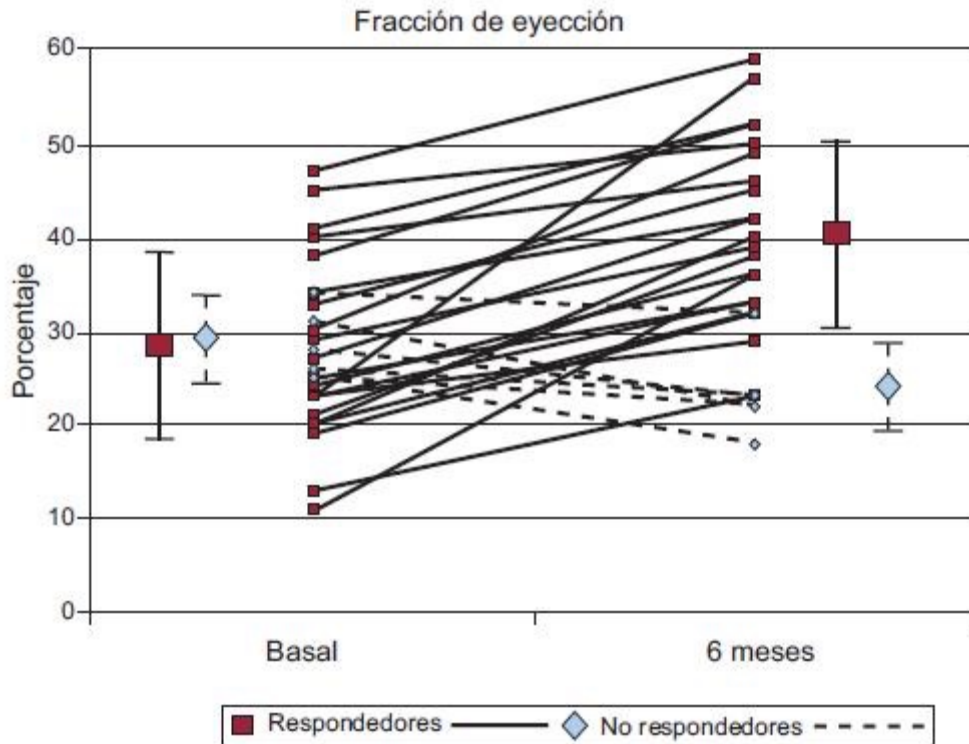


**Figura 9.** Evolución de la insuficiencia mitral valorada por angiografía.

**Tabla 6.** Resumen de los cambios funcionales en el ventrículo izquierdo en los 6 primeros meses.

	<b>Basal</b>	<b>6 meses</b>	<b>p</b>
<b>Latido sinusal</b>			
PTDVI (mmHg)	17 ± 8	15 ± 9	0.21
VTDVI índice (ml/m <sup>2</sup> )	161 ± 64	144 ± 48	0.001
VTSVI índice (ml/m <sup>2</sup> )	118 ± 56	93 ± 42	0.001
Fracción de eyección (%)	28 ± 9	37 ± 11	0.003
Radios hipocinéticos (%)	55 ± 16	43 ± 22	0.04
SCA (%)	15 ± 14	8 ± 11	0.001
<b>Latido postextrasistólico</b>			
VTDVI índice (ml/m <sup>2</sup> )	176 ± 62	164 ± 59	0.001
VTSVI índice (ml/m <sup>2</sup> )	107 ± 53	84 ± 42	0.001
Fracción de eyección (%)	41 ± 1	50 ± 12	0.01
Radios hipocinéticos (%)	36 ± 22	23 ± 17	0.25
SCA (%)	5 ± 9	2 ± 4	0.12

PTDVI: presión telediastólica ventricular izquierda; VTDVI: volumen telediastólico ventricular izquierdo; VTSVI: volumen telesistólico ventricular izquierdo; SCA: segmento contráctil anormal. Los datos se expresan en forma de media ± desviación estándar.



**Figura 10.** Mejoría de la fracción de eyección ventricular izquierda a los 6 meses valorada por ventriculografía invasiva de los respondedores y los no respondedores iniciales.

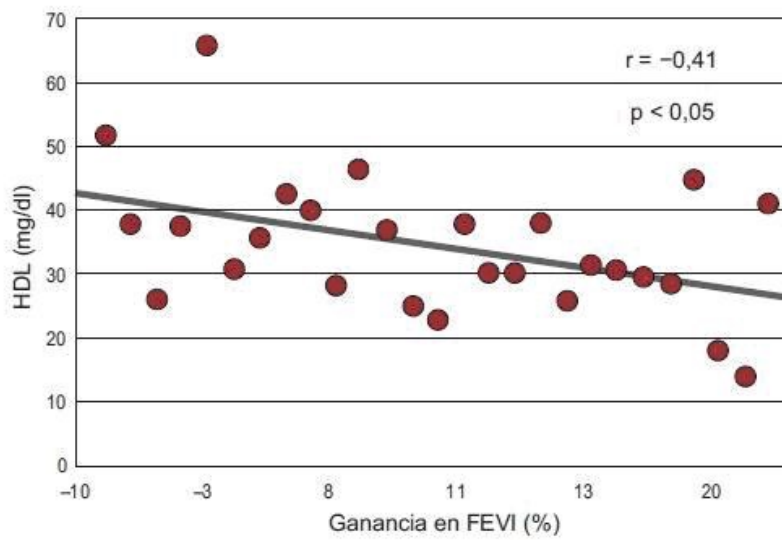
Igualmente se pudieron comprobar una serie de *factores que influyeron en la respuesta a corto plazo*, resultando ser los pacientes “respondedores” a la terapia administrada más jóvenes cuyas células administradas presentaron una migración basal junto con una migración para el SDF1 y VEGF significativamente menores. Se obtuvo una casi significación estadística en cuanto a las cifras del colesterol HDL, encontrado en menor cantidad en suero en sujetos “respondedores” (véase **Tabla 7**). La **Figura 11** muestra de manera bastante gráfica la correlación obtenida ( $r = -0.41$ ), entre la FE ventricular izquierda y los niveles de HDL colesterol de manera que se observaba una tendencia que a menores niveles de HDL colesterol en suero mayor era la ganancia de FE. Igualmente se obtuvo correlación inversa ( $r = -0.41$ ) entre la cantidad de células infundidas (del tipo CD34+) y los niveles en suero de colesterol HDL (**Figura 12**).



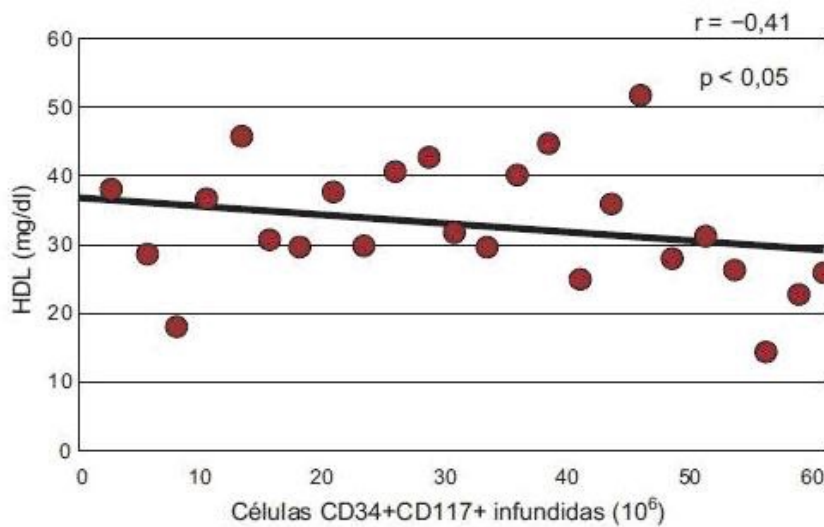
**Tabla 7.** Resumen de los factores que influyen en la capacidad de respuesta a corto plazo

	<b>Respondedores (n=21)</b>	<b>No respondedores (n=6)</b>	<b>p</b>
Edad (años)	51 ± 12	62 ± 9	0.04
Colesterol (mg/dl)	171 ± 41	184 ± 36	0.46
cHDL (mg/dl)	32 ± 9	42 ± 15	0.06
Varones	15 (71)	5 (83)	0.50
Diabetes mellitus	6 (29)	1 (17)	0.62
Hipertensión	6 (29)	4 (67)	0.15
Fumadores	11 (52)	2 (33)	0.61
Fracción de eyección basal (%)	28 ± 10	29 ± 4	0.47
Células mononucleares infundidas (x10 <sup>8</sup> )	9.66 ± 2.47	11.99 ± 3.77	0.08
Migración basal (células x10 <sup>8</sup> )	4.4 ± 1.2	6.9 ± 1.5	0.002
Migración para VEGF (células x10 <sup>8</sup> )	5.38 ± 1.66	8.1 ± 2.3	0.009
Migración para SDF-1 (células x10 <sup>8</sup> )	5.8 ± 1.7	8.4 ± 2.9	0.02

cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; SDF-1: factor 1 derivado de células de estroma; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular  
Los datos se expresan en forma de n (%) o media ± desviación estándar



**Figura 11.** Correlación lineal observada a corto plazo en relación a los niveles de HDL colesterol y la fracción de eyección ventricular izquierda.



**Figura 12.** Correlación lineal observada a corto plazo en relación a los niveles de HDL colesterol y la cantidad de células CD34+ infundidas.

---

## Resultados biológicos

La media de células infundidas en los pacientes fue, células mononucleares de MO ( $\times 10^8$ )  $10.2 \pm 2.9$ ; CD34+ ( $\times 10^6$ )  $40.4 \pm 23.6$ ; CD34+/CD117+ ( $\times 10^6$ )  $20.6 \pm 15.4$ ; CD133+ ( $\times 10^6$ )  $22.8 \pm 15.3$ ; CD34+/CD38- ( $\times 10^6$ )  $9.9 \pm 11.8$ ; CD34+/CXCR4+ ( $\times 10^6$ )  $1.9 \pm 2.8$ ; CD90+ ( $\times 10^6$ )  $1.3 \pm 1.3$ . El número de hematíes totales contaminantes de la suspensión fue  $0.49 \pm 0.23$  ( $\times 10^8$ ) y un hematocrito de  $0.42 \pm 0.2\%$ . La migración para VEGF ( $\times 10^8$ ) fue de  $5.8 \pm 2$  células. La migración para SDF-1 ( $\times 10^8$ ) fue de  $6.3 \pm 2.1$  células. La frecuencia de células endoteliales de unidades formadoras de colonias ( $\times 10^6$ ) fue  $8.2 \pm 13.9$  células.

## 4.2 Resultados a largo plazo

De la serie de 27 pacientes incluidos inicialmente, tras casi 5 años de seguimiento medio final desde que se les administrara la terapia regenerativa con células madre, hemos registrado que 15 pacientes (56%) no han presentado ninguno de los eventos mayores a los cuales los hemos denominado **grupo I** y el resto, 12 pacientes (44%), sí han presentado uno o varios eventos mayores, denominando a este grupo de sujetos como **grupo II**. Con eventos nos referimos a la muerte (especificando si su causa fue o no cardíaca) así como al momento de la misma en el seguimiento, la necesidad de al menos un ingreso hospitalario por IC, el haber precisado implante de TRC (con o sin desfibrilador asociado) o la necesidad de trasplante cardíaco. Ello supone que de los 21 “respondedores” iniciales (a los 6 meses) desde la infusión, 14 pertenecen al **grupo I**, mientras que de los 6 “no respondedores” iniciales, 5 pertenecen al **grupo II**. Entre los pacientes que pertenecen al **grupo II** se registraron 3 *muertes* (todos ellos en el contexto de IC descompensada), dos de ellos fallecieron a los 21 meses y otro a los 69 meses, siendo éste último a su vez portador de TRC, que se implantó a los 18 meses de la infusión. Tres pacientes habían *ingresado en el hospital*, al menos una vez en el seguimiento, *por IC* (tiempo medio del ingreso:  $29 \pm 11$  meses desde la terapia celular) sin otro evento mayor añadido. Uno de los pacientes que había precisado TRC en el seguimiento se *trasplantó de corazón* posteriormente (41 meses tras la infusión celular),

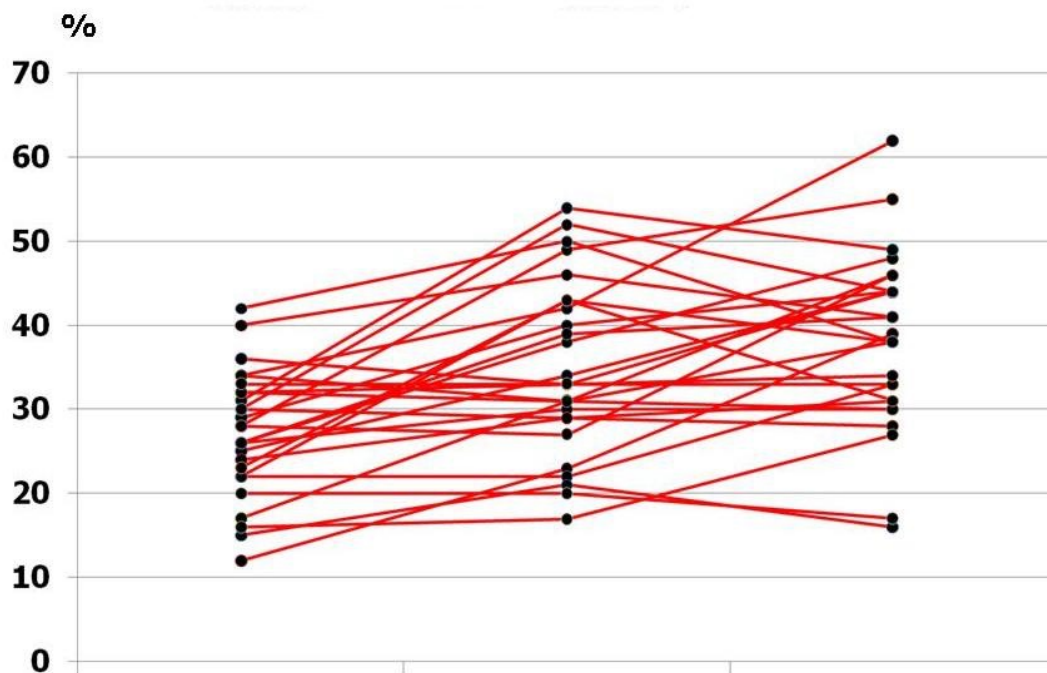
habiendo tenido varios ingresos previos por IC. Así pues, fueron siete los pacientes que necesitaron TRC en el seguimiento (tiempo medio del implante:  $25\pm 7$  meses) habiendo ingresado por IC previamente 5 de ellos. Dos de los pacientes a los que se les implantó TRC en el seguimiento no tuvieron buena respuesta; uno fallece y otro precisa trasplante con posterioridad. En ningún caso se detectaron eventos adversos asociados directamente a la terapia celular administrada.

