



Original

## Factores que influyen en la liberación de células endoteliales progenitoras y citocinas angiogénicas tras un infarto de miocardio extenso

Antonio Domínguez-Franco<sup>a,b</sup>, Francisco Jesús González<sup>a,b</sup>, Noela Rodríguez-Losada<sup>a,b</sup>, Juan Antonio Marchal<sup>c</sup>, Fernando Cabrera-Bueno<sup>a</sup>, Esmeralda Carrillo<sup>c</sup>, Juan José Gómez-Doblas<sup>a</sup>, Macarena Perán<sup>c</sup>, Juan H. Alonso-Briales<sup>a</sup>, Manuel F. Jiménez-Navarro<sup>a,\*</sup>, Antonia Aránega<sup>b</sup> y Eduardo De Teresa Galván<sup>a</sup>, Red de Investigación Cardiovascular (RECAVA)

<sup>a</sup>Área del Corazón, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, Investigadores RECAVA, Málaga, España

<sup>b</sup>Fundación IMABIS, Instituto Mediterráneo para el Avance de la Biomedicina y la Investigación Biosanitaria, Málaga, España

<sup>c</sup>Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, Universidad de Granada, Granada, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

*Historia del artículo:*

Recibido el 17 de enero de 2011

Aceptado el 31 de mayo de 2011

On-line el xxx

*Palabras clave:*

Infarto agudo de miocardio

Células madre

citoquinas

Reperusión miocárdica

### RESUMEN

**Fundamento y objetivo:** Tras un infarto de miocardio (IM), las células progenitoras endoteliales (CPE) procedentes de la médula ósea son movilizadas hacia sangre periférica. El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar los factores que influyen en dicha movilización celular espontánea.

**Pacientes y método:** En este estudio se han analizado en 47 pacientes con IM extenso (definido por una fracción de eyección ventricular izquierda [FEVI] < 50% por ecocardiografía en la primera semana post-IM), las poblaciones de CPE en sangre periférica (porcentaje sobre células mononucleares periféricas) que expresaban CD133<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, KDR<sup>+</sup>, CXCR4<sup>+</sup>, así como las citoquinas vascular endothelial growth factor (VEGF, «factor de crecimiento vascular endotelial»), stromal cell-derived factor 1 (SDF-1, «factor derivado del estroma tipo 1» y trombospondina 1, determinadas en el día 5 ± 2,5 tras el IM.

**Resultados:** La extensión del IM se correlacionó con el número de células movilizadas ( $r = 0,40$ ;  $p = 0,011$  entre pico de CPK y CD133<sup>+</sup>). Los pacientes que no recibieron reperusión en fase aguda (fibrinólisis/angioplastia) (34%) presentaron más células CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> (mediana [rango intercuartílico]: 2.401 [498-7.004] frente a 999 [100-1.600];  $p = 0,048$ ), así como una fuerte correlación entre VEGF y CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> ( $r = 0,84$ ;  $p < 0,01$ ), entre SDF-1 y CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> ( $r = 0,67$ ;  $p < 0,01$ ), y entre ambas citoquinas ( $r = 0,57$ ;  $p = 0,01$ ). En los pacientes reperfundidos, la correlación VEGF y CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> fue menor ( $r = 0,38$ ;  $p = 0,03$ ) y desapareció la correlación de SDF-1 con CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> y con VEGF. Tras el análisis multivariante, la presencia de VEGF > 7 pg/ml ( $p < 0,01$ ) fue predictora de la movilización de CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>, mientras que la hipertensión ( $p = 0,055$ ) mostró una tendencia. La diabetes ( $p = 0,045$ ) lo fue sobre el número de CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>, presentando el tratamiento de reperusión ( $p = 0,054$ ) una tendencia sobre esta subpoblación.

**Conclusiones:** La movilización de células progenitoras tras IM está influida por factores como la diabetes y la citoquina VEGF. La hipertensión y el tratamiento de reperusión en la fase aguda parecen tener influencia también en la respuesta celular.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Factors influencing mobilisation of endothelial progenitor cells and angiogenic cytokines after an extensive acute myocardial infarction

#### ABSTRACT

*Keywords:*

Acute myocardial infarction

Progenitor cells

Cytokines

Myocardial reperfusion

**Background and objectives:** Following an acute myocardial infarction (AMI), bone-marrow derived endothelial progenitor cells (EPC) are mobilised into the peripheral blood. Our aim was to examine the factors influencing this spontaneous cell mobilisation.

**Patients and methods:** In this study we analysed 47 patients with extensive AMI (left ventricular ejection fraction [LVEF] < 50% by echocardiography during the first week post-AMI); we studied the peripheral

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jimeneznavarro@secardiologia.es (M.F. Jiménez-Navarro).

blood EPC populations expressing CD133<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, KDR<sup>+</sup>, CXCR4<sup>+</sup>, as well as the cytokines VEGF (vascular endothelial growth factor), SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) and TSP-1 (thrombospondin 1), measured on day 5 ± 2.5 after AMI.

**Results:** The extension of AMI (CPK peak) correlated with the number of CD133<sup>+</sup> mobilised cells: ( $r = 0.40$ ;  $P = .011$ ). Patients who did not receive perfusion during the acute phase (34%) had more CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> cells with a median (interquartile ranges) of 2,401 (498-7,004) vs. 999 (100-1,600),  $P = .048$ , and strong correlations between VEGF and CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> ( $r = .84$ ;  $P < .01$ ) and SDF-1 and CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> ( $r = .67$ ;  $P < .01$ ), and between these 2 cytokines ( $r = .57$ ;  $P = .01$ ). In the reperfused patients, the correlation between VEGF and CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> was lower ( $r = .38$ ;  $P = .03$ ) and the correlation between SDF-1 and CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> and VEGF disappeared. Multivariate analysis showed that a VEGF >7 pg/mL ( $P < .01$ ) predicted the mobilisation of CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>, whereas hypertension showed a trend ( $P = .055$ ). Diabetes ( $P = .045$ ) predicted the number of CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>, with reperfusion treatment showing a trend in this subpopulation ( $P = .054$ ).

