

El efecto de la inyección transendocárdica de células mononucleadas de médula ósea es diferente en pacientes diabéticos y en no diabéticos: hallazgos derivados de estudios clínicos prospectivos en pacientes «sin opción»

Pilar Jiménez-Quevedo^a, Guilherme V. Silva^a, Ricardo Sanz-Ruiz^a, Edie M. Oliveira^a, Marlos R. Fernandes^a, Franca Angeli^a, James T. Willerson^a, Hans F. Dohmann^b y Emerson C. Perin^a

^aCentro de Terapia Celular. Texas Heart Institute. St. Luke's Episcopal Hospital. Houston. Texas. Estados Unidos.

^bHospital Procardiaco. Rio de Janeiro. Brasil.

Se desconoce si la administración de células madre tiene el mismo efecto en pacientes diabéticos y en no diabéticos. Para ello se estudió a 26 pacientes consecutivos, incluidos en dos estudios, tratados con células mononucleadas de médula ósea (CMNMO), con miocardiopatía isquémica crónica y sin opción a revascularización. Se les realizó un mapeo electromecánico con NOGA para identificar miocardio viable (voltaje unipolar $\geq 6,9$ mV) y se les inyectó una media de $28,5 \pm 4,7$ millones de CMNMO. Se realizó un seguimiento a los 6 meses. En los pacientes no diabéticos, se observó una reducción significativa del volumen telesistólico a los 6 meses en comparación con el basal, una disminución significativa de la clase NYHA (de 3 [1,75-3] a 1 [1-2]; $p = 0,04$), de la puntuación de angina de la clasificación canadiense (de 3 [2-4] a 1 [1-1,5]; $p = 0,04$) y un aumento del consumo de oxígeno (de 16,4 [13,1-21,5] a 24,5 [17,3-29,2] ml/kg/min; $p = 0,04$). Estas diferencias no se observaron en los pacientes diabéticos. Éste es el primer estudio clínico que observa que la inyección de CMNMO podría tener un menor efecto en los diabéticos.

Palabras clave: Células madre. Trasplante. Insuficiencia cardíaca. Revascularización. Terapia génica.

Diabetic and Nondiabetic Patients Respond Differently to Transendocardial Injection of Bone Marrow Mononuclear Cells: Findings From Prospective Clinical Trials in "No-Option" Patients

Whether stem cell treatment has the same effect in diabetics and nondiabetics is unknown. To compare outcomes in these two groups, we analyzed data from 26 consecutive patients with chronic ischemic cardiomyopathy who were taking part in two clinical trials. Revascularization was not an option for these patients and they were treated with bone marrow mononuclear cells (BMMNCs). Patients underwent NOGA electromechanical mapping to identify viable myocardium (i.e., with a unipolar voltage ≥ 6.9 mV), after which they received a mean of $28.5 \pm 4.7 \times 10^6$ BMMNCs. Patients were followed up at 6 months. In nondiabetics, there was a significant decrease in end-systolic volume between baseline and 6-month follow-up. In addition, New York Heart Association (NYHA) functional class decreased significantly ($P = .04$) from 3.0 (1.75-3.0) to 1.0 (1.0-2.0), the Canadian Cardiovascular Society angina score (CCSAS) improved significantly ($P = .04$) from 3.0 (2.0-4.0) to 1.0 (1.0-1.5), and oxygen uptake increased significantly ($P = .04$) from 16.4 (13.1-21.5) to 24.5 (17.3-29.2) ml/kg/min. These changes were not observed in diabetic patients. This is the first clinical study to show that BMMNC injection could have a smaller effect in diabetics.

Key words: Stem cells. Transplantation. Heart failure. Revascularization. Gene therapy.

Full English text available from: www.revespcardiol.org

Correspondencia: Dr. E. Perin.
Stem Cell Center at the Texas Heart Institute.
St. Luke's Episcopal Hospital. Houston, TX, Estados Unidos.
Correo electrónico: eperin@heart.thi.tmc.edu

Recibido el 31 de mayo de 2007
Aceptado para su publicación el 2 de noviembre de 2007.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad coronaria en pacientes diabéticos se asocia a un peor pronóstico que en los pacientes sin diabetes mellitus¹. Existen varios factores que pueden contribuir a esta mayor morbimortalidad^{2,3}; entre ellos, el desarrollo deficiente de nueva circulación colateral tras una oclusión coronaria.