En cuanto al *grado funcional*, todos los pacientes del **grupo I** presentaban al seguimiento grado funcional de la NYHA I-II frente a la mayoría de los del **grupo II** que estaban en grado funcional II-III de la NYHA (con un valor medio de  $1.6\pm 0.6$  en el **grupo I** frente a un valor de  $2.3\pm 0.9$  en el **grupo II**;  $p<0.01$ ). El valor medio de la última determinación de *BNP* en suero fue de  $156\pm 450$  pg/mL (valor medio de  $69\pm 58$  pg/mL en el **grupo I** frente a  $280\pm 750$  pg/mL en el **grupo II**;  $p<0.03$ ). El valor medio global de la última determinación de la *FE ventricular izquierda* por ecografía transtorácica fue de  $35\pm 13$  % ( $42\pm 11\%$  en el **grupo I** comparado con  $26\pm 5\%$  en el **grupo II**;  $p<0.005$ ), siendo la *ganancia de FE* ventricular izquierda media global (FE del último seguimiento menos la FE basal) del  $7.4\pm 11\%$  ( $11.6\pm 12\%$  en el **grupo I** frente a  $2.5\pm 7\%$  en el **grupo II**;  $p<0.01$ ). No se encontraron diferencias significativas entre grupos en cuanto al grado de insuficiencia mitral respecto al año de seguimiento. La **Figura 13** muestra la evolución de la FE ventricular izquierda durante todo el seguimiento desde la infusión de los progenitores hematopoyéticos.

No se encontraron resultados estadísticamente significativos en los parámetros biológicos estudiados de las células infundidas entre grupos al seguimiento. Sin embargo sí se encontraron diferencias significativas en la *edad* media de los pacientes en cuanto a eventos en el seguimiento. Los pacientes que no presentaron eventos al seguimiento eran más jóvenes ( $48\pm 11$  años en el **grupo I**, frente a  $58\pm 11$  años en el **grupo II**;  $p<0.05$ ). Los “respondedores iniciales” eran también pacientes más jóvenes que los “no respondedores” a la terapia. Los pacientes del grupo que no presentan eventos al seguimiento tenían *mejor clase de la NYHA basal* ( $2.1\pm 0.4$  en el **grupo I** vs

2.7±0.7 en el **grupo II**; p<0.04). También se encontraron diferencias en lo referente al ecocardiograma basal, objetivándose en el primer grupo un *volumen sistólico medio basal menor* (112±52 ml en el **grupo I** vs 165±56 ml en el **grupo II**; p<0.02) y una *FE ventricular izquierda mayor* (30±5% en el **grupo I** vs 23±9% en el **grupo II**; p<0.02). En los pacientes del grupo sin eventos se observó que en la angiografía basal presentaban una *mayor FE ventricular izquierda en el latido sinusal* (31±9% en el **grupo I** frente a 24±7% en el **grupo II**; p<0.04) y una *FE ventricular izquierda postextrasistólica también mayor* (46±13% vs 35±11%; p<0.04) así como un *volumen diastólico menor* (143±49 cc/m<sup>2</sup> vs 183±76 cc/m<sup>2</sup>; p<0.05). En general, los pacientes que inicialmente respondieron más fueron los que peor FE basal tenían, pero sin embargo, han presentado más eventos al seguimiento tardío los que partían de una FE basal más baja.

Estos datos quedan recogidos en las **Tablas 8,9 y 10**.



**Figura 13.** Evolución a largo plazo de la FE ventricular izquierda valorada por ecocardiograma. Los puntos de corte hacen referencia a 3 momentos concretos del seguimiento de los sujetos: valoración basal, a los 6 meses y en el seguimiento tardío.

**Tabla 8.** Parámetros clínicos y ecocardiográficos basales.

	<b>GRUPO I</b> <b>(n=15)</b>	<b>GRUPO II</b> <b>(n=12)</b>	<b>p</b>
Edad (años)	48 ± 11	58 ± 11	<0.05
Sexo (% varones)	73	75	ns
Clase funcional NYHA	2.1 ± 0.4	2.7 ± 0.7	<0.05
BNP (pg/ml)	341 ± 415	481 ± 424	ns
Colesterol (mg%)	167 ± 47	183 ± 28	ns
LDL colesterol (mg%)	99 ± 30	115 ± 19	ns
HDL colesterol (mg%)	37 ± 10	36 ± 13	ns
Triglicéridos (mg%)	145 ± 107	168 ± 108	ns
Hipertensión arterial (%)	53	58	ns
Hiperlipidemia (%)	60	75	ns
Consumo de tabaco (%)	73	58	ns
Diabetes mellitus (%)	27	50	ns
FEVI (%)	30 ± 5	23 ± 9	<0.05
Volumen telediastólico de VI (ml)	164 ± 78	214 ± 64	ns
Volumen telesistólico de VI (ml)	112 ± 52	165 ± 56	<0.05

Todos los parámetros ecocardiográficos fueron determinados por el método de Simpson. NYHA: New York Heart Association; BNP: péptido natriurético cerebral; LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad; FEVI: Fracción de eyección de ventrículo izquierdo; VI: ventrículo izquierdo

**Tabla 9.** Parámetros biológicos basales.

	GRUPO I	GRUPO II	p
Células nucleadas totales infundidas (x10 <sup>8</sup> )	9.85 ± 2.90	10.58 ± 2.98	ns
Células cd 34+ totales infundidas (x10 <sup>6</sup> )	39.27 ± 24.49	42.89 ± 22.08	ns
Células cd117+ totales infundidas (x10 <sup>6</sup> )	26.74 ± 20.19	33.28 ± 17.19	ns
Células cd38- totales infundidas (x10 <sup>6</sup> )	8.34 ± 9.65	12.12 ± 14.68	ns
Células cxcr4+ totales infundidas (x10 <sup>6</sup> )	1.27 ± 2.04	2.89 ± 3.50	ns
CEC infundido	0.98 ± 0.83	0.64 ± 0.53	ns
PEC infundido	0.80 ± 1.15	1.10 ± 1.20	ns
Células cd133+ infundidas (x10 <sup>6</sup> )	21.24 ± 16.50	24.98 ± 13.90	ns
Células vegfr-2+ infundidas (x10 <sup>6</sup> )	33.20 ± 59.06	20.75 ± 34.16	ns
Células dr - infundidas (x10 <sup>6</sup> )	674.22 ± 224.56	683.24 ± 260.54	ns
Células cd90+ infundidas (x10 <sup>6</sup> )	1.18 ± 1.12	1.43 ± 1.62	ns
Migración basal total infundidas (x10 <sup>8</sup> )	4.55 ± 1.65	5.21 ± 1.29	ns
Migración a vegf totales infundidas (x10 <sup>8</sup> )	5.62 ± 2.28	6.11 ± 1.54	ns
Migración específica totales infundidas (x10 <sup>8</sup> )	1.07 ± 0.83	0.89 ± 0.86	ns
Migración a sdf1 totales infundidas (x10 <sup>8</sup> )	6.20 ± 2.45	6.33 ± 1.62	ns
Migración específica a sdf1 totales infundidas (x10 <sup>8</sup> )	1.65 ± 1.05	1.12 ± 0.81	ns

SDF-1: factor 1 derivado de células de estroma; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

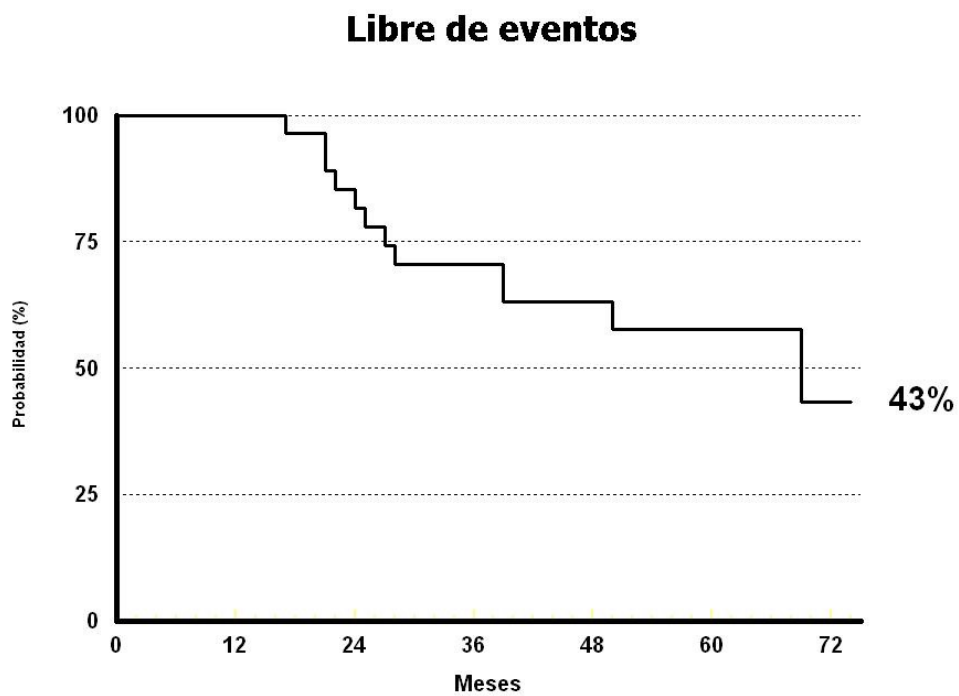
**Tabla 10.** Parámetros angiográficos basales.

	GRUPO I	GRUPO II	p
Grado de insuficiencia mitral	0.53 ± 0.7	0.50 ± 0.5	ns
FEVI latido sinusal (%)	31 ± 9	24 ± 7	<0.05
FEVI latido post-PVC*(%)	46 ± 13	35 ± 11	<0.05
Volumen telediastólico latido sinusal (ml/m <sup>2</sup> )	143 ± 49	183 ± 76	<0.05
Volumen telediastólico latido post-PVC*(ml/m <sup>2</sup> )	163 ± 48	194 ± 74	ns
Volumen telesistólico latido sinusal (ml/m <sup>2</sup> )	99 ± 41	142 ± 64	ns
Volumen telesistólico latido post-PVC*(ml/m <sup>2</sup> )	90 ± 40	127 ± 60	ns
Presión sistólica de arteria pulmonar (mmHg)	34 ± 18	37 ± 13	ns

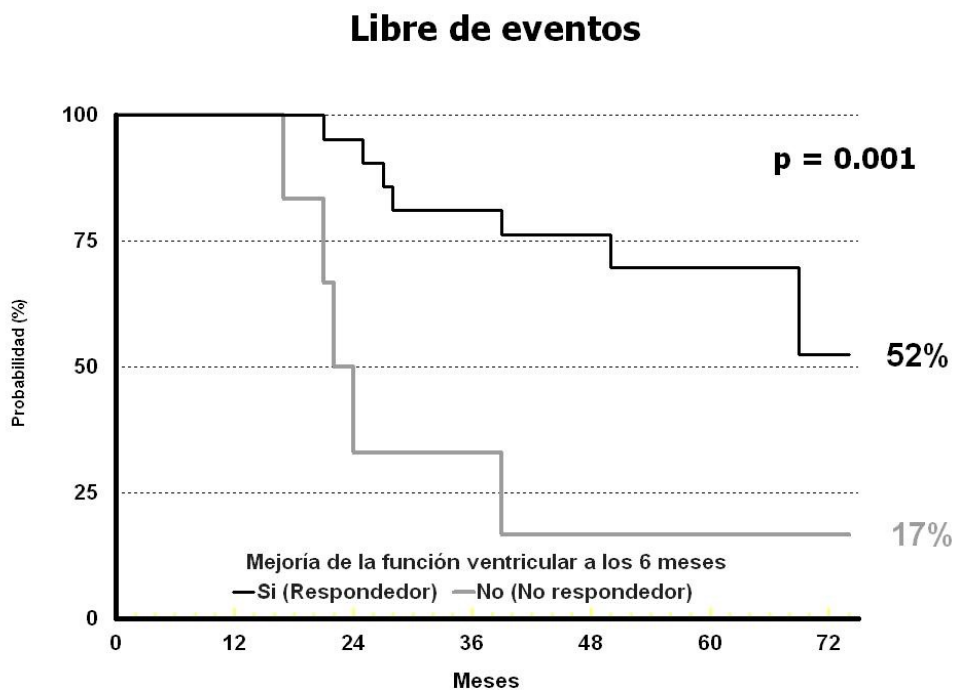
\*PVC: Post-extrasistólico

A los 5 años de seguimiento, la probabilidad de estar libre de eventos mayores fue del 43% (**Figura 14**); el 52% de los que fueron “respondedores” a la terapia a los 6 meses estuvieron libres de eventos mientras que tan solo el 17% de los “no respondedores” a los 6 meses se encontraron libres de eventos a los 5 años (**Figura 15**). El 69% de los pacientes están vivos a los 5 años desde la administración de la terapia (**Figura 16**), y eso supone un 83% de los “respondedores” iniciales y tan solo un 71% de los “no respondedores” iniciales aunque esta última relación no resultó estadísticamente significativa (**Figura 17**).

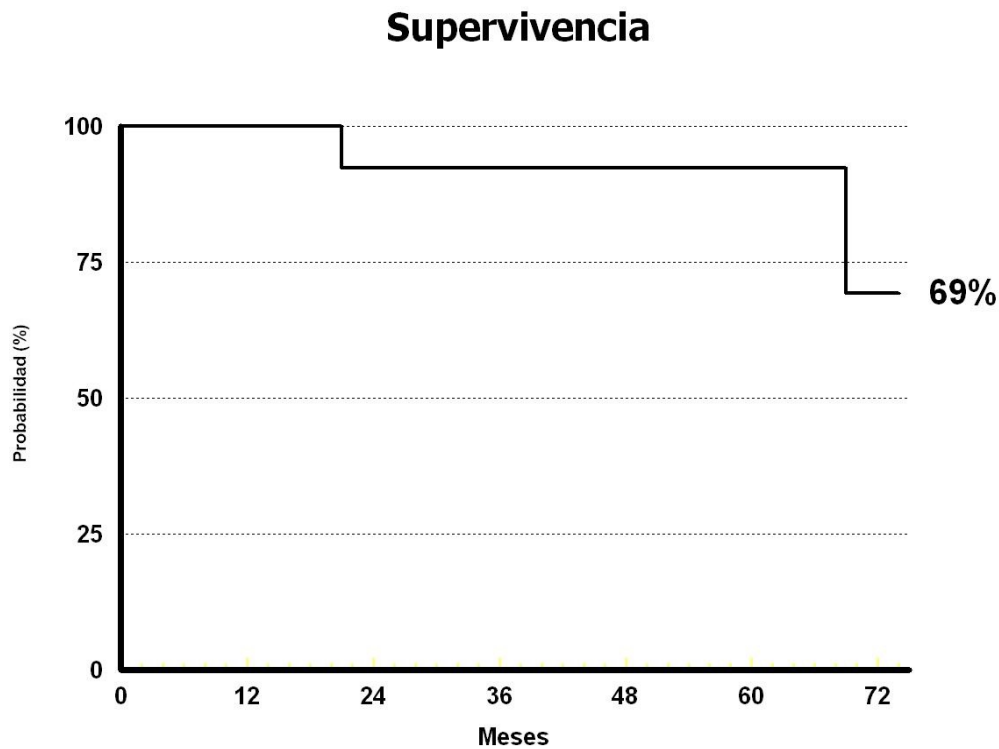




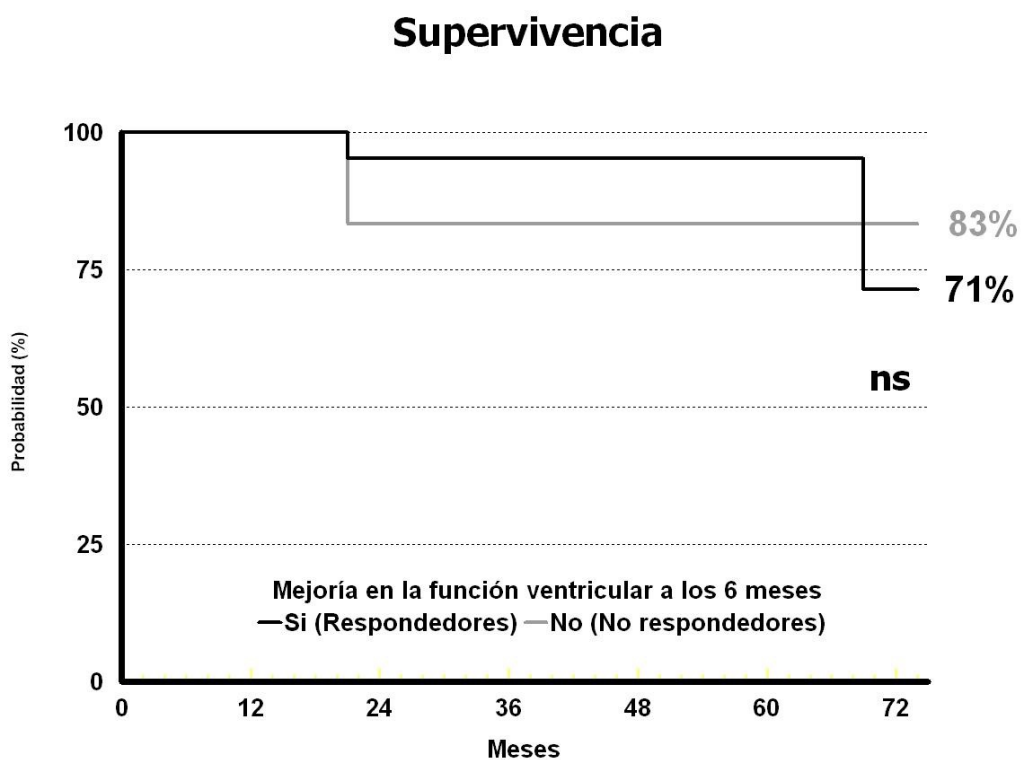
**Figura 14.** Probabilidad de estar libre de eventos a los 5 años.