**Conclusions:** Mobilisation of progenitor cells after AMI is influenced by factors such as diabetes and the cytokine VEGF. Hypertension and reperfusion therapy during the acute phase also tend to influence the cell response.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

Varios autores han descrito cómo el infarto de miocardio (IM) estimula un aumento de células progenitoras endoteliales procedentes de médula ósea, caracterizadas por su capacidad de migración, proliferación y diferenciación en un tipo celular maduro endotelial<sup>1-3</sup>. Estas células, descritas inicialmente por Asahara et al.<sup>4</sup>, expresan en su membrana diferentes marcadores progenitores hematopoyéticos tales como CD34, CD133 y KDR<sup>5,6</sup>. Se caracterizan por formar un grupo de células heterogéneas presentes en diferentes estadios de diferenciación endotelial. Se ha sugerido que este tipo celular, por sus características propias y su capacidad de transdiferenciación<sup>7</sup>, podrían desempeñar un papel importante en la regeneración cardíaca. Por ello han sido administradas a pacientes en fase aguda del infarto de miocardio, observándose un discreto beneficio sobre el remodelado postinfarto<sup>8</sup>.

Por otra parte, tras el infarto también se ha observado un incremento de la población celular que expresa el antígeno de superficie CXCR4<sup>+</sup> en sangre periférica (receptor de la citoquina *stromal cell-derived factor 1* [SDF-1, «factor derivado del estroma tipo 1»])<sup>9</sup>, siendo este eje SDF-1/CXCR4<sup>+</sup> de especial importancia en la quimiotaxis y anidación de células en el tejido miocárdico isquémico.

Sin embargo, aún no se conocen en profundidad los mecanismos que regulan esta movilización espontánea de células progenitoras post-IM<sup>10</sup>. El objetivo de nuestro trabajo fue, por tanto, analizar la influencia de los diferentes factores de riesgo, las características relativas al infarto y su manejo terapéutico sobre la liberación a sangre periférica de citoquinas y células progenitoras en respuesta a la isquemia.

## Material y método

### Pacientes

Durante los meses consecutivos entre mayo de 2008 y febrero de 2009 se incluyeron en el estudio los pacientes ingresados con el diagnóstico de IM con elevación del segmento ST y fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) deprimida (< 50%), determinada por ecocardiografía mediante método de Simpson (según recomendaciones de la Asociación Americana de Ecocardiografía)<sup>11</sup>, con una media de 5 días posinfarto. Los criterios de exclusión fueron: enfermedades malignas, disfunción renal o hepática, y el abandono del estudio por parte de los pacientes. Finalmente, 47 pacientes fueron seleccionados para el estudio y análisis. El diagrama de flujo de pacientes se muestra en la figura 1.

Se registraron variables demográficas, de las características del IM y tratamiento recibido. La definición de factores de riesgo cardiovascular siguió los estándares de la ACC/AHA<sup>12</sup>. Se consideró antecedente de tabaquismo si el paciente había fumado en el mes previo al ingreso. Se analizó el tratamiento de reperfusion empleado (fibrinólisis, angioplastia coronaria transluminal percutánea, ninguno), así como la presencia de insuficiencia cardíaca en fase aguda (clasificación Killip). Se determinaron los valores de creatinfosfoquinasa (CPK), CPK-mb y troponina I. Todos los pacientes fueron sometidos a coronariografía durante el ingreso y recibieron tratamiento médico incluyendo ácido acetilsalicílico (AAS), clopidogrel, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II, betabloqueantes y estatinas. El estudio fue aprobado por un Comité de Ética conforme con los principios

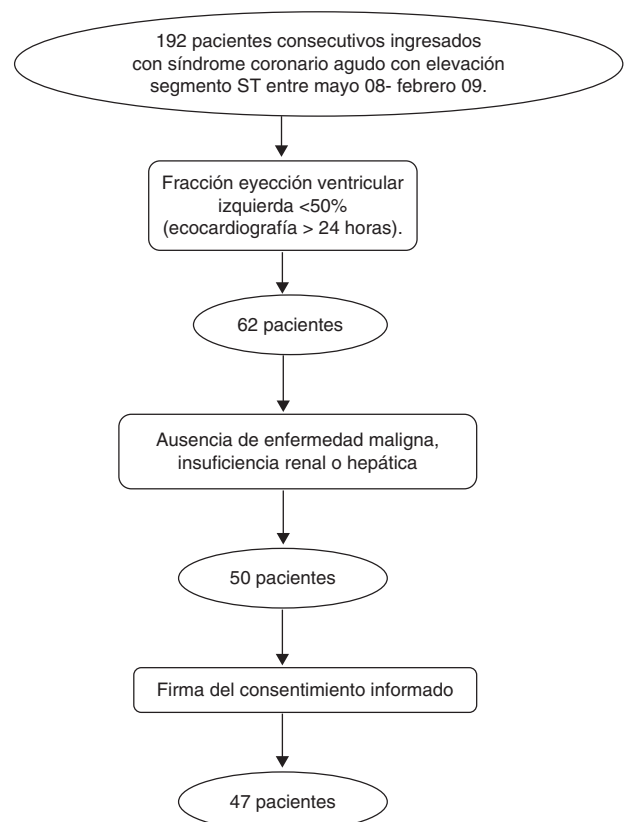


Figura 1. Diagrama de flujo de los pacientes.

indicados en la Declaración de Helsinki, solicitándose consentimiento informado en todos los pacientes.

