



# Trasplante autólogo de células mononucleares progenitoras derivadas de la médula ósea para inducir angiogénesis en pacientes con isquemia severa en extremidades inferiores

Luis Padilla,<sup>\*,†</sup> Juan Rodríguez-Trejo,<sup>§</sup> Ignacio Escotto,<sup>§</sup> José De Diego,<sup>||</sup> Neftalí Rodríguez,<sup>§</sup> Jesús Tapia,<sup>‡</sup> Takeshi Landero,<sup>\*</sup> Pilar Hazel Carranza,<sup>\*</sup> Nora Lecuona,<sup>§</sup> Horacio Olguín,<sup>\*</sup> Miryam Marmolejo,<sup>||</sup> Mauricio Di Silvio López<sup>\*</sup>

## Resumen

**Objetivos:** Comparar el trasplante de células mononucleares progenitoras derivadas de médula ósea (CMN) vía intramuscular e intravenosa retrógrada distal por vena safena (IM+IV), contra la inyección intramuscular (IM) en pacientes con isquemia severa en miembros inferiores (ISMI). **Material y métodos:** Se evaluaron 20 extremidades de 14 pacientes con ISMI (Fontaine II-b, Rutherford 3). Grupo No. 1: 10 extremidades con trasplante de CMN por vía IM, y Grupo No. 2: 10 extremidades con trasplante de CMN por vía IM+IV. Se aplicó factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) durante 5 días (5 µg s.c.) y se realizó aféresis. Las células totales trasplantadas fueron  $15.3 \times 10^8 \pm 5.6 \times 10^8$  CD34+. **Resultados:** El seguimiento promedio fue de 23 meses. En el primer grupo fue necesaria una amputación, la distancia sin dolor mejoró de 62 a 350 m, el índice brazo/tobillo (IBT) mejoró de 0.42 a 0.68 y las unidades de perfusión por láser Doppler (UP) mejoraron en un rango de 7.14 a 225.31. En el grupo No. 2, no hubo amputaciones, la distancia mejoró de 57 a 450 m, el IBT mejoró de 0.38 a 0.65 y las UP mejoraron en un rango de 6.64 a 299.2. **Conclusiones:** El trasplante de CMN por IM o IM+IV en pacientes con ISMI, logra

## Summary

**Objectives:** To compare between bone marrow progenitor mononuclear cell (MNC) transplant applied via intramuscular and distal retrograde intravenous (saphenous vein), and intramuscular injection, in patients with severe ischemia of lower extremity. **Material and methods:** 20 lower extremities in 14 patients with severe ischemia (Fontaine II-b, Rutherford 3) Group 1 (IM): 10 extremities with MNC applied via intramuscular, and Group 2 (IM+IV): 10 extremities with MNC transplant applied via intramuscular and distal retrograde intravenous (saphenous vein). Cellular harvest was enriched with granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) for 5 days (5 µg s.c.). Total cell transplant count was  $15.3 \times 10^8 \pm 5.6 \times 10^8$  CD 34+. **Results:** Mean treatment follow-up was 23 months; Group 1: 1 extremity amputation was necessary. In the rest, distal pain disappeared for 62-350 m, ankle/arm index was 0.42 to 0.68, and measure of perfusion by Doppler Laser was 7.14 to 225.31. Group 2: No amputations were necessary, pain distance ranged from 57-450 m, ankle/arm index ranged from 0.38 to 0.65 and perfusion went from 6.64 to 299.2. **Conclusions:** Both IM and IM+IV MNC transplant result in effective neo-vascularization,

\* Servicio de Cirugía Experimental, Unidad de Microcirugía y Laboratorio de Cultivo y Trasplante Celular (ISSSTE-UNAM). Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE.

† Departamento de Cirugía. Unidad de Microcirugía. Facultad de Medicina. UNAM.

§ Servicio de Angiología, Cirugía Vascular y Endovascular. Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE.

|| Servicio de Hematología Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE.

Correspondencia:

Luis Padilla. Correo electrónico: lpadilla@issste.gob.mx

Aceptado: 31-01-2011.

Este artículo puede ser consultado en versión completa en <http://www.medicgraphic.com/actamedica>

neo-vascularización evitando amputaciones y mejorando parámetros clínicos. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambas vías.