**Figura 15.** Probabilidad de estar libre de eventos de “respondedores” y “no respondedores” a 5 años.



**Figura 16.** Probabilidad de supervivencia a los 5 años.



**Figura 17.** Probabilidad de supervivencia a los 5 años en “respondedores” y “no respondedores” iniciales.

### **4.3 Limitaciones del estudio**

Las principales limitaciones del estudio son:

- Tamaño muestral reducido.
- Ausencia de grupo control.
- Se trata de un estudio monocéntrico.

## **5. Discusión**

---

La terapia regenerativa con células madre es un tratamiento eficaz en la recuperación funcional ventricular izquierda a corto plazo en sujetos con MD idiopática<sup>51,180,182,287</sup>. Existen pocos estudios que analicen el seguimiento a largo plazo de estos pacientes. En los primeros trabajos se hablaba de una supervivencia natural de esta patología del 50% a los 2 años<sup>11,288</sup>, mejorando la misma conforme se han ido introduciendo progresivamente tratamientos farmacológicos del tipo betabloqueantes, IECAS/ARA II, antialdosterónicos junto con la TRC en sujetos seleccionados, llegando a describirse en alguna revisión actual una supervivencia de hasta el 87% a los 8 años<sup>18</sup>. A pesar de ello, se sigue investigando nuevas terapias coadyuvantes al tratamiento estándar de la IC, entre ellas, la terapia regenerativa con células madre, y, a su vez, se continúa estudiando aquellos factores que pudieran condicionar una mejor o peor respuesta a la terapia celular en la MD idiopática y que estén relacionados tanto con las características biológicas de las células administradas como con el perfil de paciente ideal.

### **5.1 Resultados a largo plazo**

Tras casi 5 años de seguimiento desde que se administrara la terapia regenerativa, el 69% de nuestros pacientes estaban vivos y la mayoría de ellos se mostraron libres de eventos mayores. La mejoría de la función ventricular se correlacionó con la mejoría en el grado funcional y el descenso del BNP en la mayoría de los casos, siendo éste último como bien sabemos, otro predictor de mortalidad al igual que sucede con la FE<sup>282</sup>. La última determinación de la FE ventricular izquierda por ecografía transtorácica fue de  $35 \pm 13$  % lo que suponía una ganancia de FE del  $7.4 \pm 11$ %. Se registraron 3 muertes en el contexto de IC descompensada; 3 ingresos hospitalarios por IC; fueron 7 los pacientes que necesitaron TRC en el seguimiento siendo uno de ellos a su vez trasplantado posteriormente y otro de éstos fue uno de los fallecidos. No se observaron eventos adversos asociados directamente a la terapia administrada.

Si comparamos nuestros resultados con lo que se encuentra en la literatura desde que en 2006 se autorizara el uso experimental de células madre en MD no isquémica<sup>62,185-186</sup> podemos decir que resultaron ser ligeramente superiores a lo descrito en la mayoría de

los trabajos. Como ejemplos podríamos nombrar a Seth en 2010<sup>175</sup> que refiere un incremento del 5.9% a los 3 años de la terapia o Fischer-Rasokat en 2009<sup>169</sup> que muestra una mejoría del 3.2% a los 12 meses. En cuanto a resultados a más largo plazo como es nuestro caso, tenemos poco con lo que poder comparar, salvo el trabajo publicado por Vrtovec en 2013<sup>182</sup>. En su serie la terapia administrada estaba compuesta sólo por células CD34+ movilizadas y estimuladas con G-CSF a sangre periférica. Aún así también consiguieron unos resultados aceptables, obteniendo una ganancia neta de FE del 5.7%; los eventos adversos a 5 años fueron: de 110 pacientes (55 del grupo experimental y 55 del grupo control), 27 murieron (25%), 13 por IC y 14 por muerte súbita de origen cardíaco; el grupo control presentó mayor mortalidad a largo plazo (35%) en relación al grupo de células madre (14%) y 9 pacientes (8%) precisaron ser trasplantados. Así, proporcionalmente, los sujetos de nuestra serie mostraron una evolución global algo mejor a la que nos muestra este autor. Probablemente, el tipo de células infundidas, la dosis empleada y la vía de administración puedan influir en el resultado final. Lo que parece claro, es que la evolución “natural” de este tipo de pacientes es hacia el empeoramiento progresivo de la función ventricular como ocurre en el grupo control de los estudios de Vrtovec<sup>182</sup> y Seth<sup>175</sup>. Y lo que sí parece ser una constante, es que la mejoría de la función ventricular se produce sobre todo entre los 6 y los 24 meses tras la infusión celular, para posteriormente estabilizarse en el tiempo. Como decimos, las pocas revisiones que existen sobre este tema<sup>187-188</sup> logran unos resultados globales buenos no sólo en cuanto a incrementos en la FE, sino también en cuanto a mejoras de la calidad de vida, de los parámetros funcionales y en el test de los 6 minutos marcha, junto con reducción de la necesidad de trasplante cardíaco en el seguimiento o incluso disminución de la mortalidad (esto último algo cuestionable que sólo ha sido reportado en algunos estudios de manera aislada, pero no disponemos de criterios robustos que lo sustenten).

No todos los ensayos en los que se ha valorado la FE han mostrado resultados positivos, ya que algunos no han logrado demostrar de manera estadísticamente significativa un incremento de la FE absoluta en relación al grupo control, si bien es cierto que suelen ser muestras pequeñas casi siempre, lo que nos debe hacer pensar, que si se tratara de

---

tamaños muestrales mayores en la mayoría de ellos se podría demostrar tal diferencia significativa a favor del grupo experimental.

Por otra parte decir que, además de las diferencias fisiopatológicas que existen en los tres contextos clínicos (isquémicos agudos, crónicos y la MD idiopática) y que obviamente influye a la hora de comparar resultados debemos añadir que los métodos de evaluación de la función ventricular (ventriculografía, ecocardiografía, resonancia magnética -RMN-, tomografía computerizada o pruebas de medicina nuclear) no son siempre los mismos, lo que puede dificultarnos la interpretación de resultados<sup>63</sup>. Todos estos métodos de medida del efecto presentan diferente sensibilidad y especificidad para cuantificar de manera exacta la FE así como los volúmenes ventriculares sin olvidar la subjetividad de la medida a la que están sujetos. Algunos más que otros, como en el caso del ecocardiograma. El “gold estándar” para este propósito sigue siendo la RMN, aunque ésta está contraindicada en portadores de DAI-TRC, algo muy habitual en los candidatos a la terapia celular. Así, si vamos seleccionado trabajos expuestos en las **Tablas 1, 2 y 3** en los que el método de medida de la función cardíaca sea la RMN, nos encontramos que, en el caso del IM agudo, que fue donde más se empleó esta técnica, la media de mejoría de la FE en los diversos ensayos fue de 6.94%, mientras que los trabajos que valoraron la FE en estos casos por angiografía presentan una mejoría media de 10.5%, por ecocardiograma 8.2% y por SPECT (Medicina Nuclear) 9.7%. Por otro lado, si repasamos los datos expuestos de IM crónico, la media de mejoría de FE de los trabajos en los que se empleó RMN fue del 11%, del 9.2% en los que usaron ecocardiograma, del 6% en los que la valoraron por angiografía y del 4% de media en los que emplearon SPECT, la técnica menos usada en esta serie. Y por último, de los ensayos sobre MD idiopática recogidos, nos encontramos que los que utilizaron RMN (la técnica menos usada en estos casos) la media de incremento de la FE fue del 6.5%, un 6.45% en los que emplearon ecocardiograma (la prueba más utilizada) y un 6% en los que emplearon la angiografía, encontrando así en este escenario clínico la mayor uniformidad en cuanto a resultados obtenidos en diversos trabajos a pesar de los diferentes métodos de medida empleados<sup>175</sup>; aunque esta comparativa no sea estadísticamente significativa, sí sirve para hacernos una idea de la distinta magnitud del

---

efecto que podemos obtener así como su precisión, según qué método de medida estemos empleando.

Otra dificultad añadida a la hora de comparar resultados entre estudios es que en ocasiones los metaanálisis o revisiones que los reportan, muestran para un mismo trabajo, discrepancias en los resultados en cuanto a mejorías de la FE<sup>289</sup>. Aún así podemos decir que, a pesar de disponer de mayor experiencia y aplicabilidad de la terapia en el infarto agudo, los resultados en cuanto a mejoría de la FE, la variable fundamental, en los 3 contextos clínicos, son bastante superponibles. Para resolver todas estas incógnitas deberemos disponer de más estudios, con mayor tamaño muestral y mayores seguimientos, algo complicado al ser una terapia supeditada hoy por hoy sólo a ensayos clínicos con criterios de inclusión y exclusión bastante estrictos<sup>275</sup>.

## **5.2 Evolución de los respondedores y no respondedores en el seguimiento**

En otro artículo publicado por este grupo de trabajo ya se había empleado el término de “respondedores” y de “no respondedores”<sup>145</sup>; se consideró a los “no respondedores” los que obtuvieron, tras 6 meses desde la administración de la terapia con células madre, una ganancia neta de la FE menor del 3% o bien sufrieron empeoramiento de la misma, mientras que los “respondedores” incrementaron la FE en más del 3% respecto a la basal (tomando el mismo punto de corte que el TOPCARE-AMI de Schachinger<sup>67</sup> en 2004). Medimos así la capacidad de respuesta al tratamiento con progenitores hematopoyéticos y en nuestro caso se consideraron “respondedores” a la terapia a 21 de los 27 pacientes incluidos en el ensayo (78%) con una ganancia media de la FE del  $14 \pm 7\%$  a los 6 meses, mientras que 6 pacientes de los 21 (22%) los consideramos “no respondedores”, sin mejoría significativa de la FE o incluso empeoramiento en algunos casos, obteniéndose una ganancia media de  $-5 \pm 3\%$ . Aunque es verdad que esta respuesta pudiera ser debida al propio efecto del tratamiento farmacológico de la IC, también es cierto que estos enfermos presentaban una situación estable previa a la inclusión.



De los 21 “respondedores” iniciales, la mayoría de ellos (14 pacientes), no sólo han sobrevivido sino que se han mantenido libres de eventos en el seguimiento, comprobándose, como la mejoría inicial se mantiene generalmente a lo largo del tiempo. Hay 7 enfermos que se consideraron “respondedores” en un principio pero que sí que han sufrido algún evento en el seguimiento. De los 6 pacientes “no respondedores” iniciales, casi todos ellos (5 pacientes) han presentado eventos mayores al seguimiento. Podemos decir pues que el 52% de los que fueron “respondedores” a la terapia a los 6 meses estuvieron libres de eventos mientras que tan solo el 17% de los “no respondedores” a los 6 meses se encontraron libres de eventos a los 5 años. En cuanto a la supervivencia de ambos grupos, fue un 83% de los “respondedores” iniciales y tan solo un 71% de los “no respondedores” iniciales (si bien esta última relación no resultó estadísticamente significativa). Una vez más se confirma que la FE condiciona la evolución clínica de este tipo de pacientes. En el caso de los “no respondedores”, el comportamiento termina siendo como los grupos control de otros ensayos<sup>182</sup>, es decir, un progresivo empeoramiento de la función ventricular con el paso del tiempo.

### 5.3 Factores predictores de respuesta a largo plazo

Los pacientes que no presentaron eventos al seguimiento son aquellos que partían de un **grado funcional basal mejor** y que, a su vez, resultaron ser significativamente **más jóvenes**, al igual que ocurría con los “respondedores” iniciales. La edad sigue siendo un factor predictor muy potente de buen resultado a largo plazo. Es conocido que puede influir en la funcionalidad de la MO, probablemente porque el contenido en grasa de ésta aumenta con el paso de los años y a su vez va disminuyendo el número de células madre y de unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CFUs), así como las células circulantes CD34+ KDR+ y CD133 y los niveles en sangre de SDF-1 y IGF-1<sup>290</sup>. Tras analizar los datos que nos reportaba el ecocardiograma basal, se comprobó que el grupo que no presentó eventos tenía un **volumen sistólico medio basal menor** así como una **FE ventricular izquierda mayor**. En la evaluación hemodinámica basal, los pacientes que no sufrieron eventos tenían una **mayor FE**

---

**ventricular izquierda** tanto en **el latido sinusal** como en **el postextrasistólico**, así como un **volumen diastólico menor**. Y aunque inicialmente pudimos observar una tendencia hacia la mejoría de la función ventricular en mayor cuantía en aquellos sujetos que presentaban peor FE basal, sin embargo, presentaron menos eventos al seguimiento tardío los que partían de una FE basal mayor. En nuestra serie, no hubo diferencias de respuesta tardía a la terapia en cuanto al género, factores de riesgo cardiovascular o valores analíticos basales. Tampoco hubo relación con las características biológicas del “caldo celular” infundido, pues aunque en nuestros pacientes inicialmente mejoraron más los que presentaban una capacidad migratoria disminuida de las células infundidas, en el seguimiento a largo plazo no influyó en que sufrieran o no eventos.