#### Determinación de los valores de los factores de crecimiento angiogénicos

Una vez confirmada por ecocardiografía la presencia de FEVI deprimida, se procedió a la extracción de la muestra sanguínea venosa periférica. La sangre periférica se recolectó en tubos estériles con ácido etilendiaminotetraacético como anticoagulante. La muestra fue procesada dentro de los 30 minutos desde la extracción de la sangre. El plasma se obtuvo por doble centrifugación, la primera se realizó durante 15 minutos (1.000 g a 4 °C) y la segunda se llevó a cabo para la eliminación de los posibles restos plaquetarios que pudieran inferir en el análisis a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta el momento del análisis. Mediante la técnica de enzoinmunoanálisis se determinaron las concentraciones de las citoquinas *vascular endothelial growth factor* (VEGF, «factor de crecimiento vascular endotelial»), CXCL12/SDF-1 y trombospondina-1 (TSP-1) siguiendo los consejos de manufacturación de la casa comercial (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.). Las lecturas fueron determinadas a una absorbancia de 450 nm y los valores mínimos detectados para VEGF, CXCL12/SDF-1α y TSP-1 fueron, respectivamente, 7 pg/ml, 18 pg/ml y 0,355 ng/ml.

#### Cuantificación de las subpoblaciones de las células progenitoras circulantes por citometría de flujo

Se extrajeron 9 ml de sangre periférica venosa en tubos de heparina y diluida en PBS en una ratio 1:6. El aislamiento de las células mononucleadas se realizó mediante la solución de HISTOPAQUE<sup>®</sup>-1077 (Sigma-Aldrich, Alemania). Se empleó para el análisis por citometría de flujo una concentración final de células  $1 \times 10^6$  células ml<sup>-1</sup>. Las células fueron incubadas con el marcador de viabilidad 7-AAD en DMEN con 1% FBS (suero bovino fetal) durante 30 minutos a 37 °C, se lavaron con PBS y fueron teñidas con los siguientes marcadores de membrana para citometría: CD133-PE (Miltenyi Biotec, Alemania), CD34-FITC, KDR-APC, CXCR4-PE y CD34-FITC (BD Pharmigen, EE.UU.). Se utilizaron los isotipos controles IgG conjugados con ficoeritrina, isotiocianato de fluoresceína y alofococianina, respectivamente (Miltenyi Biotec, Alemania). El análisis se realizó en un citómetro de flujo modelo Moflo-DAKO, empleando el *software* Summit v.4.

#### Análisis estadístico

Todos los datos cuantitativos se expresan como media ± desviación estándar y los cualitativos como porcentajes. Las características cualitativas basales se compararon utilizando el test exacto de Fisher. El test de Shapiro-Wilk se utilizó para evaluar la normalidad de las variables continuas. Los valores de las células circulantes, VEGF, SDF-1 y TSP-1 siguieron una distribución de no normalidad, de ahí que los análisis de los datos y su relación con las variables clínico-patológicas se realizaron por tests no paramétricos. El test U de Mann-Whitney y el de Kruskal-Wallis se utilizaron para analizar las diferencias entre grupos. Las correlaciones se analizaron usando el coeficiente de correlación de Spearman. Un valor de p inferior a 0,05 fue considerado como estadísticamente significativo. Debido a las múltiples pruebas univariantes, para mantener un nivel de error global del 5% fue aplicado el algoritmo de corrección del nivel de error de Bonferroni. Se hicieron 2 modelos de análisis de regresión lineal múltiple. En uno de ellos usamos CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> como variable continua dependiente y la hipertensión, FEVI y VEGF como parámetros independientes. En el otro modelo, CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>

fue la variable dependiente y la terapia de reperfusión, SDF-1 y la diabetes mellitus los parámetros independientes. Utilizamos estas 2 poblaciones celulares por ser las que reúnen criterios más estrictos de células progenitoras<sup>5,6,9,10</sup>. El criterio para la selección de variables independientes fue la presencia de p < 0,2 en el análisis bivariante. Los análisis estadísticos se realizaron con el SPSS para Windows, utilizando la versión de *software* 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

## Resultados

### Características poblacionales

Las características basales se recogen en la *tabla 1*. En 25 pacientes, bajo criterio médico, se realizó fibrinólisis con TNK (precisando 8 de ellos angioplastia de rescate) y en 6 se realizó angioplastia primaria. Un total de 16 pacientes (34%) no recibieron terapia de reperfusión por criterio de retraso temporal, aunque todos recibieron tratamiento con AAS, heparina y medicación antianginosa. La razón de este porcentaje de infartos evolucionados o no reperfundidos incluidos en el trabajo es debida a la no selección de los pacientes en las 24 primeras horas de infarto. El principal criterio para la inclusión de los pacientes fue la presencia

**Tabla 1**

Características basales clínicas de los pacientes y cuantificación del número de células progenitoras y citoquinas