Se ha descrito que el fenómeno de neovascularización en adultos es el resultado de la combinación de dos procesos, la angiogénesis (vasos nuevos formados a par-

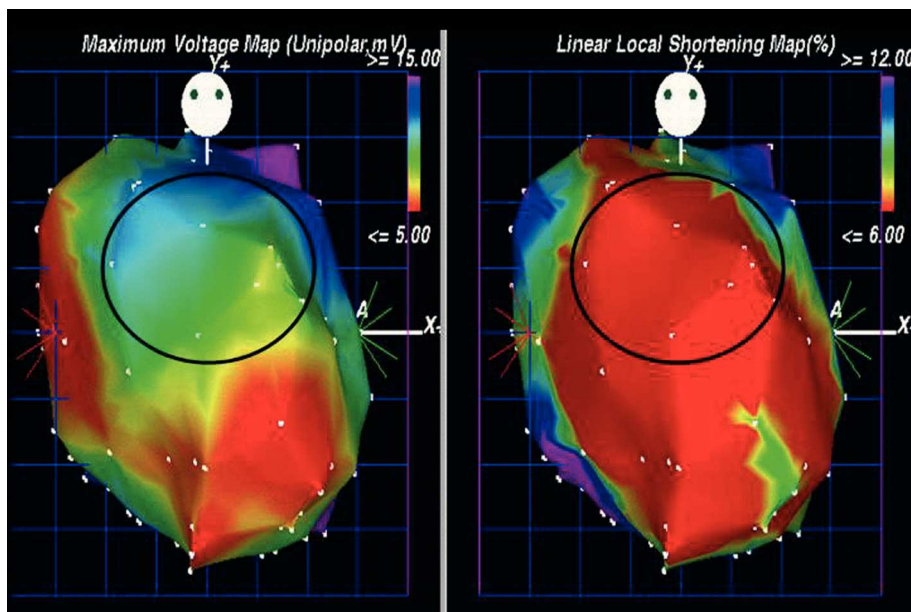


Fig. 1. Mapas electromecánicos de un paciente incluido en el estudio (proyección anteroposterior), utilizados para identificar el área específica de tratamiento: mapa de voltaje unipolar (izquierda) y mapa de acortamiento lineal local (derecha). La zona marcada (pared anterior) identificó miocardio viable (voltaje unipolar $\geq 6,9$ mV, asociado con actividad mecánica disminuida).

tir de vasos preexistentes) y la vasculogénesis (vasos nuevos formados a partir de células precursoras)⁴. Por otro lado, el trasplante de células madre ha mostrado un nuevo enfoque terapéutico prometedor, con el potencial de inducir neovascularización en pacientes «sin opción» a revascularización que sufren isquemia crónica⁵. Varios estudios clínicos con un pequeño número de pacientes han descrito el efecto beneficioso de la inyección transendocárdica de células mononucleares autólogas de médula ósea (CMNMO) en los pacientes con cardiopatía isquémica crónica en fase terminal⁵⁻⁷.

Como hemos comentado, se ha demostrado que el proceso angiogénico está alterado en los pacientes con diabetes mellitus^{8,9}. Estudios *in vitro* indican que las células progenitoras endoteliales (CPE) presentan defectos funcionales en los diabéticos. Sin embargo, sigue sin conocerse si el efecto clínico del tratamiento con células madre es equivalente entre los pacientes diabéticos y aquellos sin diabetes.

Así, el objetivo de nuestro estudio fue comparar los datos clínicos y funcionales de pacientes diabéticos y no diabéticos con insuficiencia cardíaca crónica de origen isquémico en fase terminal que habían sido tratados con este tipo concreto de células madre.

MÉTODOS

Selección de pacientes

Desde diciembre de 2001 a mayo de 2006, 26 pacientes consecutivos con cardiopatía isquémica terminal y sin opción a revascularización coronaria con técnicas convencionales fueron tratados con CMNMO como parte de dos ensayos clínicos coordinados por el Texas Heart Institute (Houston, Texas, Estados Uni-

dos). El primer ensayo se realizó en colaboración con el Hospital Procardiaco (Río de Janeiro, Brasil), y el segundo se llevó a cabo en el St. Luke Episcopal Hospital (Houston, Texas, Estados Unidos). Los criterios de inclusión y exclusión fueron similares en ambos estudios (fase I), y se han descrito previamente⁵. En resumen, se incluyó a los pacientes que presentaban enfermedad coronaria crónica con defectos de perfusión reversibles y detectables mediante tomografía computarizada por emisión monofotónica (SPECT) y una fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) inferior al 45%. Además, tras la valoración de la angiografía coronaria, se consideró a todos los pacientes sin opción a revascularización tanto percutánea como quirúrgica. Este estudio cumple con los principios de la Declaración de Helsinki, fue aprobado por el comité ético de cada centro y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado por escrito.