Sin embargo, en otras series, tanto de pacientes isquémicos<sup>62,86,92,133,145</sup> como no isquémicos<sup>180</sup>, se observa que el hecho de tener una peor FE basal condiciona mayor ganancia de la misma. Y se ha descrito en algún trabajo más que el presentar un VTD índice más elevado predice peores resultados tras varios meses de seguimiento<sup>78</sup>. Aunque a nosotros no nos condicionó la respuesta, la presencia de diabetes mellitus, hipertensión o tabaquismo se han mostrado en algunos trabajos como condicionantes de la reducción de movilización de células madre<sup>207,291</sup>. Se ha estudiado que niveles altos de **HDL colesterol** suprimen la proliferación de células madre hematopoyéticas<sup>292</sup> así como la formación de colonias celulares<sup>293</sup> y que su concentración sanguínea está relacionada con el número de células progenitoras endoteliales circulantes<sup>294</sup>. Existen también teorías totalmente opuestas que nos hablan del papel beneficioso de esta partícula en la reparación endotelial<sup>295</sup> y se ha considerado que bajos niveles plasmáticos de HDL colesterol es un indicador de disfunción endotelial<sup>296</sup> además de las propiedades beneficiosas antioxidativas y antitrombóticas<sup>297-298</sup>, antiinflamatorias<sup>299</sup> e inmunomoduladoras<sup>300</sup> que posee. Incluso se ha referido que presentar bajos niveles de HDL pueden favorecer procesos neoplásicos<sup>301</sup>. Aunque en nuestra serie de pacientes inicialmente intuíamos que mejoraban más los que presentaban niveles de HDL en suero menores, dicha asociación no se comprobó en el seguimiento.

Podemos decir también que existe disparidad de opiniones sobre qué **estirpe celular** es la mejor según cada contexto clínico, que propiedades debe poseer, su mecanismo exacto de actuación o cuál es el mejor momento para administrarlas en la evolución natural de la enfermedad. En este sentido, hay pocos trabajos que comparen tipos celulares y los que lo han hecho no se han decantado por ninguno en particular. Las más empleadas, al igual que las que se usaron en nuestro trabajo, son las mononucleadas autólogas de MO y sobre esas se basan la mayoría de los trabajos y las que más información nos han reportado<sup>67,74,92,102,116,161,175,180</sup>. Se han documentado incrementos de la FE en el IM agudo<sup>67,69,81,84,91,113,138</sup>, y en el crónico<sup>123,125,132,133,139,142,146</sup>, al igual que se ha hecho con diversas series de MD idiopática<sup>166,171,174,179-180</sup> sin diferencia entre tipos celulares; concretamente en el caso del origen idiopático de la MD se han comparado los tipos más frecuentes (células mesenquimales y mononucleares hematopoyéticas, ambas de MO), con similar eficacia<sup>163,302</sup>. La razón de la gran variedad de efectos encontrados puede en parte estar condicionada por la diferente metodología de preparación de células. Ésto puede modificar su viabilidad o por diferencias en el precondicionamiento isquémico durante la infusión de las células, lo que representa un requisito importante para la migración celular inducida por dicha isquemia provocada de manera natural o mediante la técnica de inflado de balón. Según nuestros resultados seguimos sin saber bien qué estirpe celular tiene mayor influencia sobre la mejoría de la FE ventricular izquierda en estos enfermos.

También debemos comentar que la **capacidad migratoria en 24 horas** de la suspensión celular a VEGF y a SDF-1 (factor 1 derivado del estroma), ha resultado estar significativamente disminuida en muchos sujetos que responden a la terapia en diferentes series de MD no isquémica<sup>169</sup>. Las células de la MO que pueden migrar en 24 horas son casi todas maduras, mientras que las células madre inmaduras necesitan varios días para migrar. Por todo esto se podría deducir que una mayor proporción de células indiferenciadas sin capacidad migratoria pudieran conseguir un mayor beneficio funcional. A esta misma conclusión se llegó por parte de nuestro grupo en pacientes con IM crónico<sup>145</sup> donde analizando los factores biológicos que pudieran condicionar mejor

---

resultado, se observó que a mayor migración de las células infundidas a SDF1 y VEGF, menor recuperación funcional presentaban los sujetos.

Otra causa de las diferencias encontradas pudiera estar en la **dosis administrada**<sup>63</sup>. La mayoría de los autores coinciden en que administrar más de 40 millones o incluso una cantidad mayor a 100 millones está relacionado con incrementos en la FE<sup>207</sup>. Hay quienes refieren que es mejor administrar grandes dosis concretamente de células CD34+, por presentar aparentemente mayor capacidad de cardiomiogénesis y vasculogénesis, obteniéndose a mayor dosis un mayor beneficio<sup>105,303</sup> basados en la teoría que si tras un IM agudo se liberan citoquinas G-CSF, SCF, VEGF y SDF-1 que atraen a las células madre CD34+ de manera natural al miocardio y ello contribuye a la génesis de tejido y a prevenir la apoptosis<sup>304-306</sup>, por todo ello, administrarlas de manera “artificial” supondría un beneficio añadido. Hay autores que postulan que la presencia de bajos niveles de estas células CD34+ se asocian incluso a eventos cardíacos y a muerte de causa cardiovascular<sup>53,149,307</sup>. Sin embargo, nuestro grupo no encontró diferencias de resultado en cuanto al número de CD34+ infundidas ni en cardiopatía isquémica<sup>81</sup> al igual que les ocurre a otros autores<sup>92</sup> ni en nuestro trabajo actual, en MD no isquémica<sup>281</sup>. A pesar de esta discusión, para muchos, el número total de células infundidas y la capacidad de migración ex vivo de las mismas parece estar estrechamente relacionado con efectos beneficiosos sobre remodelado ventricular izquierdo, manifestándose en la reducción del volumen ventricular y del tamaño del infarto. También contribuye a ello el rescate del miocardio hibernado, la reducción de la fibrosis miocárdica y el cese de la apoptosis de los miocardiocitos del área periinfarto añadido a la mejoría de la función ventricular debido a la transdiferenciación de los progenitores celulares en miocardiocitos. Un requisito para favorecer todo esto es el adecuado anidamiento de las células en la zona deseada (homing), quizás más difícil de verificar cuando se utiliza la vía intracoronaria o endovenosa<sup>66</sup>. Por otro lado decir que aunque se suele utilizar dosis única, algunos autores han apostado incluso por administrar dosis repetidas de células madre, alguno con buen resultado<sup>95</sup>, otros, sin conseguir aumentar la FE de manera distinta a la administración de un sola dosis<sup>137</sup>. También señalar que casi no ha sido comparado el efecto de las células madre autólogas

---

frente a las alogénicas, quizás porque estas últimas apenas se utilizan, si bien están comenzando a plantearse estudios con tal propósito<sup>266</sup> aunque no dispongamos de resultados al respecto todavía.

Otro motivo de las diferencias encontradas pudiera estar en la **vía de administración** empleada (con las ventajas e inconvenientes que presenta cada una como bien se expuso en un apartado anterior), que pudiera condicionar en algunos casos insuficiente acceso a la zona fronteriza entre el infarto y el tejido no afectado en el caso de la cardiopatía isquémica o una falta de anidamiento en el miocardio o pérdida sistémica de células. Algunos autores, en casos de IM crónico han comparado dos vías diferentes, como la intracoronaria y la intramiocárdica, y no han encontrado diferencias en cuanto a resultados de función ventricular se refiere<sup>62</sup>. A pesar de estas incógnitas la vía más empleada es la intracoronaria, sin documentarse complicaciones significativas y con aceptables resultados.

Además se ha pensado si será cuestión de **tiempo** o no, es decir, si el momento de administrar este tipo de tratamiento en la evolución de la enfermedad es importante; hay discusiones sobre el tiempo que debe transcurrir entre el IM agudo y la administración de la terapia, según algunos trabajos, tras un IM extenso, además del tratamiento médico óptimo y la revascularización precoz de la arteria responsable, en aquellos casos con disfunción ventricular izquierda, administrar a partir del sexto día postinfarto, concretamente dentro de los 7 primeros días desde el IM agudo, una gran cantidad de células madre progenitoras hematopoyéticas directamente en la arteria coronaria en cuestión resulta beneficioso<sup>81,145,207</sup>. Pero también sabemos, en el caso del IM, que además de un tiempo entre la revascularización y la administración de los progenitores más corto, la propia revascularización precoz se asocia a mayor recuperación funcional<sup>92,205</sup> lo que pudiera actuar como factor de confusión a la hora de interpretar resultados. Es conocido que el estado inflamatorio que se crea en el miocardio tras el evento agudo favorece la liberación de citoquinas y otros factores quimiotácticos que atraen y favorecen el depósito celular<sup>247,308</sup> del 4º al 7º día en adelante, por transdiferenciación y anidamiento junto con un efecto paracrino de las células

---

infundidas traduciéndose esto en incrementos en la FE<sup>58,207</sup> y que el hecho de infundir las células madre en los primeros 1-2 días tras un IM puede hacer peligrar el resultado dada la inflamación local que crea un ambiente hostil para las células inyectadas, obteniéndose el mayor beneficio pues, con una infusión algo más tardía<sup>74</sup>. Además se ha estudiado que es en torno al día 7 cuando se produce la mayor parte de la angiogénesis postinfarto y una vez pasado el día 20, la mayoría de nuevos vasos ya están formados<sup>64</sup> por lo que administrar las células madre en ese momento contribuiría de una forma más eficaz a este proceso que ya se está produciendo de manera natural. Hay, como en casi todo lo que rodea al empleo de la terapia regenerativa en cardiopatías, opositores a esa creencia, que postulan que dada la presencia de las citoquinas liberadas en el IM agudo (como VEGF, HGF, G-CSF y sobre todo la VEGF que es la que más puede contribuir a la revascularización, a la reducción de la inflamación o al efecto sobre el remodelado) expresadas entre el día 1 y el día 4 tras el IM, sería justo ese el momento idóneo para la administración de las células madre<sup>75</sup>, siendo esta teoría como decimos, la menos aceptada.

El momento idóneo de infusión de la terapia celular en el caso de MD idiopática tampoco está acordado, aunque parece lógico pensar que a menor tiempo de evolución de la enfermedad mejores resultados se podrán obtener debido a que se trataría de ventrículos menos remodelados y con menor fibrosis y por tanto ésta sería más fácil de revertir, aunque esa variable no se ha considerado en nuestro análisis, sería interesante discernir entre MD de larga y de corta evolución. Lo que sí conocemos es que de producirse, la mejoría obtenida tras administrar este tipo de tratamiento, medida en términos de incrementos de la FE fundamentalmente, se consigue en los primeros 6 meses y el efecto tiende a mantenerse en el tiempo al igual que ocurre con la MD isquémica<sup>205,309</sup>. El trabajo de Vrtovec en 2013<sup>182</sup>, el más superponible al nuestro, sólo logró demostrar asociación entre la respuesta a las células administradas el hecho de presentar un mayor anidamiento o “homing” intramiocárdico (para lo cual marcaban dichas células previamente a la infusión y se comprobaba después mediante SPECT cual era su localización exacta), sin haberse encontrado en este trabajo, a pesar del gran tamaño

---

muestral y del largo seguimiento realizado, otros factores relacionados con el efecto de la terapia.

Seguimos sin conocer realmente cuáles son los factores condicionantes del incremento y sobre todo del posterior mantenimiento de la FE ni tan sólo con el tratamiento médico óptimo<sup>18</sup> y menos aún tras la terapia regenerativa con células madre, para lo cual será necesario más investigaciones en este campo. Para poder extraer más conclusiones al respecto en nuestro medio habitual, nuestro grupo está inmerso en nuevos ensayos clínicos de diversa índole, por un lado el llamado *“Ensayo Clínico Fase II sobre el Efecto de la Infusión Intracoronaria de Células Mononucleadas de Médula Ósea Sobre la Recuperación Funcional en Pacientes con Infarto Crónico Anterior y Depresión Severa de la Función Ventricular Izquierda; también está en marcha el “Ensayo clínico fase III, unicéntrico, abierto, controlado y aleatorizado para valorar la eficacia de la infusión intracoronaria de células mononucleares de médula ósea autóloga en pacientes con oclusión coronaria crónica y disfunción ventricular previamente revascularizados”* y por otro, el que estamos realizando con la colaboración de varios hospitales andaluces más, *“Ensayo clínico multicéntrico fase III, doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo para evaluar la eficacia de la infusión intracoronaria de células mononucleares troncales adultas de médula ósea no expandidas sobre la recuperación funcional en pacientes con miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca”*, a partir de los cuales obtendremos información útil que sirva para continuar estudiando el perfil clínico-biológico idóneo para obtener el máximo beneficio de esta innovadora terapia.

## **6. Conclusiones**



- El 56 % de los pacientes con MD no isquémica tratados con terapia celular permanecen en grado funcional I o II de la NYHA y libres de eventos adversos mayores a los 5 años de seguimiento.
- El beneficio obtenido inicialmente se mantuvo en el seguimiento a largo plazo en términos de ganancia de FE, reducción de los volúmenes ventriculares, reducción de la insuficiencia mitral y descenso de los niveles plasmáticos de BNP.
- Los pacientes más jóvenes, en mejor situación clínica, con diámetros ventriculares menores y mayor FE ventricular izquierda basal presentaron una mejor evolución clínica en el seguimiento tardío.
- En los “respondedores” a la terapia la ganancia media neta fue del 12 %, mientras que en los “no respondedores” la FE no mejoró o incluso empeoró.
- No hubo efectos adversos directamente relacionados con la infusión intracoronaria de progenitores hematopoyéticos de MO.
- La infusión intracoronaria de progenitores hematopoyéticos de MO es una terapia segura que provoca mejoría de la función ventricular izquierda y mejoría clínica en más de la mitad de los pacientes.

## **7. Bibliografía**

**7. Bibliografía**

1. Mendis SPP, Puska P, Norrving B. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. Geneva: World Health Organization, 2011.
2. Braunwald E. Cardiology: how did we get here, where are we today and where are we going? *Can J Cardiol.* 2005;21:1015-7.
3. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation.* 2006;113:1807-16.
4. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J.* 2008; 29:270-6.
5. Elkayam U, Akhter MW, Singh H, Khan S, Bitar F, Hameed A, et al. Pregnancy associated cardiomyopathy. Clinical characteristics and a comparison between early and late presentations. *Circulation.* 2005;111:2050-5.
6. Felker GM, Thompson RE, Hare JM, Hruban RA, Clemetson DE, Howard DL, et al. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2000;342(15):1077-84.
7. Burkett EL, Hershberger RE. Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:969-81.
8. Dec GM, Fuster V. Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1994;331:1564-75.

- 
9. Mestroni L, Maisch B, McKenna WJ, Schwartz K, Charron P, Rocco C, et al. Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 1999;20:93-102.
  10. Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, et al. Heart disease and stroke statistics - 2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2008;117:e25-e1.
  11. Gavazzi A, Lanzarini L, Cornalba C, Desperati M, Raisaro A, Angoli L et al. Dilated (congestive) cardiomyopathy. Follow up study 137 patients. *G Ital Cardiol*. 1984;14(7):492-8.
  12. The Criteria Committee of the New York Heart Association. Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels (9th ed). Boston: Little, Brown & Co. 1994;253-6.
  13. Stevenson LW, Massie BM, Francis GS. Optimizing therapy for complex or refractory heart failure: a management algorithm. *Am Heart J*. 1998;135(6 Pt 2 Su):293-309.
  14. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldmann AM, Francis GS, Ganiats TG, et al. American College of Cardiology; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; American College of Chest Physicians; International Society for Heart and Lung Transplantation; Heart Rhythm Society. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation*. 2005;112(12):154-235.