|   | (n = 47)                  |
|---|---------------------------|
| <b>Características basales</b>                      |                           |
| Edad, media ± DE, años                              | 63 ± 10                   |
| Varón/mujer   | 39 (83%)/8 (17%)          |
| Fumador activo                                      | 19 (40,4%)                |
| Diabetes mellitus                                   | 17 (36,1%)                |
| Hipertensión  | 22 (46,8%)                |
| Hiperlipidemia                                      | 26 (55,3%)                |
| Infarto inferior                                    | 14 (29,8%)                |
| Infarto anterior                                    | 33 (70,2%)                |
| Killip II/III                                       | 8 (17%)                   |
| ACTP primaria/rescate                               | 14 (29,8%)                |
| Fibrinólisis  | 25 (53%)                  |
| No tratamiento de reperfusión                       | 16 (34%)                  |
| FEVI global media ± DE (%)                          | 38,09 ± 9,4               |
| FEVI < 40% (%)                                      | 29 (61,7%)                |
| Pico de CPK (U/l)                                   | 2.649 ± 2.105             |
| Pico de troponina                                   | 120 ± 73                  |
| Enfermedad de un vaso                               | 27 (57,5%)                |
| Enfermedad de 2 vasos                               | 9 (19,1%)                 |
| Enfermedad de 3 vasos                               | 11 (23,4%)                |
| Tratamiento percutáneo                              | 43 (91,5%)                |
| Tratamiento quirúrgico                              | 4 (8,5%)                  |
| <b>Células progenitoras</b>                         |                           |
| Tiempo (días) IM-determinación (media ± DE)         | 5,1 ± 2,5                 |
| CD34 <sup>+</sup>                                   | 8.500 (2.043-15.477)      |
| CD133 <sup>+</sup>                                  | 3.729 (1.829-21.225)      |
| KDR <sup>+</sup>                                    | 4.998 (1.675-20.112)      |
| CD34 <sup>+</sup> 133 <sup>+</sup>                  | 102 (0-236)               |
| CD133 <sup>+</sup> KDR <sup>+</sup>                 | 300 (101-919)             |
| CD34 <sup>+</sup> 133 <sup>+</sup> KDR <sup>+</sup> | 98 (0-200)                |
| CXCR4 <sup>+</sup>                                  | 292.949 (159.474-482.095) |
| CD34 <sup>+</sup> CXCR4 <sup>+</sup>                | 1.294 (276-2.675)         |
| <b>Citocinas</b>                                    |                           |
| VEGF (pg/ml)  | 7 (7-33)                  |
| SDF-1 (pg/ml)                                       | 1.529 (1.356-1.856)       |
| TSP-1 (ng/ml)                                       | 209 (100-490)             |
| VEGF/TSP-1  | 0,06 (0,03-0,13)          |
| SDF-1/TSP-1   | 7,50 (3,90-17,40)         |

Datos presentados como números de células progenitoras/10<sup>6</sup> células mononucleadas de sangre periférica, mediana (intervalo intercuartílico).

ACTP: angioplastia coronaria transluminal percutánea; CPK: creatinfosfoquinasa; DE: desviación estándar; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; IM: infarto de miocardio; SDF-1: *stromal cell-derived factor 1*, «factor derivado del estroma tipo 1»; TSP-1: trombospondina 1; VEGF: *vascular endothelial growth factor*, «factor de crecimiento vascular endotelial».

**Tabla 2**  
Características de los pacientes reperfundidos en fase aguda y no reperfundidos

|   | Reperfundidos, n = 31 | No reperfundidos, n = 16 | p     |
|---|-----------------------|--------------------------|-------|
| Edad, media ± DE, años                      | 60 ± 81               | 68 ± 81                  | 0,011 |
| Varón                                       | 27 (87%)              | 12 (75%)                 | 0,41  |
| Fumador activo                              | 16 (51,55)            | 3 (18,8%)                | 0,03  |
| Diabetes mellitus                           | 11 (35,5%)            | 6 (37,5%)                | 0,89  |
| Hipertensión                                | 14 (45,2%)            | 8 (50%)                  | 0,75  |
| Hiperlipidemia                              | 21 (67,7%)            | 9 (56,2%)                | 0,40  |
| Infarto anterior                            | 24 (77,4%)            | 9 (56,3%)                | 0,18  |
| Killip II/III                               | 5 (16,1%)             | 3 (18,8%)                | 0,68  |
| FEVI global media ± DE (%)                  | 40,4 ± 9              | 33,44 ± 8                | 0,015 |
| Pico de CPK (UI/l)                          | 3.254 ± 2.211         | 1.483 ± 1.280            | 0,002 |
| Enfermedad multivaso                        | 11 (37,9%)            | 7 (50%)                  | 0,52  |
| Tiempo (días) IM-determinación (media ± DE) | 5 ± 2,7               | 5,4 ± 2,2                | 0,64  |

CPK: creatinfosfoquinasa; DE: desviación estándar; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; IM: infarto de miocardio.

de disfunción ventricular (< 50% de FEVI), que se determinó a partir del segundo día de infarto y por ello los infartos evolucionados (con mayor probabilidad de ser más extensos) tuvieron probabilidad de ser incluidos. Estos datos concuerdan con los de grandes registros en los que un tercio de pacientes con síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST no reciben terapia de reperfusión en la práctica habitual<sup>13,14</sup>.

Las características basales de los pacientes en función de haber recibido o no terapia de reperfusión se muestran en la **tabla 2**. Los pacientes que no fueron sometidos a reperfusión tuvieron mayor edad, sin diferencias en el resto de características basales. Dichos pacientes presentaron en la evolución una menor FEVI residual y un menor pico de CPK. La determinación de las células progenitoras y citoquinas en sangre periférica se realizó en la mayoría de casos en el día 5 post-IM (media de 5,1 ± 2,5 días), no existiendo diferencias en el número de células movilizadas en función del día en que fue tomada la muestra.

#### Correlaciones entre las células progenitoras y los valores de los factores de crecimiento angiogénicos

Al estudiar la relación de los valores de citoquinas angiogénicas con la movilización de las células progenitoras, se observa una correlación significativa y positiva entre los valores de VEGF y aquellas subpoblaciones progenitoras que expresan el marcador CD133, siendo dicha correlación más elevada en la subpoblación CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> (r = 0,623, p < 0,001). Por otro lado, SDF-1 muestra correlación con CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> (r = 0,331, p = 0,025). Ambas citoquinas presentan una correlación positiva débil entre sí (r = 0,300, p = 0,041). No se observa correlación entre los valores plasmáticos de TSP-1 y las diferentes células progenitoras estudiadas.