En este estudio se comparó la evolución de los pacientes diabéticos y aquellos sin diabetes. Para ello, se definió la diabetes mellitus de acuerdo con el informe de la Organización Mundial de la Salud¹⁰ y se incluyó a pacientes diabéticos tratados tanto con dieta como con tratamiento farmacológico.

Aspiración de médula ósea y administración transendocárdica de CMNMO

La aspiración de médula ósea se realizó mediante la técnica estándar⁵. Se utilizó la centrifugación y el gradiente de densidad de Ficoll para aislar la fracción mononuclear de la médula ósea⁵. Antes de la inyección de células, se realizó un mapeo electromecánico con NOGA para identificar el área específica de tratamiento (miocardio viable: voltaje unipolar $\geq 6,9$ mV) (fig. 1)⁵.

TABLA 1. Características basales clínicas y de las células derivadas de la médula ósea inyectadas

Característica clínica	Pacientes diabéticos (n = 12)	Pacientes sin diabetes (n = 13)	p
Edad (años)	63 (56,7-66,7)	53,5 (49,5-66,5)	0,08
Varones, n (%)	10 (80,3)	11 (84,6)	1
Hiperlipemia, n (%)	9 (75)	11 (84,6)	0,64
Hipertensión, n (%)	8 (66,7)	9 (69,2)	1
Fumador actual, n (%)	2 (16,7)	3 (23,1)	1
IAM previo, n (%)	7 (58,3)	12 (92,3)	0,07
ICP previa, n (%)	6 (50)	4 (30,8)	0,43
Cirugía previa, n (%)	8 (66,8)	10 (76,9)	0,67
Enfermedad multivascular, n (%)	11 (91,7)	13 (100)	0,48
Accidente cerebrovascular previo, n (%)	3 (25)	2 (15,4)	0,64
Insuficiencia renal crónica, n (%)	3 (25)	1 (7,7)	0,32
Vasculopatía periférica, n (%)	6 (50)	6 (46,2)	0,85
FEVI (%)	40 (27-45)	32 (26-37,2)	0,15
Área inyectada, mm ²	1.941,5 (1.402-2.478,3)	1.504,3 (1.117,9-1.859,6)	0,24
Pared inyectada, %			
Anterior	9,1	14,3	1
Septal	18,2	42,9	0,23
Lateral	72,7	42,9	0,22
Inferior	45,5	42,9	1
Células mononucleares de médula ósea*			
Viabilidad, (%)	98,5 (97,6-98,6)	98,5 (92,6-99,1)	0,95
Número (millones de células)	29,4 (28-30,1)	30 (29,4-30)	0,30
CD45lo CD34+(%)	2,1 (1,5-3)	2,2 (1,8-2,8)	0,25
<i>Natural killer</i> (CD+34 CD56+) (%)	1,6 (0,7-3,3)	0,5 (0,3-1,3)	0,057
Monocitos (CD45+CD14+) (%)	6 (3,8-7,7)	3,4 (2,3-5,4)	0,31

FEVI: fracción de eyección ventricular izquierda; IAM: infarto agudo de miocardio; ICP: intervención coronaria percutánea.

*Resultados de la citometría de flujo de las células inyectadas.

Valores expresados como porcentajes o mediana (rango intercuartílico).

Posteriormente, se administraron 15 inyecciones de 0,2 ml cada una mediante el catéter de inyección NOGA MYOSTAR (Cordis Corporation, Miami Lakes, Florida, Estados Unidos).