- 
15. Barretto AC, Del Carlo CH, Cardoso JN, Morgado PC, Munhoz RT, Eid MO, et al. Re-hospitalizações e morte por insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol.* 2008;91(5):335-41.
  16. Bacal F, Souza-Neto JD, Fiorelli AI, Mejia J, Marcondes-Braga FG, Mangini S. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. II Diretriz brasileira de transplante cardíaco. *Arq Bras Cardiol.* 2009;94(1 supl.1):16-73.
  17. Wong CM, Hawkins NM, Petrie MC, Jhund PS, Gardner RS, Aritj CA et al. Heart failure in younger patients: the Meta-analysis Global Group in Chronic Heart Failure (MAGGIC). *Eur Heart J.* 2014;35(39):2714-21.
  18. Merlo M, Pivetta A, Pinamonti B, Stolfo D, Zecchin M, Barbati G et al. Long-term prognostic impact of therapeutic strategies in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: changing mortality over the last 30 years. *Eur J Heart Fail.* 2014;16(3):317-24.
  19. The CONSENSUS Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med.* 1987;316:1429-35.
  20. Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R, Martinez FA, Dickstein K, Camm AJ, et al. Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomized trial-the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet.* 2000;355:1582-7.
  21. Packer M, Fowler MB, Roecker EB, Coats AJ, Katus HA, Krum H, et al. Effect of carvedilol on the morbidity of patients with severe chronic heart failure: results of the carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) study. *Circulation.* 2002;106:2194-9.
  22. Poole-Wilson PA, Swedberg K, Cleland JG, Di Lenarda A, Hanrath P, Komajda M, et al. Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with

---

chronic heart failure in the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET): randomised controlled trial. *Lancet*. 2003;362:7-13.

23. Allen LA, Felker GM, Pocock S, McMurray JJ, Pfeffer MA, Swedberg K, et al. Liver function abnormalities and outcome in patients with chronic heart failure: data from the Candesartan in Heart Failure: Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity (CHARM) program. *Eur J Heart Fail*. 2009;11:170-7.

24. Hood WB Jr, Dans AL, Guyatt GH, Jaeschke R, McMurray JJ. Digitalis for treatment of congestive heart failure in patients in sinus rhythm: a systematic review and meta-analysis. *J Card Fail*. 2004;10:155-64.

25. Swedberg K, Komajda M, Bohm M, Borer JS, Ford I, Dubost-Brama A, et al. Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): a randomised placebo-controlled study. *Lancet*. 2010;376:875-85.

26. Morimoto S, Lu QW, Harada K, Takahashi-Yanaga F, Minakami R, Ohta M, et al. Ca<sup>2+</sup>-desensitizing effect of a deletion mutation Delta K210 in cardiac troponin T that causes familial dilated cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:913-8.

27. Lu QW, Morimoto S, Harada K, Du CK, Takahashi-Yanaga F, Miwa Y, et al. Cardiac troponin T mutation R141W found in dilated cardiomyopathy stabilizes the troponin T-tropomyosin interaction and causes a Ca<sup>2+</sup> desensitization. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35:1421-7.

28. Rajan S, Ahmed RP, Jagatheesan G, Petrashevskaya N, Boivin GP, Urboniene D, et al. Dilated cardiomyopathy mutant tropomyosin mice develop cardiac dysfunction with significantly decreased fractional shortening and myofilament calcium sensitivity. *Circ Res*. 2007;101:205-10.

29. Cleland JG, Daubert JC, Erdmann E, Freemantle N, Gras D, Kappenberger L et al. The CARE-HF Study (Cardiac Resynchronization in Heart Failure Study): rationale, design and end-points. *Eur J Heart Fail*. 2001;3(4):481-9.

- 
30. Brignole M, Auricchio A, Barón-Esquivias G, Bordachar P, Boriani G, Breithardt OA et al. Guía de práctica clínica de la ESC 2013 sobre estimulación cardíaca y terapia de resincronización cardíaca. *Rev Esp Cardiol.* 2014;67(1):58-60.
31. Almendral J, Pombo M, Martínez-Alday J, González-Rebollo JM, Rodríguez-Font E, Martínez-Ferrer J, et al. Novedades en arritmias y estimulación cardíaca en 2013. *Rev Esp Cardiol.* 2014;67(4):294-304.
32. Banner NR, Bonser RS, Clark AL, Clark S, Cowburn PJ, Gardner RS, et al. UK guidelines for referral and assessment of adults for heart transplantation. *Heart.* 2011;97:1520-7.
33. Mehra MR, Kobashigawa J, Starling R, Russell S, Uber PA, Parameshwar J, et al. Listing criteria for heart transplantation: International Society for Heart and Lung Transplantation guidelines for the care of cardiac transplant candidates—2006. *J Heart Lung Transplant.* 2006;25:1024-42.
34. Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Doubles F, Kirk R, et al. The Registry of the International Society of Heart and Lung Transplantation: Twenty-eighth Adult Heart Transplantation Report 2011. *J Heart Lung Transplant.* 2011;30:1078-94.
35. Liebson PR. Stem-cell angiogenesis and regeneration of the heart: review of a saga of 2 decades. *Clin Cardiol.* 2015;38(5):309-16.
36. Chiu RC, Zibaitis A, Kao RL. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg.* 1995;60:12-8.
37. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Zhang J, Mohabeer MK, et al. Cardiomyocyte transplantation improves heart function. *Ann Thorac Surg.* 1996;62:654-60.
38. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Merante F, Mickle DA. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31:513-22.

- 
39. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med.* 1998;4:929-33.
40. Watanabe E, Smith DM Jr, Delcarpio JB, Sun J, Smart FW, Van Meter CH Jr, et al. Cardiomyocyte transplantation in a porcine myocardial infarction model. *Cell Transplant.* 1998;7:239-46.
41. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287:2670-6.
42. Kondoh H, Sawa Y, Miyagawa S, Sakakida-Kitagawa S, Memon IA, Kawaguchi N, et al. Longer preservation of cardiac performance by sheet-shaped myoblast implantation in dilated cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc Res.* 2006;69:466-75.
43. Yamada S, Nelson TJ, Crespo-Diaz RJ, Perez-Terzic C, Liu XK, Miki T, et al. Embryonic stem cell therapy of heart failure in genetic cardiomyopathy. *Stem Cells.* 2008;26:2644-53.
44. De Angelis A, Piegari E, Cappetta D, Marino L, Filippelli A, Berrino L, et al. Anthracycline cardiomyopathy is mediated by depletion of the cardiac stem cell pool and is rescued by restoration of progenitor cell function. *Circulation.* 2010;121:276-92.
45. Yoo KJ, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Jia ZQ, Kim EJ, et al. Heart cell transplantation improves heart function in dilated cardiomyopathic hamsters. *Circulation.* 2000;102:III-204-III-9.
46. Pouly J, Hagege AA, Vilquin JT, Bissery A, Rouche A, Bruneval P, et al. Does the functional efficacy of skeletal myoblast transplantation extend to nonischemic cardiomyopathy? *Circulation.* 2004;110:1626-31.
47. Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Voitowicz V, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, et al. Simultaneous autologous transplantation of cocultured mesenchymal stem cells



---

and skeletal myoblasts improves ventricular function in a murine model of Chagas disease. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):I 120-4.

48. Suzuki K, Murtuza B, Suzuki N, Smolenski RT, Yacoub MH. Intracoronary infusion of skeletal myoblasts improves cardiac function in doxorubicin-induced heart failure. *Circulation*. 2001;104:I-213-I-7.

49. Baba S, Heike T, Yoshimoto M, Umeda K, Doi H, Iwasa T, et al. Flk1(+) cardiac stem/progenitor cells derived from embryonic stem cells improve cardiac function in a dilated cardiomyopathy mouse model. *Cardiovasc Res*. 2007;76:119-31.

50. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2005;112:1128-35.

51. Yu Q, Li Q, Na R, Li X, Liu B, Meng L, et al. Impact of repeated intravenous bone marrow mesenchymal stem cells infusion on myocardial collagen network remodeling in a rat model of doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem*. 2014;387:279-85.

52. Hata H, Matsumiya G, Miyagawa S, Kondoh H, Kawaguchi N, Matsuura N, et al. Grafted skeletal myoblast sheets attenuate myocardial remodeling in pacing-induced canine heart failure model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006;132:918-24.

53. Werner L, Deutsch V, Barshack I, Miller H, Keren G, George J. Transfer of endothelial progenitor cells improves myocardial performance in rats with dilated cardiomyopathy induced following experimental myocarditis. *J Mol Cell Cardiol*. 2005; 39:691-7.

54. Kondoh H, Sawa Y, Fukushima N, Matsumiya G, Miyagawa S, Kitagawa-Sakakida S, et al. Reorganization of cytoskeletal proteins and prolonged life expectancy caused by hepatocyte growth factor in a hamster model of late-phase dilated cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;130:295-302.

- 
55. Kondoh H, Sawa Y, Miyagawa S, Sakakida-Kitagawa S, Memon IA, Kawaguchi N, et al. Longer preservation of cardiac performance by sheet-shaped myoblast implantation in dilated cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc Res*. 2006;69:466-75.
56. Kondoh H, Sawa Y, Fukushima N, Matsumiya G, Miyagawa S, Kitagawa-Sakakida S, et al. Combined strategy using myoblasts and hepatocyte growth factor in dilated cardiomyopathic hamsters. *Ann Thorac Surg*. 2007;84:134-41.
57. Mu Y, Cao G, Zeng Q, Li Y. Transplantation of induced bone marrow mesenchymal stem cells improves the cardiac function of rabbits with dilated cardiomyopathy via upregulation of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011;236(9):1100-7.
58. Zhang Y, Chu Y, Shen W, Dou Z. Effect of 5-azacytidine induction duration on differentiation of human first-trimester fetal mesenchymal stem cells towards cardiomyocyte-like cells. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2009;9(6):943-6.
59. Ling SK, Wang R, Dai ZQ, et al: Treatment of rat bone marrow mesenchymal stem cells with a combination of hypergravity and 5-azacytidine enhances therapeutic efficacy for myocardial infarction. *Biotechnol Prog*. 2011;27(2):473-82.
60. Yang S, Piao J, Jin L, Zhou Y. Does pretreatment of bone marrow mesenchymal stem cell with 5-azacytidina or double intravenous infusion improve their therapeutic potential for dilated cardiomyopathy? *Med Sci Monit Basic Res*. 2013;19:20-31.
61. Tao B, Cui M, Wang C, Ma S, Wu F, Yi F, et al. Percutaneous Intramyocardial Delivery of Mesenchymal Stem Cells induces Superior Improvement in Regional Left Ventricular Function Compared with Bone Marrow Mononuclear Cells in Porcine Myocardial Infarcted Heart. *Theranostics*. 2015; 5(2):196-205.
62. Jeevanantham V, Butler M, Saad A, Abdel-Latif A, Zuba-Surma EK, Dawn B. Adult bone marrow cell therapy improves survival and induces long-term improvement in cardiac parameters: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2012;126:551-68.

- 
63. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, et al. Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction. *Dtsch Med Wochenschr.* 2001;126(34-35):932-8.
64. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, 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.
65. Assmus B, Schachinger V, Teupe, 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.
66. Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, et al. Infarct Remodeling After Intracoronary Progenitor Cell Treatment in Patients with Acute Myocardial Infarction (TOPCARE AMI). Mechanistic Insights From Serial Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Circulation.* 2003;108:2212-8.
67. Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI trial. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1690-9.
68. Fernández-Avilés F, San Román JA, García-Frade J, Fernández ME, Peñarubia MJ, de la Fuente L, et al. Experimental and Clinical Regenerative Capability of Human Bone Marrow Cells After Myocardial Infarction. *Circ Res.* 2004;95(7):742-8.
69. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2004;94:92-5.
70. 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 BOOSTandomised controlled clinical trial. *Lancet.* 2004;364(9429):141-8.

- 
71. Ruan W, Pan CZ, Huang GQ, Li YL, Ge JB, Shu XH. Assessment of left ventricular segmental function after autologous bone marrow stem cells transplantation in patients with acute myocardial infarction by tissue tracking and strain imaging. *Chin Med J (Engl)*. 2005;118(14):1175-81.
72. 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;112:1178-83.
73. 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.
74. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, et al. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J*. 2006;27:2775-83.
75. Ge J, Li Y, Qian J. Efficacy of emergent transcatheter transplantation of stem cells for treatment of acute myocardial infarction (TCT-STAMI). *Heart*. 2006;92:1764-7.
76. Kang HJ, Lee HY, Na SH, Chang SA, Park KW, Kim HK, et al. Differential effect of intracoronary infusion of mobilized peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor on left ventricular function and remodelling in patients with acute myocardial infarction versus old myocardial infarction: the MAGIC CELL-3-DES randomized, controlled trial. *Circulation*. 2006;114:1145-51.
77. Meluzin J, Mayer J, Groch L, Janousek S, Hornáček I, Hlinomaz O, et al. Autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction: the effect of the dose of transplanted cells on myocardial function. *Am Heart J*. 2006;152:975e9-15.

- 
78. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (Bone Marrow Transfer to Enhance ST-Elevation Infarct Regeneration) trial. *Circulation*. 2006;113:1287-94.
79. Huang RC, Yao K, Zou YZ, Ge L, Qian JY, Yang J. Long term follow up on emergent intracoronary autologous bone marrow mononuclear cell transplantation for acute inferior-wall myocardial infarction. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2006;86(16):1107-10.
80. 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.
81. Suárez de Lezo J, Herrera C, Pan M, Romero M, Pavlovic DJ, Segura J, et al. Tratamiento regenerativo en pacientes con infarto agudo anterior revascularizado y función ventricular deprimida. *Rev Esp Cardiol*. 2007;60:357-65.
82. Penicka M, Horak J, Kobylka P, Pytlik R, Kozak T, Belohlavek O, et al. Intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction: a prematurely terminated randomized study. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:2373-4.
83. Li ZQ, Zhang M, Jing YZ, Zhang WW, Liu Y, Cui LJ, et al. The clinical study of autologous Peripherals blood stem cell transplantation by intracoronary infusión in patients with acute myocardial infarction (AMI). *Int J Cardiol*. 2007;115(1):52-6.
84. Choi JH, Choi J, Lee WS, Rhee I, Lee SC, Gwon HC, et al. Lack of additional benefit of intracoronary transplantation of autologous peripheral blood stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Circ J*. 2007;71(4):486-94.
85. Tatsumi T, Ashihara E, Yasui T, Matsunaga S, Kido A, Sasada Y, et al. Intracoronary transplantation of non-expanded peripheral blood-derived mononuclear cells promotes

---

improvement of cardiac function in patients with acute myocardial infarction. *Circ J*. 2007;71(8):1199-207.

86. Huikuri HV, Kervinen K, Niemelä M, Ylitalo K, Säily M, Koistinen P, et al. Effects of intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells on left ventricular function, arrhythmia risk profile, and restenosis after thrombolytic therapy of acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2008;29(22):2723-32.

87. Lunde K, Solheim S, Forfang K, Arnesen H, Brinch L, Bjørnerheim R, et al. Anterior myocardial infarction with acute percutaneous coronary intervention and intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells: safety, clinical outcome, and serial changes in left ventricular function during 12-months' follow-up. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(6):674-6.