#### Factores de riesgo cardiovascular y movilización celular postinfarto agudo de miocardio

No encontramos diferencias por edad, presencia de dislipidemia o tabaquismo y las diferentes poblaciones celulares. Los pacientes hipertensos presentaron mayor recuento de células CD34<sup>+</sup>133<sup>+</sup>: mediana (extremos) de 200 (100-328) frente a 97 (0-147), p = 0,02. Existió una tendencia a encontrar mayores valores de citoquinas en los hipertensos: VEGF 12,3 pg/ml (7-74,03) frente a 7 pg/ml (7-22,25), p = 0,13; SDF-1 1.653 pg/ml (1.427-1.926) frente a 1.426 pg/ml (1.330-1.726), p = 0,075. Por otra parte, dichos pacientes presentaron una fuerte correlación en ambos ejes: VEGF/CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>: r = 0,7, p < 0,01; y SDF-1/CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> r = 0,59, p = 0,003. En el caso de los no hipertensos la correlación de VEGF fue más débil (r = 0,455, p = 0,025), perdiéndose entre SDF-1 y CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>. En los pacientes diabéticos, encontramos menores valores de SDF-1, 1.421 pg/ml (1.217-1.681) frente a 1.561 pg/ml

(1.409-1.916), p = 0,06. En esta población, SDF-1 pierde la relación con CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>, mientras que el eje VEGF/CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> mantiene una correlación fuerte (r = 0,739, p < 0,01). En los no diabéticos, VEGF/CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> mantiene una correlación menor (r = 0,526, p = 0,03) y SDF-1 presenta correlación con CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> (r = 0,432, p = 0,019).

#### Función ventricular y extensión del infarto agudo de miocardio

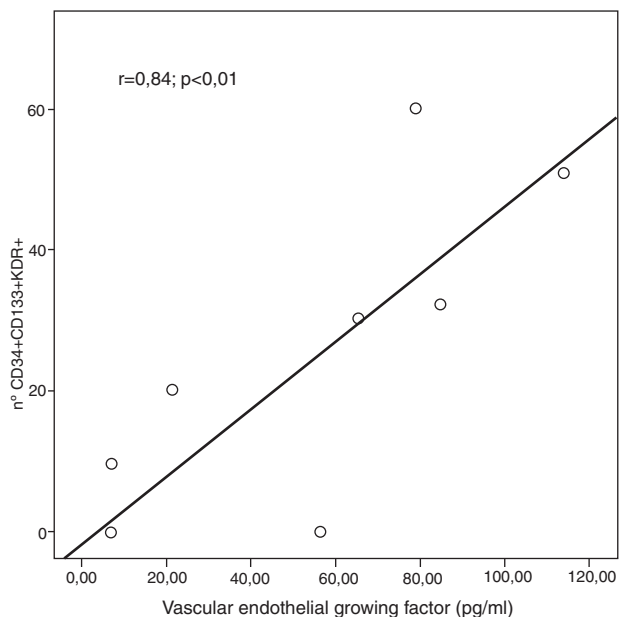
Encontramos una correlación positiva entre el pico de CPK y la población CD133<sup>+</sup> (r = 0,40, p = 0,01). Por otra parte, los pacientes con FEVI < 35% presentaron una tendencia a mayor número de células CD133<sup>+</sup>: 14.200 (2.898-26.449) frente a 2.605 (1.301-17.746), p = 0,086.

#### Influencia del tratamiento de reperfusión inicial

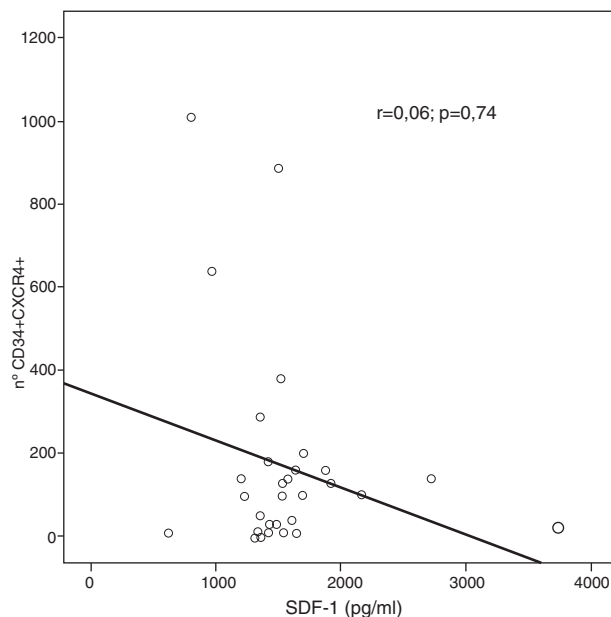
Los pacientes que no recibieron tratamiento de reperfusión en fase aguda presentaron mayor número de células CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>: 2.401 (498-7.004) frente a 999 (100-1.600), p = 0,048, sin diferencias en las otras poblaciones celulares. Así mismo, presentaron valores de la citoquina SDF-1 de 1.759 pg/ml (1.360-2.012) frente a 1.496 pg/ml (1.356-1.649), p = 0,12, sin diferencias en VEGF. Los pacientes no reperfundidos presentaron fuertes correlaciones entre ambas citoquinas (VEGF y SDF-1: r = 0,57, p = 0,019) así como entre VEGF/CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> (r = 0,84, p < 0,01) (**fig. 2**) y SDF-1/CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> (r = 0,67, p < 0,01) (**fig. 3**). Sin embargo, en los reperfundidos esta correlación entre ambas citoquinas desaparece, se pierde la relación SDF-1 y CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> (**fig. 4**), mientras que la correlación VEGF/CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> se hace débil (r = 0,38, p = 0,03) (**fig. 5**).