Seguimiento clínico y evaluación funcional

Se realizó una evaluación clínica y funcional en el momento de la inyección y a los 6 meses de seguimiento. La FEVI y los volúmenes ventriculares se valoraron mediante ecocardiografía transtorácica, que fue interpretada por un laboratorio independiente y ciego a los datos de los pacientes. Se llevó a cabo una ergometría con consumo de oxígeno usando un protocolo estándar con incrementos de 0,5 millas/h inicialmente, una inclinación del 0% al 10% y una duración planificada de ejercicio de 10 min. Tanto la evaluación clínica como la funcional se han realizado mediante los mismos protocolos ya descritos⁵.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 12.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, Estados Unidos). Los datos cuantitativos se mostraron como medianas (rango intercuartílico) y se compara-

ron mediante pruebas no paramétricas. Las variables categóricas se expresaron como porcentajes y se compararon mediante la prueba exacta de Fisher. Se consideró significativo un valor de dos colas de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Características basales

Las características basales fueron similares entre ambos grupos (tabla 1), salvo con una tendencia hacia menor edad y mayor historia de infarto de miocardio previo en el grupo sin diabetes. El área y la localización de las inyecciones no fueron significativamente diferentes entre los grupos (tabla 1).

Seguimiento a los 6 meses

A los 6 meses, 25 de los 26 pacientes habían completado el período de seguimiento. Un paciente rehusó seguir en el estudio y fue excluido del análisis. En total se inyectaron una mediana de 29,7 (28,2-30) millones de células, de las que el 2,2% (1,6%-2,8%) fueron células CD45lo CD34+; la viabilidad fue del 96,9% \pm 3,8%. Las características de las CMNMO fueron similares entre ambos grupos (tabla 1), salvo por una ten-

TABLA 2. Comparación de los datos funcionales de los pacientes con y sin diabetes mellitus

Características clínicas	Pacientes diabéticos (n = 12)	Pacientes sin diabetes (n = 13)	p
MET			
Basal	4,1 (3-4,9)	4,7 (3,7-6,3)	0,22
Seguimiento a los 6 meses	4,5 (3,4-5,3)	7 (4,9-9,3)	0,16
p	0,26	0,01	
VO_{2máx} (ml/kg/min)			
Basal	14,4 (10,6-17,4)	16,4 (13,1-21,5)	0,22
Seguimiento a los 6 meses	15,6 (12,6-22,8)	24,5 (17,3-29,2)	0,03
p	0,12	0,04	
Ecocardiografía 2D			
Volumen telesistólico (ml)			
Basal	111 (64,5-151)	135,5 (103-168,7)	0,14
Seguimiento a los 6 meses	94,7 (50-147,7)	110,5 (77,7-151)	0,40
p	0,59	0,009	
Volumen telediastólico (ml)			
Basal	172,5 (122,2-217,7)	174,5 (153,5-224,9)	0,52
Seguimiento a los 6 meses	177 (110-221)	196 (147-205)	0,89
p	0,28	0,26	
Fracción de eyección (%)			
Basal	40 (29,5-45)	30 (24,7-37,2)	0,04
Seguimiento a los 6 meses	45 (30,7-53,7)	35 (24-43)	0,14
p	0,37	0,37	

MET: equivalentes metabólicos; VO_{2máx}: consumo máximo de oxígeno. Valores expresados como mediana (rango intercuartílico).

dencia hacia un aumento de las células *natural killer* (NK) en los pacientes sin diabetes, y una tendencia a un incremento ligero de la viabilidad de las células inyectadas en los pacientes diabéticos.

Los datos ecocardiográficos no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos con respecto a la FEVI y los volúmenes telediastólicos (tabla 2). Sin embargo, se observó una disminución significativa en el volumen telesistólico en el seguimiento en comparación con el basal en los pacientes sin diabetes. A los 6 meses de seguimiento, se observó una mejora significativa tanto en la clase funcional de la New York Heart Association (NYHA) (basal frente a 6 meses, 3 [1,75-3] frente a 1 [1-2]; p = 0,04) como en la puntuación de angina de la clasificación canadiense (CCSAS, 3 [2-4] frente a 1 [1-1,5]; p = 0,04) en los pacientes sin diabetes. Por el contrario, los pacientes diabéticos no mostraron diferencias significativas en el seguimiento: clase NYHA, 3 (1-3) frente a 2 (2-2) (p = 1); CCSAS, 3 (3-3,75) frente a 2 (1,75-3,25) (p = 0,98).

Globalmente (diabéticos junto con no diabéticos), se produjo un aumento significativo en los valores del consumo de oxígeno (VO_{2máx}) al comparar los valores basales con los de seguimiento (15,2 [10,9-18,4] frente a 19,3 [14,7-25,2]; p = 0,01) y en los equivalentes metabólicos (MET) (4,3 [3,1-5,3] frente a 5,3 [3,9-7,4]; p = 0,006). Sin embargo, cuando se separó a los pacientes en dos grupos (diabéticos y no diabéticos), sólo en los no diabéticos se observó un aumento significativo en los valores de VO_{2máx} y de MET (tabla 2), mientras que no hubo cambios significativos en los diabéticos.