88. Herbots L, D'hooge J, Eroglu E, Thijs D, Ganame J, Claus P, et al. Improved regional function after autologous bone marrow-derived stem cell transfer in patients with acute myocardial infarction: a randomized, double-blind strain rate imaging study. *Eur Heart J*. 2009;30(6):662-70.

89. Nogueira FB, Silva SA, Haddad AF, Peixoto CM, Carvalho RM, Tuche FA, et al. Systolic function of patients with myocardial infarction undergoing autologous bone marrow transplantation. *Arq Bras Cardiol*. 2009;93(4):374-9.

90. Lipiec P, Krzemińska-Pakuła M, Plewka M, Kuśmierk J, Płachcińska A, Szumiński R, et al. Impact of intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction on left ventricular perfusion and function: a 6-month follow-up gated <sup>99m</sup>Tc-MIBI single-photon emission computed tomography study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2009;36(4):587-93.

91. Plewka M, Krzemińska-Pakuła M, Lipiec P, Peruga JZ, Jezewski T, Kidawa M, et al. Effect of intracoronary injection of mononuclear bone marrow stem cells on left ventricular function in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2009;104(10):1336-42.

- 
92. Tendera M, Wojakowski W, Rużyło W, Chojnowska L, Kepka C, Tracz W, et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial. *Eur Heart J.* 2009;30(11):1313-21.
93. Dill T, Schächinger V, Rolf A, Möllmann S, Thiele H, Tillmanns H, et al. Intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells improves left ventricular function in patients at risk for adverse remodeling after acute ST-segment elevation myocardial infarction: results of the Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction study (REPAIR-AMI) cardiac magnetic resonance imaging substudy. *Am Heart J.* 2009;157(3):541-7.
94. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(24):2277-86.
95. Yao K, Huang R, Sun A, Qian J, Liu X, Ge L, et al. Repeated autologous bone marrow mononuclear cell therapy in patients with large myocardial infarction. *Eur J Heart Fail.* 2009;11(7):691-8.
96. Cao F, Sun D, Li C, Narsinh K, Zhao L, Li X, et al. Long-term myocardial functional improvement after autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: 4 years follow-up. *Eur Heart J.* 2009;30(16):1986-94.
97. Silva SA, Sousa AL, Haddad AF, Azevedo JC, Soares VE, Peixoto CM, et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell transplantation after acute myocardial infarction: comparison of two delivery techniques. *Cell Transplant.* 2009;18(3):343-52.
98. Yousef M, Schannwell CM, Köstering M, Zeus T, Brehm M, Strauer BE. The BALANCE Study: clinical benefit and long-term outcome after intracoronary

---

autologous bone marrow cell transplantation in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53(24):2262-9.

99. Castellani C, Padalino M, China P, Fedrigo M, Frescura C, Milanese O, et al. Bone-marrow-derived CXCR4-positive tissue-committed stem cell recruitment in human right ventricular remodelling. *Hum Pathol.* 2010 ;41(11):1566-76.

100. Grajek S, Popiel M, Gil L, Breborowicz P, Lesiak M, Czepczyński R, et al. Influence of bone marrow stem cells on left ventricle perfusion and ejection fraction in patients with acute myocardial infarction of anterior wall: randomized clinical trial: Impact of bone marrow stem cell intracoronary infusion on improvement of microcirculation. *Eur Heart J.* 2010;31(6):691-702.

101. Wöhrle J, Merkle N, Mailänder V, Nusser T, Schauwecker P, von Scheidt F, et al. Results of intracoronary stem cell therapy after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2010;105(6):804-12.

102. Traverse JH, McKenna DH, Harvey K, Jorgenso BC, Olson RE, Bostrom N, et al. Results of phase 1, randomized, double-blind, placebo controlled trial of bone marrow mononuclear stem cell administration in patients following STElevation myocardial infarction. *Am Heart J.* 2010;160(3):428-34.

103. Piepoli MF, Vallisa D, Arbasi M, Cavanna L, Cerri L, Mori M, et al. Bone marrow cell transplantation improves cardiac, autonomic, and functional indexes in acute anterior myocardial infarction patients (Cardiac Study). *Eur J Heart Fail.* 2010;12(2):172-80.

104. Hirsch A, Nijveldt R, van der Vleuten PA, Tijssen JG, van der Giessen WJ, Tio RA , et al. Intracoronary infusion of mononuclear cells from bone marrow or peripheral blood compared with standard therapy in patients after acute myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention: results of the randomized controlled HEBE trial. *Eur Heart J.* 2011;32(14):1736-47.



- 
105. Quyyumi AA, Waller EK, Murrow J, Esteves F, Galt J, Oshinski J, et al. CD34(+) cell infusion after ST elevation myocardial infarction is associated with improved perfusion and is dose dependent. *Am Heart J.* 2011;161(1):98-105.
106. Roncalli J, Mouquet F, Piot C, Trochu JN, Le Corvoisier P, Neuder Y, et al. Intracoronary autologous mononucleated bone marrow cell infusion for acute myocardial infarction: results of the randomized multicenter BONAMI trial. *Eur Heart J.* 2011;32(14):1748-57.
107. Traverse JH, Henry TD, Ellis SG, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DX, et al. Effect of intracoronary delivery of autologous bone marrow mononuclear cells 2 to 3 weeks following acute myocardial infarction on left ventricular function: the LateTIME randomized trial. *JAMA.* 2011;306(19):2110-9.
108. Beitnes JO, Gjesdal O, Lunde K, Solheim S, Edvardsen T, Arnesen H, et al. Left ventricular systolic and diastolic function improve after acute myocardial infarction treated with acute percutaneous coronary intervention, but are not influenced by intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells: a 3 year serial echocardiographic sub-study of the randomized-controlled ASTAMI study. *Eur J Echocardiogr.* 2011;12(2):98-106.
109. Leistner DM, Fischer-Rasokat U, Honold J, Seeger FH, Schächinger V, Lehmann R, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy. *Clin Res Cardiol.* 2011;100(10):925-34.
110. Srimahachota S, Boonyaratavej S, Rerkpattanapipat P, Wangsupachart S, Tumkosit M, Bunworasate U, et al. Intra-coronary bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with ST-elevation myocardial infarction: a randomized controlled study. *J Med Assoc Thai.* 2011;94(6):657-63.
111. Traverse JH, Henry TD, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DX, Ellis SG, et al. Effect of the use and timing of bone marrow mononuclear cell delivery on left ventricular

---

function after acute myocardial infarction: the TIME randomized trial. *JAMA*. 2012;308(22):2380-9.

112. Mäki MT, Koskenvuo JW, Ukkonen H, Saraste A, Tuunanen H, Pietilä M, et al. Cardiac Function, Perfusion, Metabolism, and Innervation following Autologous Stem Cell Therapy for Acute ST-Elevation Myocardial Infarction. A FINCELL-INSIGHT Sub-Study with PET and MRI. *Front Physiol*. 2012;3:6.

113. Turan RG, Bozdog-T I, Turan CH, Ortak J, Akin I, Kische S, et al. Enhanced mobilization of the bone marrow-derived circulating progenitor cells by intracoronary freshly isolated bone marrow cells transplantation in patients with acute myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. 2012;16(4):852-64.

114. Sürder D, Manka R, Lo Cicero V, Moccetti T, Rufibach K, Soncin S, et al. Intracoronary injection of bone marrow-derived mononuclear cells early or late after acute myocardial infarction: effects on global left ventricular function. *Circulation*. 2013 ;127(19):1968-79.

115. Lee JW, Lee SH, Youn YJ, Ahn MS, Kim JY, Yoo BS, et al. A randomized, open-label, multicenter trial for the safety and efficacy of adult mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction. *J Korean Med Sci*. 2014;29(1):23-31.

116. San Román JA, Sánchez PL, Villa A, Sanz-Ruiz R, Fernández-Santos ME, Gimeno F, et al. Comparison of Different Bone Marrow derived Stem Cell Approaches in Reperfused STEMI. A Multicenter, Prospective, Randomized, Open-Labeled TECAM trial. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(22):2372-82.

117. Stone GW, Brodie BR, Griffin JJ, Morice MC, Costantini C, St Goar FG, et al. Prospective, multicenter study of the safety and feasibility of primary stenting in acute myocardial infarction: in-hospital and 30-day results of the PAMI stent pilot trial. Primary Angioplasty in Myocardial Infarction Stent Pilot Trial Investigators. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:23-30.

- 
118. Grines CL, Cox DA, Stone GW, Garcia E, Mattos LA, Giambartolomei A, et al. Coronary angioplasty with or without stent implantation for acute myocardial infarction. Stent Primary Angioplasty in Myocardial Infarction Study Group. *N Engl J Med.* 1999;341:1949-56.
119. Keeley EC, Hillis LD. Primary PCI for myocardial infarction with ST-segment elevation. *N Engl J Med.* 2007;356:47-54.
120. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet.* 2012;379(9819):895-904.
121. Menasché P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(7):1078-83.
122. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation.* 2003;107(18):2294-302.
123. Erbs S, Linke A, Adams V, Lenk K, Thiele H, Diederich KW, et al. Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study. *Circ Res.* 2005;97(8):756-62.
124. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Bartsch T, Schannwell C, Antke C, et al. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(9):1651-8.
125. Patel AN, Geffner L, Vina RF, Saslavsky J, Urschel HC Jr, Kormos R, et al. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;130(6):1631-8.

- 
126. Katritsis DG, Sotiropoulou PA, Karvouni E, Karabinos I, Korovesis S, Perez SA, et al. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2005;65(3):321-9.
127. Hendrikx M, Hensen K, Clijsters C, Jongen H, Koninckx R, Bijnens E, et al. Recovery of regional but not global contractile function by the direct intramyocardial autologous bone marrow transplantation: results from a randomized controlled clinical trial. *Circulation.* 2006;114(1 Suppl):101-7.
128. Kang HJ, Lee HY, Na SH, Chang SA, Park KW, Kim HK, et al. Differential effect of intracoronary infusion of mobilized peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor on left ventricular function and remodeling in patients with acute myocardial infarction versus old myocardial infarction: the MAGIC Cell-3-DES randomized, controlled trial. *Circulation.* 2006;114(1 Suppl):145-51.
129. Assmus B, Honold J, Schächinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, et al. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355(12):1222-32.
130. Mocini D, Staibano M, Mele L, Giannantoni P, Menichella G, Colivicchi F, et al. Autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Am Heart J.* 2006;151(1):192-7.
131. Fuchs S, Kornowski R, Weisz G, Satler LF, Smits PC, Okubagzi P, et al. Safety and feasibility of transendocardial autologous bone marrow cell transplantation in patients with advanced heart disease. *Am J Cardiol.* 2006;97(6):823-9.
132. Gao LR, Wang ZG, Zhu ZM, Fei YX, He S, Tian HT, et al. Effect of intracoronary transplantation of autologous bone marrow-derived mononuclear cells on outcomes of patients with refractory chronic heart failure secondary to ischemic cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2006;98(5):597-602.

- 
133. Stamm C, Kleine HD, Choi YH, Dunkelmann S, Lauffs JA, Lorenzen B, et al. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy Studies. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;133(3):717-25.
134. Manginas A, Goussetis E, Koutelou M, Karatasakis G, Peristeri I, Theodorakos A, et al. Pilot study to evaluate the safety and feasibility of intracoronary CD133(+) and CD133 CD34+ cell therapy in patients with nonviable anterior myocardial infarction. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2007;69(6):773-81.
135. Tse HF, Thambar S, Kwong YL, Rowlings P, Bellamy G, McCrohon J, et al. Prospective randomized trial of direct endo-myocardial implantation of bone marrow cells for treatment of severe coronary artery diseases (PROTECT-CAD trial). *Eur Heart J.* 2007;28:2998-3005.
136. Beeres SL, Bax JJ, Dibbets-Schneider P, Stokkel MP, Fibbe WE, van der Wall EE. Intramyocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells in patients with chronic myocardial infarction and severe left ventricular dysfunction. *Am J Cardiol.* 2007;100(7):1094-8.
137. Diederichsen AC, Møller JE, Thayssen P, Junker AB, Videbaek L, Saekmose SG, et al. Effect of repeated intracoronary injection of bone marrow cells in patients with ischaemic heart failure the Danish stem cell study--congestive heart failure trial (DanCell-CHF). *Eur J Heart Fail.* 2008;10(7):661-7.
138. Yao K, Huang R, Qian J, Cui J, Ge L, Li Y, et al. Administration of intracoronary bone marrow mononuclear cells on chronic myocardial infarction improves diastolic function. *Heart.* 2008;94(9):1147-53.
139. Zhao Q, Sun Y, Xia L, Chen A, Wang Z. Randomized study of mononuclear bone marrow cell transplantation in patients with coronary surgery. *Ann Thorac Surg.* 2008;86(6):1833-40.

- 
140. Ang KL, Chin D, Leyva F, Foley P, Kubal C, Chalil S, et al. Randomized, controlled trial of intramuscular or intracoronary injection of autologous bone marrow cells into scarred myocardium during CABG versus CABG alone. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2008;5:663-70.
141. Van Ramshorst J, Bax JJ, Beeres SL, Dibbets-Schneider P, Roes SD, Stokkel MP, et al. Intramyocardial bone marrow cell injection for chronic myocardial ischemia: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2009;301:1997-2004.
142. Akar AR, Durdu S, Arat M, Kilickap M, Kucuk NO, Arslan O, et al. Five-year follow-up after transepical implantation of autologous bone marrow mononuclear cells to ungraftable coronary territories for patients with ischaemic cardiomyopathy. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2009;36:633-43.
143. Pokushalov E, Romanov A, Chernyavsky A, Larionov P, Terekhov I, Artyomenko S, et al. Efficiency of intramyocardial injections of autologous bone marrow mononuclear cells in patients with ischemic heart failure: a randomized study. *J Cardiovasc Transl Res.* 2010;3:160-8.
144. Strauer BE, Yousef M, Schannwell CM. The acute and long-term effects of intracoronary Stem cell Transplantation in 191 patients with chronic heart failure: the STAR-heart study. *Eur J Heart Fail.* 2010;12:721-9.
145. Suárez de Lezo J, Herrera C, Romero MA, Pan M, Jiménez R, Carmona D, et al. Functional recovery following intracoronary infusion of autologous mononuclear bone marrow cells in patients with chronic anterior myocardial infarction and severely depressed ventricular function. *Rev Esp Cardiol.* 2010;63(10):1127-35.
146. Rivas-Plata A, Castillo J, Pariona M, Chunga A. Bypass grafts and cell transplant in heart failure with low ejection fraction. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2010;18(5):425-9.
147. Yerebakan C, Kaminski A, Westphal B, Donndorf P, Glass A, Liebold A, et al. Impact of preoperative left ventricular function and time from infarction on the long-

---

term benefits after intramyocardial CD133(+) bone marrow stem cell transplant. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011;142(6):1530-9.

148. Chugh AR, Beache GM, Loughran JH, Mewton N, Elmore JB, Kajstura J, et al. Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance. *Circulation.* 2012;126(11 Suppl 1):54-64.

149. Hansen M, Nyby S, Eifer Møller J, Videbæk L, Kassem M, Barington T, et al. Intracoronary injection of CD34-cells in chronic ischemic heart failure: 7 years follow-up of the DanCell study. *Cardiology.* 2014;129(2):69-74.