#### Predictores del número de células CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>

Construimos 2 modelos de regresión lineal múltiple. Uno con la variable de respuesta CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> y con VEGF > 7 pg/ml, FEVI < 35% y la presencia de hipertensión como variables independientes, presentando el modelo una capacidad de predicción de R<sup>2</sup> = 0,28, mostrándose como factores predictores independientes del número de células CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> movilizadas: la presencia de VEGF > 7 pg/ml (( = 0,014, p = 0,02), mientras que la existencia de hipertensión (( = 0,009, p = 0,055) mostró una tendencia (**tabla 3**). En un segundo modelo, introducimos como variable respuesta CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> y como predictores SDF-1, la diabetes mellitus, el pico de troponina y la presencia de tratamiento de reperfusión inicial. La capacidad predictiva del modelo fue R<sup>2</sup> = 0,40, siendo factor predictor independiente del número de células CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> la presencia de diabetes (( = 0,21, p = 0,045), mientras que la ausencia de tratamiento inicial de reperfusión (( = -0,22, p = 0,054) mostró una tendencia (**tabla 4**).



**Figura 2.** Correlación en pacientes no reperfundidos entre vascular endothelial growth factor (VEGF, «factor de crecimiento vascular endotelial») y los niveles de células CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>.



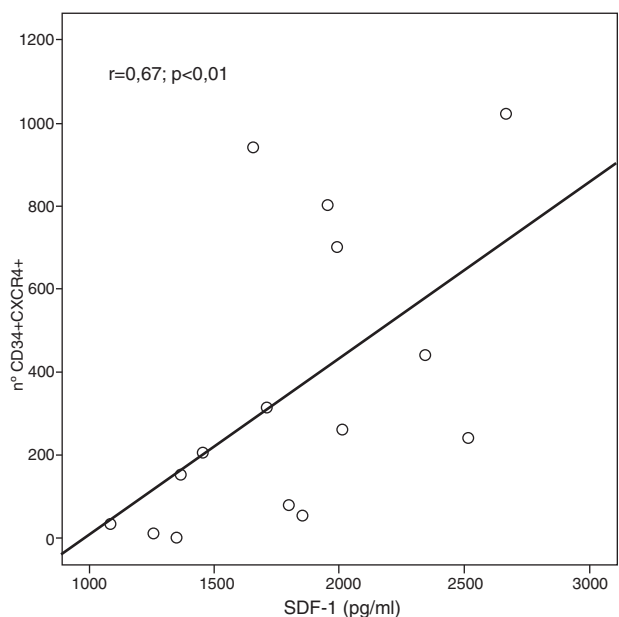
**Figura 4.** Correlación en pacientes reperfundidos entre stromal cell-derived factor 1 (SDF-1, «factor derivado del estroma tipo 1») y los niveles de células CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>.

**Discusión**

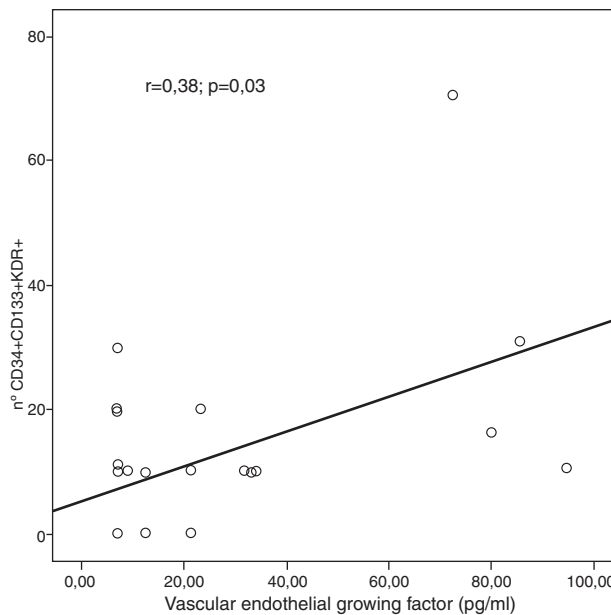
Nuestro trabajo muestra cómo el número de células progenitoras CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> depende de la presencia elevada de VEGF y de la existencia de hipertensión arterial, mientras la diabetes mellitus y la ausencia de tratamiento de reperusión inicial influyen de forma independiente en el número circulante de células CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> tras un IM extenso.

La presencia de mayores valores de células CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> y de un patrón de citoquinas proangiogénicas totalmente diferente en los pacientes que no recibieron reperusión por retraso temporal en las primeras 24 horas frente a los que la recibieron (angioplastia

primaria/rescate o fibrinólisis) es uno de los hallazgos más relevantes. El porcentaje de pacientes que no recibieron terapia de reperusión fue similar al comunicado en grandes registros de síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST<sup>13,14</sup>. En cuanto a las características basales de ambos grupos, solo encontramos diferencias en la edad. Solo un trabajo en la literatura médica<sup>15</sup> expresa el efecto inhibitor sobre la liberación de CD34<sup>+</sup> de la revascularización del vaso culpable tras el infarto. Nuestro estudio no solo muestra dicha inhibición (en este caso sobre CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>), sino que también detecta mayores valores de SDF-1 en los pacientes no reperfundidos en fase aguda y con una correlación fuerte con CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> (r = 0,67, p < 0,01). Además,



**Figura 3.** Correlación en pacientes no reperfundidos entre stromal cell-derived factor 1 (SDF-1, «factor derivado del estroma tipo 1») y los niveles de células CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>.



**Figura 5.** Correlación en pacientes reperfundidos entre vascular endothelial growth factor (VEGF, «factor de crecimiento vascular endotelial») y los niveles de células CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>.