DISCUSIÓN

Este estudio clínico con células madre constituye la primera evidencia preliminar de que el tratamiento transendocárdico con CMNMO autólogas parece tener un menor efecto clínico y funcional en los diabéticos que en los pacientes sin diabetes con miocardiopatía isquémica crónica. Cabe pensar en varios mecanismos para explicar estos hallazgos. En primer lugar, la función de las CPE está deteriorada en los diabéticos. Tepper et al⁸ mostraron que en cultivo las CPE circulantes proliferan menos en diabéticos que en los pacientes sin diabetes. En segundo lugar, los monocitos, que desempeñan un papel importante en la angiogénesis y la arteriogénesis, también están alterados en los diabéticos. Waltenberger et al⁹ demostraron que los monocitos de pacientes diabéticos tienen una respuesta atenuada al VEGF en un análisis de migración celular. En este sentido, también hay pruebas sobre el aumento en la expresión miocárdica del VEGF, una reducción en la expresión de su receptor y un descenso en su transducción de señales en diabéticos¹¹.

Otros mecanismos que se han propuesto para explicar la falta relativa de angiogénesis en los pacientes diabéticos son la presencia de productos avanzados finales de la glucosilación¹² y la glucosilación de los factores de crecimiento circulantes, que reduce su función biológica¹³.

Aunque estudios previos tanto preclínicos como clínicos han mostrado que las CMNMO pueden contribuir a incrementar la angiogénesis y la perfusión en

los pacientes con isquemia crónica⁵⁻⁷, los resultados de este estudio parecen indicar que los pacientes diabéticos tendrían una respuesta menos marcada y, por lo tanto, el beneficio de la terapia celular sería menor que en los pacientes no diabéticos. Sin embargo, se necesitan estudios prospectivos, a doble ciego y controlados con placebo que clarifiquen estos hallazgos.

Limitaciones

Se trata de un estudio observacional que procede de dos ensayos clínicos en fase I con un número de pacientes pequeño. Como consecuencia, no está diseñado para detectar la eficacia y esto podría explicar las diferencias observadas en las características basales. Por consiguiente, los resultados obtenidos deben interpretarse con cautela. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha publicado ningún trabajo que haya estudiado específicamente el efecto de la terapia de células madre en este subgrupo de pacientes de alto riesgo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Laakso M, Letho S. Epidemiology of macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Rev.* 1997;5:294-315.
2. Abaci A, Oguzhan A, Kahraman S, Eryol NK, Unal S, Arinc H, et al. Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels. *Circulation.* 1999;99:2239-42.
3. Rivard A, Silver M, Chen D, Kearney M, Magner M, Annex B, et al. Rescue of diabetes-related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF. *Am J Pathol.* 1999;154:355-63.
4. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000;6:389-95.
5. 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;107:2294-302.
6. 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;97:823-9.
7. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet.* 2003; 361:47-9.
8. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation.* 2002;106:2781-6.
9. Waltenberger J, Lange J, Kranz A. Vascular endothelial growth factor-A-induced chemotaxis of monocytes is attenuated in patients with diabetes mellitus: A potential predictor for the individual capacity to develop collaterals. *Circulation.* 2000;102:185-90.
10. Alberti KGMM, Zimmet PZ, for the WHO Consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus: provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998;15:539-53.
11. Sasso FC, Torella D, Carbonara O, Ellison GM, Torella M, Scardone M, et al. Increased vascular endothelial growth factor expression but impaired vascular endothelial growth factor receptor signaling in the myocardium of type 2 diabetic patients with chronic coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 46:827-34.
12. Tamarat R, Silvestre JS, Huijberts M, Benessiano J, Ebrahimian TG, Duriez M, et al. Blockade of advanced glycation end-product formation restores ischemia-induced angiogenesis in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:8555-6.
13. Duraisamy Y, Slevin M, Smith N, Bailey J, Zweit J, Smith C, et al. Effect of glycation on basic fibroblast growth factor induced angiogenesis and activation of associated signal transduction pathways in vascular endothelial cells: possible relevance to wound healing in diabetes. *Angiogenesis.* 2001;4:277-88.