150. Qi Z, Liu S, Lv X, Duan F, Wang H, Gao Y, et al. Effects of Bone Marrow Mononuclear Cells Delivered through a Graft Vessel for Patients with Previous Myocardial Infarction and Chronic Heart Failure: An Echocardiographic Study of Left Atrium Function. *Echocardiography.* 2015;32(6):937-46.

151. Clifford DM, Fisher SA, Brunskill SJ, Doree C, Mathur A, Clarke MJ, et al. Longterm effects of autologous bone marrow stem cell treatment in acute myocardial infarction: factors that may influence outcomes. *PLoS One.* 2012;7(5):373.

152. Clifford DM, Fisher SA, Brunskill SJ, Doree C, Mathur A, Watt S, et al. Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database.* 2012;15-22.

153. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and metaanalysis. *Arch Intern Med.* 2007;167:989-97.

154. Brunskill SJ, Hyde CJ, Doree CJ, Watt SM, Martin-Rendon E. Route of delivery and baseline left ventricular ejection fraction, key factors of bonemarrow- derived cell therapy for ischaemic heart disease. *Eur J Heart Fail.* 2009:887-96.

155. Hu S, Liu S, Zheng Z, Yuan X, Li L, Lu M, et al. Isolated coronary artery bypass graft combined with bone marrow mononuclear cells delivered through a graft vessel for patients with previous myocardial infarction and chronic heart failure: a single-

---

center, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57: 2409-15.

156. Losordo DW, Schatz RA, White CJ, Udelson JE, Veereshwarayya V, Durgin M, et al. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation.* 2007;115:3165-72.

157. Wang S, Cui J, Peng W, Lu M. Intracoronary autologous CD34+ stem cell therapy for intractable angina. *Cardiology.* 2010;117:140-7.

158. Losordo DW, Henry TD, Davidson C, Sup Lee J, Costa MA, Bass T, et al. Intramyocardial, autologous CD34+ cell therapy for refractory angina. *Circ Res.* 2011;109:428-36.

159. Perin EC, Silva GV, Henry TD, Cabreira-Hansen MG, Moore WH, Coulter SA, et al. A randomized study of transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells and cell function analysis in ischemic heart failure (FOCUS-HF). *Am Heart J.* 2011;161:1078-87.

160. Perin EC, Silva GV, Zheng Y, Gahremanpour A, Canales J, Patel D, et al. Randomized, double-blind pilot study of transendocardial injection of autologous aldehyde dehydrogenase-bright stem cells in patients with ischemic heart failure. *Am Heart J.* 2012;163:415-21.

161. Seth S, Narang R, Bhargava B, Ray R, Mohanty S, Gulati G, et al. AIIMS cardiovascular stem cell study group. Percutaneous intracoronary cellular cardiomyoplasty for nonischemic cardiomyopathy: clinical and histopathological results: the first-in-man ABCD (autologous bone marrow cells in dilated cardiomyopathy) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:2350-1.

162. Arguero R, Careaga-Reyna G, Castano-Guerra R, Garrido- Garduno MH, Magana-Serrano JA, de Jesus NamboeLucio M. Cellular autotransplantation for ischemic and idiopathic dilated cardiomyopathy. Preliminary report. *Arch Med Res.* 2006;37:1010-4.



- 
163. Wang JA, Xie XJ, He H, Sun Y, Jiang J, Luo RH, et al. A prospective, randomized, controlled trial of autologous mesenchymal stem cells transplantation for dilated cardiomyopathy. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2006;34:107-10.
164. Huang RC, Yao K, Li YL, Zhang YQ, Xu SK, Shi HY, et al. Transplantation of autologous bone marrow mononuclear cells on patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: early results on effect and security. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2006;34:111-3.
165. Kirillov AM, Fatkhudinov T, Dyachkov AV, Koroteev AV, Goldshtein DV, Bochkov NP. Transplantation of allogenic cells in the therapy of patients with dilated cardiomyopathy. *Bull Exp Biol Med*. 2007;144:635-9.
166. Schannwell CM, Köstering M, Zeus T, Brehm M, Erdmann G, Fleissner T, et al. Humane autologe intrakoronare stammzelltransplantation zur myokardregeneration bei dilatativer cardiomyopathie (NYHA stadium II-IV). The Düsseldorf Autologous Bone Marrow Cells in Dilated Cardiomyopathy Trial. *ABCD Trial. J Kardiol*. 2008;15:23-30.
167. Kalil RA, Ott D, Sant'Anna R, Dias E, Marques-Pereira JP, Delgado-Canedo A, et al. Autologous transplantation of bone marrow mononuclear stem cells by mini-thoracotomy in dilated cardiomyopathy: technique and early results. *Sao Paulo Med J*. 2008;126:75-81.
168. Chen Y, Gao EM, Gao CY, Xu Y, Huang KJ, Niu ZM, et al. Effects of intracoronary autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in patients with dilated cardiomyopathy. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2008;36(12):1087-91.
169. Fischer-Rasokat U, Assmus B, Seeger FH, Honold J, Leistner D, Fichtlscherer S, et al. A pilot trial to assess potential effects of selective intracoronary bone marrow-derived progenitor cell infusion in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy: final 1-year results of the transplantation of progenitor cells and functional regeneration enhancement pilot trial in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circ Heart Fail*. 2009;2:417-23.

- 
170. Arom KV, Ruengsakulrach P, Belkin M, Tiensuwan M. Intramyocardial angiogenic cell precursors in nonischemic dilated cardiomyopathy. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2009;17(4):382-388.
171. Sant'anna RT, Kalil RA, Pretto Neto AS, Pivatto Júnior F, Fracasso J, Sant'anna JR, et al. Global contractility increment in nonischemic dilated cardiomyopathy after free wall-only intramyocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells: an insight over stem cells clinical mechanism of action. *Cell Transplant.* 2010;19(8):959-64.
172. Martino HF, Oliveira PS, Souza FC, Costa PC, Assunção e Silva E, Villela R, et al. A safety and feasibility study of cell therapy in dilated cardiomyopathy. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43:989-95.
173. Bocchi EA, Bacal F, Guimaraes G, Mendroni A, Mocelin A, Filho AE, et al. Granulocyte-colony stimulating factor or granulocyte-colony stimulating factor associated to stem cell intracoronary infusion effects in non ischemic refractory heart failure. *Int J Cardiol.* 2010;138:94-97.
174. Benetti F, Penherrera E, Maldonado T, Vera YD, Subramanian V, Geffner L. Direct myocardial implantation of human fetal stem cells in heart failure patients: long-term results. *Heart Surg Forum.* 2010;13:31-5.
175. Seth S, Bhargava B, Narang R, Ray R, Mohanty S, Gulati G, et al. AIIMS stem cell study group. The ABCD (autologous bone marrow cells in dilated cardiomyopathy) trial; a long-term follow-up study. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:1643-4.
176. Fatkhutdinov T, d'Yachkov AV, Koroteyev AV, Goldstein DV, Bochkov NP. Safety and efficiency of transplantation of allogenic multipotent stromal cells in surgical treatment of dilatated cardiomyopathy. *Bull Exp Biol Med.* 2010;149:119-24.
177. Ruengsakulrach P, Visudharom K, Chaothawee L, Belkin M. Peripheral blood stem cell for cardiomyopathy. *Bangkok Med J.* 2011;2:19-29.

- 
178. Vrtovec B, Poglajen G, Sever M, Lezaic L, Domanovic D, Cernelc P, et al. Effects of intracoronary stem cell transplantation in patients with dilated cardiomyopathy. *J Card Fail.* 2011;17:272-81.
179. Xiao WT, Gao LJ, Gao CY, Gao YJ, Dai GY, Li MW, et al. Comparative study on the efficacy of intracoronary infusion with various types of autologous bone marrow stem cells for patients with dilated cardiomyopathy. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* 2012; 40: 575-8.
180. Suárez de Lezo J, Herrera C, Romero M, Pan M, Suárez de Lezo J Jr, Carmona MD, et al. Functional improvement in patients with dilated cardiomyopathy after the intracoronary infusion of autologous bone marrow mononuclear cells. 2013;66(6): 450-7.
181. Vrtovec B, Poglajen G, Lezaic L, Sever M, Socan A, Domanovic D, et al. Comparison of transendocardial and intracoronary CD34+ cell transplantation in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 2013;128(11 Suppl 1): 42-9.
182. Vrtovec B, Poglajen G, Lezaic L, Sever M, Domanovic D, Cernelc P, et al. Effects of intracoronary CD34 stem cell transplantation in nonischemic dilated cardiomyopathy patients. 5-year follow-up. *Circ Res.* 2013;112(1):165-73.
183. Westphal RJ, Bueno RR, Galvão PB, Zanis Neto J, Souza JM, Guérios ÊE, et al. Autologous transplantation of bone marrow adult stem cells for the treatment of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol.* 2014;103(6):521-9.
184. Lezaic L, Socan A, Poglajen G, Peitl PK, Sever M, Cukjati M, et al. Intracoronary transplantation of CD34(+) cells is associated with improved myocardial perfusion in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *J Card Fail.* 2015;21(2):145-52.
185. Bartunek J, Dimmeler S, Drexler H, Fernandez-Aviles F, Galinanes M, Janssens S, et al. The consensus of the Task Force of the European Society of Cardiology

---

concerning the clinical investigation of the use of autologous adult stem cells for repair of the heart. *Eur Heart J*. 2006;27:1338-40.

186. Rende X, Song D, Yichao Z, Jun P, Ben H. Autologous transplantation of bone-marrow/blood-derived cells for chronic ischemic heart disease: a systematic review and meta-analysis. *Can J Cardiol*. 2014;30(11):1378-84.

187. Marquis-Gravel G, Stevens LM, Mansour S, Avram R, Noiseux N. Stem cell therapy for the treatment of nonischemic cardiomyopathy: a systematic review of the literature and meta-analysis of randomized controlled trials. *Can J Cardiol*. 2014;30(11):1378-84.

188. Jiao R, Liu Y, Yang WJ, Zhu XY, Li J, Tang QZ. Effects of stem cell therapy on dilated cardiomyopathy. *Saudi Med J*. 2014;35(12):1463-8.

189. Rivas J, Menéndez JJ, Arrieta R, Alves J, Romero MP, García-Guereta L, et al. Utilidad de la terapia intracoronaria con células progenitoras en pacientes con miocardiopatía dilatada: ¿puente o alternativa al trasplante cardíaco? *An Pediatr*. 2011;74(4):218-25.

190. Towbin JA, Lowe AM, Colan SD, Sleeper LA, Orav EJ, Clunie S, et al. Incidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children. *JAMA*. 2006;296:1867-76.

191. Wilkinson JD, Landy DC, Colan SD, Towbin JA, Sleeper LA, Orav EJ, et al. The pediatric cardiomyopathy registry and heart failure: key results from the first 15 years. *Heart Fail Clin*. 2010;6:401-13.

192. Nugent AW, Daubeney PE, Chondros P. The epidemiology of childhood cardiomyopathy in Australia. *N Engl J Med*. 2003;348:1639-46.

193. Lipshultz SE, Sleeper LA, Towbin JA, Lowe AM, Orav EJ, Cox GF, et al. The incidence of pediatric cardiomyopathy in two regions of the United States. *N Engl J Med*. 2003;348:1647-55.

- 
194. Harmon WG, Sleeper LA, Cuniberti L. Treating children with idiopathic dilated cardiomyopathy (from the pediatric cardiomyopathy registry). *American Journal of Cardiology*. 2009;104(2):281-6.
195. Boucek MM, Faro A, Novick RJ, Bennett LE, Keck BM, Hosenpud JD. The Registry of the International Society of Heart and Lung Transplantation: Fourth Official Pediatric Report -- 2000. *J Heart Lung Transplant*. 2001;20:39-52.
196. Assidy J, Haynes S, Kirk R, Crossland D, Smith JH, Hamilton L, et al. Changing patterns of bridging to heart transplantation in children. *J Heart Lung Transplant*. 2009;28:249-54.
197. Potapov EV, Stiller B, Hetzer R. Ventricular assist devices in children: Current achievements and future perspectives. *Pediatr Transplant*. 2007;11:241-55.
198. Goldman AP, Cassidy J, de Leval M, Haynes S, Brown K, Whitmore P, et al. The waiting game: bridging to paediatric heart transplantation. *Lancet*. 2003;362:1967-70.
199. Levi D, Marelli D, Plunkett M, Alejos J, Bresson J, Tran J, et al. Use of assist devices and ECMO to bridge pediatric patients with cardiomyopathy to transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2002;21:760-70.
200. Olguntürk R, Kula S, Sucak GT, Ozdoğan ME, Erer D, Saygılı A. Peripheral stem cell transplantation in children with dilated cardiomyopathy: preliminary report of first two cases. *Pediatr Transplant*. 2010;14:257-60.
201. Rupp S, Bauer J, Tonn T, Schächinger V, Dimmeler S, Zeiher AM, et al. Intracoronary administration of autologous bone marrow-derived progenitor cells in a critically ill two-year-old child with dilated cardiomyopathy. *Pediatr Transplantation*. 2009;13:620-3.
202. Rupp S, Sèller AM, Dimmeler S, Tonn T, Bauer J, Jux C, et al. A regenerative strategy for heart failure in hypoplastic left heart syndrome: Intracoronary administration of autologous bone marrow-derived progenitor cells. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29:574-7.

- 
203. Habeeb NM, Youssef OI, El Hadidi ES. Therapeutic role of mobilized bone marrow cells in children with nonischemic dilated cardiomyopathy. *ISRN Pediatr.* 2012;927-68.
204. Venugopalan P, Agarwal AK, and Worthing EA. Chronic cardiac failure in children due to dilated cardiomyopathy: diagnostic approach, pathophysiology and management. *European Journal of Pediatrics.* 2000;159(11):803-10.
205. Suárez de Lezo J, Pan M, Herrera C. Combined percutaneous revascularization and cell therapy after failed repair of anomalous origin of left coronary artery from pulmonary artery. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2009;73:833-7.
206. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001;410:701-5.
207. Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ, Stanworth SJ, Mathur A, Watt SM. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J.* 2008;29:1807-18.
208. Traini JC, Lago NE, Alvarez M. Mononuclear bone marrow stem cells implant as an alternative treatment in non-ischemic dilated cardiomyopathy. *J Amer Coll Cardiol.* 2006;47(Suppl. A):80A.
209. Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GG, Abbate A, Khianey R, Sheiban I, Bartunek J, et al. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50:1761-7.
210. Theiss HD, David R, Engelmann MG, Barth A, Schotten K, Naebauer M, et al. Circulation of CD34+ progenitor cell populations in patients with idiopathic dilated and ischaemic cardiomyopathy (DCM and ICM). *Eur Heart J.* 2007;28:1258-64.
211. del Corso C, Campos de Carvalho AC. Cell therapy in dilated cardiomyopathy: from animal models to clinical trials. *Braz J Med Biol Res.* 2011;44(5):388-93.