**Tabla 3**  
Predictores de la movilización de la subpoblación CD34<sup>+</sup>133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> postinfarto agudo de miocardio

|              | CD34 <sup>+</sup> 133 <sup>+</sup> KDR <sup>+</sup> <sup>a</sup> | β no ajustado | β ajustado | Intervalo de confianza del 95% para β ajustado | p     |
|--------------|--|---------------|------------|--|-------|
| VEGF (pg/ml) |  |               |            |  |       |
| > 7 pg/ml    | 105 (98-306)   | 0,015         | 0,014      | (0,005-0,0023)                                 | 0,002 |
| = 7 pg/ml    | 0 (0-100)  |               |            |  |       |
| HTA          |  |               |            |  |       |
| Sí           | 102 (0-302)  | 0,011         | 0,009      | (0-0,017)                                      | 0,055 |
| No           | 48 (0-102)   |               |            |  |       |

Para el modelo: R<sup>2</sup>=0,28; p=0,01.

<sup>a</sup> Los datos son representados como números de células progenitoras/10<sup>6</sup> células mononucleadas de sangre periférica, mediana (rango intercuartílicos). Coeficiente β ajustado para niveles de vascular endothelial growth factor (VEGF, «factor de crecimiento vascular endotelial»), hipertensión arterial (HTA) y fracción de eyección ventricular izquierda.

**Tabla 4**  
Predictores de la movilización de la subpoblación CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> postinfarto agudo de miocardio

|                        | CD34 <sup>+</sup> CXCR4 <sup>+</sup> <sup>a</sup> | β no ajustado | β ajustado | Intervalo de confianza del 95% para β ajustado | p     |
|------------------------|---|---------------|------------|--|-------|
| Diabetes mellitus      |   |               |            |  |       |
| Sí                     | 1.398 (342-6.703)                                 | 0,25          | 0,21       | (0,006-0,418)                                  | 0,045 |
| No                     | 1.008 (100-2.001)                                 |               |            |  |       |
| Terapia de reperfusión |   |               |            |  |       |
| Sí                     | 999 (100-1.600)                                   | -0,26         | -0,22      | (-0,445-0,004)                                 | 0,054 |
| No                     | 2.401 (498-7.004)                                 |               |            |  |       |

Para el modelo: R<sup>2</sup>=0,40, p=0,013.

<sup>a</sup> Los datos son representados como números de células progenitoras/10<sup>6</sup> células mononucleadas de sangre periférica, mediana (rango intercuartílicos). Coeficiente β ajustado para niveles de stromal cell-derived factor 1 (SDF-1, «factor derivado del estroma tipo 1»), troponina, diabetes mellitus y terapia de reperfusión.

en esta situación de isquemia no solucionada se objetiva correlación entre ambas citoquinas (SDF-1 y VEGF), relación que desaparece en los pacientes tratados en fase aguda. Estos hallazgos apoyarían la hipótesis de una mayor activación y colaboración de diferentes citoquinas proangiogénicas ante una situación de isquemia mantenida, como lo es un IM sin reperfusión en fase aguda.

Es conocido que tras un evento isquémico mayor se produce una liberación de células mononucleares desde la médula ósea y de factores quimioatrayentes (citoquinas) con el objetivo de «reparar» el daño isquémico<sup>1-6</sup>. Así, se han puesto en marcha diferentes ensayos clínicos de terapia celular con resultados prometedores<sup>16,17</sup>. Los diferentes factores de riesgo cardiovascular favorecen el proceso de arteriosclerosis desde su origen, produciendo el daño endotelial. Hill et al.<sup>18</sup> han mostrado que el número de células endoteliales progenitoras se correlaciona fuertemente con la función endotelial en individuos con factores de riesgo pero sin enfermedad cardiovascular conocida. Otros estudios concluyen que el número y la capacidad funcional de dichas células se encuentran inversamente relacionados con los factores de riesgo cardiovascular en pacientes con enfermedad coronaria<sup>19,20</sup>.

En nuestro estudio, los pacientes hipertensos presentaron, tras ajuste multivariante, mayor número de células CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>, probablemente debido al efecto potenciador de la angiotensina II sobre VEGF<sup>21</sup>. Sin embargo, estudios previos han demostrado que la hipertensión es uno de los mayores predictores de disminución de la capacidad migratoria de estas células<sup>22,23</sup>.

Los pacientes diabéticos presentaron menores valores de todas las poblaciones celulares (sin diferencias significativas), como ha sido descrito en anteriores estudios<sup>24,25</sup>, salvo la subpoblación CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>, que mostró una tendencia a mayores valores en los diabéticos. También es conocido que las poblaciones de células progenitoras presentan disfunción en el marco de la diabetes mellitus. De especial importancia es el eje CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>/SDF-1 en esta subpoblación. Nuestro trabajo muestra menores valores plasmáticos de SDF-1 en los diabéticos, así como ausencia de correlación con CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>. En modelos animales<sup>26</sup>, la

restitución del déficit de SDF-1 ha demostrado mejorar la funcionalidad de la población celular CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>.

La extensión del daño miocárdico es otro factor para activar la movilización celular. En nuestro estudio, a diferencia de otros datos publicados previamente<sup>27</sup>, existe una relación inversa entre el número de células y la FEVI, presentando los pacientes con FEVI < 35% mayor movilización de células progenitoras. Estas diferencias pueden deberse al distinto protocolo de inclusión y determinación celular. Leone et al.<sup>28</sup>, en la línea de nuestros resultados, han comunicado que el infarto de localización anterior (más extenso) es un factor predictor independiente de una mayor movilización celular espontánea tras el infarto.