- 
212. Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res.* 1998;83:1-14.
213. Beeres SL, Atsma DE, van Ramshorst J, Schalij MJ, Bax JJ. Cell therapy for ischaemic heart disease. *Heart.* 2008;94(9):1214-26.
214. Möllmann H, Nef H, Elsässer A, Hamm C. Stem cells in myocardial infarction: from bench to bedside. *Heart.* 2009;95(6):508-14.
215. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275:964-7.
216. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 1999;5:434-8.
217. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, 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.
218. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir MA. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 2001;108:407-14.
219. Strauer BE, Steinhoff G. 10 years of intracoronary and intramyocardial bone marrow stem cell therapy of the heart: from the methodological origin to clinical practice. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58:1095-104.
220. Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation.* 1999;100:II247-56.
221. 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.

222. 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;107:461-8.

223. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000;100:157-68.

224. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:387-403.

225. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. 2001;105:829-41.

226. Poulson R, Alison MR, Forbes SJ, Wright NA. Adult stem cell plasticity. *J Pathol*. 2002;197:441-56.

227. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-González XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418:41-9.

228. Rosenthal N, Tsao L. Helping the heart to heal with stem cells. *Nat Med*. 2001;7:412-3.

229. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. 2001;357:279-80.

230. Dib N, Michler RE, Pagani FD, Wright S, Kereiakes DJ. Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: four-year follow-up. *Circulation*. 2005;112:1748-55.



- 
231. Badimon L, Oñate B, Vilahur G. Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells and Their Reparative Potential in Ischemic Heart Disease. *Rev Esp Cardiol.* 2015;68(7):599-611.
232. Mayani H, Lansdorp PM. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells.* 1998;16:153-65.
233. Barker JN, WeisdorfDJ, DeFor TE, Blazar BR, McGlave PB, Miller JS, et al. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood.* 2005;105:1343-7.
234. Gluckman E. Milestones in umbilical cord blood transplantation. *Blood Rev.* 2011;25:255-9.
235. Roura S, Pujal JM, Bayes-Genis A. Umbilical cord blood for cardiovascular cell therapy: from promise to fact. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1254:66-70.
236. Dell'Era P, Benzoni P, Crescini E, Valle M, Xia E, Consiglio A, et al. Cardiac disease modeling using induced pluripotent stem cell-derived human cardiomyocytes. *World J Stem Cells.* 2015;7(2):329-42.
237. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet.* 2004; 363:751-6.
238. Suárez de Lezo J, Torres A, Herrera I, Pan M, Romero M, Pavlovic D, et al. Efectos de la movilización de células madre mediante el uso de factor estimulante de colonias granulocíticas en pacientes con infarto agudo de miocardio anterior revascularizado percutáneamente. *Rev Esp Cardiol.* 2005;58(3):253-61.
239. Zohnhofer D, Ott I, Mehilli J, Schomig K, Michalk F, Ibrahim T, et al. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2006;295:1003-10.

240. Ince H, Petzsch M, Kleine HD, Eckard H, Rehders T, Burska D, et al. Prevention of left ventricular remodeling with G-CSF after acute myocardial infarction: Final one-year results of the FIRSTLINE-AMI trial (Front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by granulocyte colony-stimulating factor). *Circulation*. 2005;112:73-80.
241. Ince H, Petzsch M, Kleine HD, Schmidt H, Rehders T, Körber T, et al. Preservation from left ventricular remodeling by front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction using granulocyte-colony stimulating factor (FIRSTLINE-AMI). *Circulation*. 2005;112:3097-106.
242. Valgimigli M, Rigolin GM, Cittanti C, Malagutti P, Curello S, Percoco G, et al. Use of granulocyte-colony stimulating factor during acute myocardial infarction to enhance bone marrow stem cell mobilization in humans: clinical and angiographic safety profile. *Eur Heart J*. 2005;26:1838-45.
243. Kuethe F, Figulla HR, Herzau M, Voth M, Fritzenwanger M, Opfermann T, et al. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor for mobilization of bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 2005;150:1-7.
244. Li TS, Mikamo A, Takahashi M, Suzuki R, Ueda K, Ikeda Y, et al. Comparison of cell therapy and cytokine therapy for functional repair in ischemic and nonischemic heart failure. *Cell Transplant*. 2007;16(4):365-74.
245. Urbanek K, Quaini F, Tasca G, Torella D, Castaldo C, Nadal-Ginard B, et al. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *PNAS*. 2003;100:10440-5.
246. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*. 2002;416:542-5.

- 
247. Nygren JM, Jovinge S, Breitbart M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med.* 2004;10:494-501.
248. Kucia M, Dawn B, Hunt G, Guo Y, Wysoczynski M, Majka M, et al. Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood following myocardial infarction. *Circ Res.* 2004; 95:1191-9.
249. Dawn B, Zuba-Surma E, Abdel-Latif A, Tiwari S, Bolli R. Cardiac stem cell therapy for myocardial regeneration: a clinical perspective. *Minerva Cardioangiol.* 2005;53:549-64.
250. Antonitsis P, Ioannidou-Papagiannaki E, Kaidoglou A, Papakonstantinou C. In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2007;6(5):593-7.
251. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000;95:952-8.
252. Bhatia M. AC133 expression in human stem cells. *Leukemia.* 2001;15:1685-8.
253. 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.
254. Colombo A, Castellani M, Piccaluga E, Pusineri E, Palatresi S, Longari V, et al. Myocardial blood flow and infarct size after CD133+ cell injection in large myocardial infarction with good recanalization and poor reperfusion: results from a randomized controlled trial. *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2011;12:239-48.
255. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* 1999;103:697-705.

- 
256. 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.
257. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;10:593-8.
258. Kawada H, Fujita J, Kinjo K. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood*. 2004;104:3581-7.
259. Hattan N, Kawaguchi H, Ando K. Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc Res*. 2005;65:334-44.
260. Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med*. 2003;9:1195-201.
261. Neglia D, Parodi O, Gallopin M, Sambucetti G, Giorgetti A, Pratali L, et al. Myocardial blood flow response to pacing tachycardia and to dipyridamole infusion in patients with dilated cardiomyopathy without overt heart failure. A quantitative assessment by positron emission tomography. *Circulation*. 1995;92:796-804.
262. Canetti M, Akhter MW, Lerman A, Karaalp IS, Zell JA, Singh H, et al. Evaluation of myocardial blood flow reserve in patients with chronic congestive heart failure due to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2003;92:1246-9.
263. Donndorf P, Kundt G, Kaminski A, Yerebakan C, Liebold A, Steinhoff G, et al. Intramyocardial bone marrow stem cell transplantation during coronary artery bypass surgery: a meta-analysis. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011;142:911-20.
264. Duan F, Qi Z, Liu S, Lu X, Wang H, Gao Y, et al. Effectiveness of bone marrow mononuclear cells delivered through a graft vessel for patients with previous myocardial

---

infarction and chronic heart failure: an echocardiographic study of left ventricular remodeling. *Med Ultrason*. 2015;17(2):160-6.

265. 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;110:213-18.

266. Mushtaq M, DiFede DL, Golpanian S, Khan A, Gomes SA, Mendizabal A, et al. Rationale and design of the Percutaneous Stem Cell Injection Delivery Effects on Neomyogenesis in Dilated Cardiomyopathy (the POSEIDON-DCM study): a phase I/II, randomized pilot study of the comparative safety and efficacy of transendocardial injection of autologous mesenchymal stem cell vs. allogeneic mesenchymal stem cells in patients with non-ischemic dilated cardiomyopathy. *J Cardiovasc Transl Res*. 2014;7(9):769-80.

267. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81:1161-72.

268. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Lamas GA. Development and prevention of congestive heart failure following myocardial infarction. *Circulation*. 1993;87:IV120-IV5.

269. Neglia D, Michelassi C, Trivieri MG, Sambuceti G, Giorgetti A, Pratali L, et al. Prognostic role of myocardial blood flow impairment in idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2002;105:186-93.

270. White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PW, Whitlock RM, Wild CJ. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation*. 1987;76:44-51.

271. Assmus B, Rolf A, Erbs S, Elssässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, et al. Clinical outcome 2 years after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *Circ Heart Fail*. 2010;3:89-96.

- 
272. Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, 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.
273. Bardy GH, Lee KL, Mark DB, Poole JE, Packer DL, Boineau R, et al. Sudden Cardiac Death in Heart Failure Trial (SCD-HeFT) Investigators. Amiodarone or an implantable cardioverter-defibrillator for congestive heart failure. *N Engl J Med.* 2005;352: 225-37.
274. Olivotto I, Cecchi F, Gistri R, Lorenzoni R, Chiriatti G, Girolami F, et al. Relevance of coronary microvascular flow impairment to long-term remodeling and systolic dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardio.* 2006;47:1043-8.
275. Jeevanantham V, Afzal MR, Zuba-Surma EK, Dawn B. Clinical trials of cardiac repair with adult bone marrow- derived cells. *Methods Mol Biol.* 2013;1036:179-205.
276. Hristov M, Heussen N, Schober A, Weber C. Intracoronary infusion of autologous bone marrow cells and left ventricular function after acute myocardial infarction: a meta-analysis. *J Cell Mol Med.* 2006;10:727-33.
277. Kendziorra K, Barthel H, Erbs S, Emmrich F, Hambrecht R, Schuler G, et al. Effect of progenitor cells on myocardial perfusion and metabolism in patients after recanalization of a chronically occluded coronary artery. *J Nucl Med.* 2008; 49:557-63.
278. Dhein S, Garbade J, RouabahD, Abraham G, Ungemach FR, Schneider K, et al. Effects of autologous bone marrow stem cell transplantation on beta-adrenoceptor density and electrical activation pattern in a rabbit model of non-ischemic heart failure. *J Cardiothorac Surg.* 2006;1:17.
279. Schuleri KH, Feigenbaum GS, Centola M, Weiss ES, Zimmet JM, Turney J, et al. Autologous mesenchymal stem cells produce reverse remodelling in chronic ischaemic cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 2009;30:2722-32.

- 
280. Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet*. 2004;363:783-4.
281. Baeza Garzón F, Romero M, Suárez de Lezo Jr, Ojeda S, Herrera C, Suárez de Lezo J. Miocardiopatía dilatada idiopática tratada con infusión intracoronaria de células autólogas de médula ósea: seguimiento a largo plazo. *Rev Esp de Cardiol*. 2015;68(8):726-8.
282. McMurray J, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, et al. Guía de práctica clínica de la ESC sobre diagnóstico y tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda y crónica 2012. *Rev Esp Cardiol*. 2012;65(10):938.e1-e59.
283. Zoghbi WA, Enriquez-Sarano M, Foster E, Grayburn PA, Kraft CD, Levine RA, et al. American Society of Echocardiography. Recommendations for evaluation of the severity of native valvular regurgitation with two-dimensional and Doppler echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2003;16:777-802.
284. Gibbons RJ, Balady GJ, Beasley JW, Bricker JT, Duvernoy WF, Froelicher VF, et al. ACC/AHA guidelines for exercise testing. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Exercise Testing). *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:260-311.
285. Sheehan FH. Determinants of improved left ventricular function after thrombolytic therapy in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1987;9:937-44.
286. Baeza Garzón F, Ruiz Ortiz M, Mesa Rubio D. Factibilidad de la ecocardiografía speckle tracking tridimensional para valorar área strain, torsión y fracción de eyección en una serie consecutiva de pacientes. *Cardiocre*. 2016. In press.
287. Johannes MIH, Gijs JM, Kummeling GJ, Koudstaal S, Jansen of Lorkeers SJ, Doevendans PA, et al. Cell Therapy, a Novel Remedy for Dilated Cardiomyopathy? A Systematic Review. *J Car Fail*. 2013;19(7):494-502.

- 
288. Franciosa JA, Wilen M, Ziesche S, Cohn JN. Survival in men with severe chronic left ventricular failure due to either coronary heart disease or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardio*. 1983;51:831-6.
289. Nowbar AN, Mielewczik M, Karavassilis M, Dehbi HM, Shun-Shin MJ, Jones S, et al. Discrepancies in autologous bone marrow stem cell trials and enhancement of ejection fraction (DAMASCENE): weighted regression and meta-analysis. *BMJ*. 2014;348:g2688.
290. Tuljapurkar SR, McGuire TR, Brusnahan SK, Jackson JD, Garvin KL, Kessinger MA, et al. Changes in human bone marrow fat content associated with changes in hematopoietic stem cell numbers and cytokine levels with aging. *J Anat* 2011;219:574-81.
291. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*. 2001;89:E1-7.
292. Yvan-Charvet L, Pagler T, Gautier EL, Avagyan S, Siry RL, Han S, et al. ATPbinding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science*. 2010;328:1689-93.
293. Yung BY, Bor AM. Identification of high-density lipoprotein in serum to determine anticancer efficacy of doxorubicin in HeLa cells. *Int J Cancer*. 1992;50:951-7.
294. Pellegatta F, Bragheri M, Grigore L, Raselli S, Maggi FM, Brambilla C, et al. In vitro isolation of circulating endothelial progenitor cells is related to the high density lipoprotein plasma levels. *Int J Mol Med*. 2006;17:203-8.
295. Tso C, Martinic G, Fan WH, Rogers C, Rye KA, Barter PJ. High-density lipoproteins enhance progenitor-mediated endothelium repair in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1144-9.



- 
296. Higashi Y, Matsuoka H, Umei H, Sugano R, Fujii Y, Soga J, et al. Endothelial function in subjects with isolated low HDL cholesterol: role of nitric oxide and circulating progenitor cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298:202-9.
297. Barter PJ, Puranik R, Rye KA. New insights into the role of HDL as an anti-inflammatory agent in the prevention of cardiovascular disease. *Curr Cardiol Rep.* 2007;9(6):493-98.
298. Barlage S, Boettcher D, Boettcher A, Dada A, Schmitz G. High density lipoprotein modulates platelet function. *Cytometry A.* 2006;69:196-9.
299. Duffy D, Rader DJ. Update on strategies to increase HDL quantity and function. *Nat Rev Cardiol.* 2009;6(7):455-63.
300. Norata GD, Pirillo A, Ammirati E, Catapano AL. Emerging role of high density lipoproteins as a player in the immune system. *Atherosclerosis.* 2012;220:11-21.
301. Chawda JG, Jain SS, Patel HR, Chaduvula N, Patel K. The relationship between serum lipid levels and the risk of oral cancer. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2011;32:34-7.
302. Kaparthy PLN, Gupta N, Lakshmi K, Surya Prakasa R, Kantilal S, Vasantha A, et al. Autologous bone marrow mononuclear cell delivery to dilated cardiomyopathy patients: a clinical trial. *Afr J Biotechnol.* 2008;7:207-10.
303. Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M. Dose-dependent contribution of CD 34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation.* 2006;113:1311-25.
304. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 2001;103:2776-9.

305. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 1999;18:3964-72.
306. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, et al. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood.* 2001;97:3354-60.
307. Freedman AS, Munro JM, Rice GE, Bevilacqua MP, Morimoto C, McIntyre BW, et al. Adhesion of human B cells to germinal centers in vitro involves VLA-4 and INCAM-110. *Science.* 1990;249:1030-3.
308. Kukielka GL, Hawkins HK, Michael L, Manning AM, Youker K, Lane C, et al. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in ischemic and reperfused canine myocardium. *J Clin Invest.* 1993;92:1504-16.
309. Revilla A, López J, Arnold R, Sánchez PL, Villa A, Pinedo M, et al. Evolución a largo plazo de la función ventricular tras la terapia celular intracoronaria en el infarto agudo de miocardio. *Rev Esp Cardiol.* 2011;64:334-7.