El reducido número de pacientes estudiados puede limitar el poder estadístico del trabajo. Los resultados obtenidos en nuestro análisis deben tomarse con cautela, ya que los modelos de regresión lineal múltiple explican el 28 y el 40%, respectivamente, de la variabilidad total de CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>, sugiriendo una marcada variabilidad intraindividuo o la presencia de otros factores no conocidos. El hecho de haber realizado una sola determinación de células y no de forma uniforme en el tiempo en todos los pacientes también constituye otra limitación. Shintani et al.<sup>1</sup> fueron los primeros en demostrar la elevación de células CD34<sup>+</sup> y VEGF en humanos postinfarto alcanzando el pico máximo en el séptimo día. Leone et al.<sup>28</sup> muestran en su serie cómo la mayoría de pacientes con infarto presentan el pico de células CD34<sup>+</sup> en el quinto día post-IM, lo cual coincide con la mayoría de los pacientes de nuestro trabajo, por lo que pensamos que este hecho no debería influir en las conclusiones finales del estudio. Por último, debemos poner énfasis en que los resultados obtenidos son aplicables a la población de estudio: pacientes con IM extenso con elevación del segmento ST (con fracción de eyección menor del 50%) y que sobreviven a la fase aguda del infarto.

En conclusión, la movilización de células progenitoras tras IM está influida por factores como la diabetes y la citoquina VEGF. La hipertensión y el tratamiento de reperfusión en fase aguda parecen tener influencia también en la respuesta celular.

## Financiación

Este trabajo fue financiado por subvenciones (TCMR014/2006 y TCMR018/2005) de la Consejería de Salud, Junta de Andalucía, y la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia (proyecto de excelencia número CTS-6568) de España. Estudio parcialmente financiado por Beca de la Sección de Hipertensión Arterial 2010 (Daichi-Sankyo) de la Sociedad Española de Cardiología.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

En especial, a la Licenciada en Biología y estudiante predoctoral C. Rueda-Martínez, del Laboratorio de Investigación Biomédica (IMABIS), por su ayuda desinteresada en la ejecución y edición de este trabajo, y a la Técnica del Laboratorio de Investigación Biomédica (IMABIS) Beatriz Segura Segura, por su ayuda en la realización de este trabajo.

## Bibliografía

1. 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.
2. Yeh ET, Zhang S, Wu HD, Körbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+ enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation*. 2003;108:2070-3.
3. Leone AM, Rutella S, Bonanno G, Contemi AM, de Ritis DG, Giannico MB, et al. Endogenous G-CSF and CD34+ cell mobilization after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2006;111:202-8.
4. 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.
5. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004;95:343-53.
6. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007;109:1801-9.
7. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999;85:221-8.
8. 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.
9. Wojakowski W, Tendera M, Michalowska A, Majka M, Kucia M, Maslankiewicz K, et al. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004;110:3213-20.
10. Barquero J, Pellicer M, Pétriz J. Aplicaciones terapéuticas de las células madre. *Med Clin (Barc)*. 2005;124:504-11.
11. Cannon CP, Battler A, Brindis RG, Cox JL, Ellis SG, Every NR, et al. American College of Cardiology key data elements and definitions for measuring the clinical management and outcomes of patients with acute coronary syndromes. A report of the American College of Cardiology Task Force on Clinical Data Standards (Acute Coronary Syndromes Writing Committee). *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:2114-30.
12. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, DeMaria A, Devereux R, Feigenbaum H, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr*. 1989;2:358-67.
13. Figueras J, Heras M, Baigorri F, Elosua R, Ferreira I, Santaló M. Resultados del III registro IAM CAT de pacientes con infarto de miocardio con elevación del segmento ST en Cataluña. Comparación con los registros IAM CAT I y II. *Med Clin (Barc)*. 2009;133:694-701.
14. Mandelzweig L, Battler A, Boyko V, Bueno H, Danchin N, Filippatos G, et al. The second Euro Heart Survey on acute coronary syndromes: Characteristics, treatment, and outcome of patients with ACS in Europe and the Mediterranean Basin in 2004. *Eur Heart J*. 2006;27:2285-93.
15. Muller-Ehmsen J, Scheid C, Grundmann F, Hirsch I, Turan G, Tossios P, et al. The mobilization of CD34 positive mononuclear cells after myocardial infarction is abolished by revascularization of the culprit vessel. *Int J Cardiol*. 2005;103:7-11.
16. 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.
17. Bartunek J, Dimmeler S, Drexler H, Fernández-Avilés 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.
18. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003;348:593-600.
19. Shantsila E, Watson T, Lip GY. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:741-52.
20. Turan RG, Brehm M, Koestering M, Tobias Z, Bartsch T, Steiner S, et al. Factors influencing spontaneous mobilization of CD34+ and CD133+ progenitor cells after myocardial infarction. *Eur J Clin Invest*. 2007;37:842-51.
21. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced proliferation and network formation of endothelial progenitor cells. *Hypertens Res*. 2004;27:101-8.
22. 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.
23. Imanishi T, Moriwaki C, Hano T, Nishio I. Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 2005;23:1831-7.
24. 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.
25. Fadini GP, Miorin M, Facco M, Bonamico S, Baesso I, Grego F, et al. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1449-57.
26. Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, Chen H, Goldstein LJ, Buerk DG, et al. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha. *J Clin Invest*. 2007;117:1249-59.
27. Wojakowski W, Tendera M, Zebzda A, Michalowska A, Majka M, Kucia M, et al. Mobilization of CD34(+), CD117(+), CXCR4(+), c-met(+) stem cells is correlated with left ventricular ejection fraction and plasma NT-proBNP levels in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2006;27:283-9.
28. Leone AM, Rutella S, Bonanno G, Abbate A, Rebuzzi AG, Giovannini S, et al. Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function. *Eur Heart J*. 2005;26:1196-204.