**Palabras clave:** Neo-circulación, trasplante celular, células mononucleares, isquemia severa de miembros inferiores.

preventing amputation and resulting in better clinical parameters. No statistical significance in results was found between both procedures.

**Key words:** Neo-circulation, cell transplant, mononuclear cell, severe ischemia of lower extremity.

## INTRODUCCIÓN

El 30% de los pacientes con isquemia severa de miembros inferiores (ISMI) por oclusión arterial, no son candidatos a revascularización con derivaciones arteriales y/o procedimientos endovasculares y la evolución natural de la enfermedad es hacia la progresión con dolor en reposo, úlceras, gangrena, sepsis y amputación.<sup>1</sup>

En los Estados Unidos por este problema se practican al año 100,000 amputaciones, con un costo asociado anual de 13 billones de dólares.<sup>2</sup>

Aranguren<sup>3</sup> y Franz,<sup>2</sup> reportan que ya existen 40 grupos en el mundo que han trasplantado células mononucleares (CMN) en miembros inferiores con isquemia obteniendo buenos resultados clínicos, convirtiendo este procedimiento en una alternativa para evitar la amputación.<sup>4-8</sup>

Para lograr una máxima concentración local de células en el área de isquemia Bartsch<sup>9</sup> practica 13 trasplantes de CMN aspiradas de la cresta ilíaca y purificadas con técnica de ficoll vía intramuscular y vía intrarterial, aumentando la distancia libre de dolor al caminar, mejorando el índice brazo/tobillo (IBT) y la saturación de oxígeno. El grupo control de 12 pacientes sin trasplante celular empeoró a los 4 meses de seguimiento.

Van Tongeren<sup>10</sup> utilizando CMN, diseña un estudio comparativo de 27 pacientes divididos en dos grupos, 15 pacientes con trasplante intramuscular y 12 pacientes vía intramuscular e intrarterial; obteniendo para el grupo intramuscular 50% de extremidades libres de amputación y para el combinado intramuscular e intrarterial el 84% a los 12 meses.

Utilizando un modelo de isquemia muscular en ratas, nuestro grupo demostró que puede inducirse neo-vascularización o angiogénesis efectiva al trasplantar CMN (CD34+ y CD133+), derivadas de la médula ósea en túneles musculares fibrocolágenos, utilizados como "andamiaje" para facilitar la sobrevida y la diferenciación celular.<sup>11</sup> En otro estudio experimental, en perros con modelo de isquemia muscular en la extremidad inferior, corroboramos que movilizando las CMN a la sangre periférica aplicando el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y trasplantándolas en túneles musculares fibrocolágenos, incrementamos significativamente la angiogénesis en comparación al trasplante celular sin G-CSF.<sup>12</sup>

Con los antecedentes experimentales en animales, obtuvimos la autorización de los Comités de Investigación y Ética del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" para iniciar un estudio experimental en seres humanos.

En este reporte analizamos la combinación del trasplante de CMN por vía intramuscular e intramuscular/intravenoso retrógrado distal, utilizando la vena safena a nivel del maléolo interno.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se evaluaron 20 extremidades de 14 pacientes con ISMI Fontaine II-b Rutherford 3, no candidatos a revascularización arterial y cirugía endovascular, que cumplieron con los criterios de inclusión y aceptaron participar en el estudio.

Los pacientes fueron divididos en dos grupos:

Grupo 1. Diez pacientes con trasplante de CMN por vía intramuscular.

Grupo 2. Diez pacientes con trasplante de CMN por vía intramuscular e intravenoso retrógrado distal (vena safena). La administración se llevó a cabo utilizando una tabla numérica aleatoria para incluir a los pacientes en el grupo 1 y 2.

## TÉCNICA DE COSECHA CELULAR

Para la movilización de las CMN de la médula ósea al torrente sanguíneo se aplicaron 5 µg de G-CSF Neupogen (Roche-México) vía subcutánea durante 5 días. El 5to día por catéter venoso se practicó el procedimiento de aféresis utilizando una máquina COBE-Spectra de flujo continuo AutoPBSC para extracción de células progenitoras automatizadas, con técnica de doble punción, utilizando citrato y glucosa como anticoagulante y solución fisiológica para cebado. El procedimiento se realiza en dos pasos: el de extracción y el de reinfusión.

Debe realizarse a través de un catéter Mahurkar o Niagara. Las velocidades de extracción/infusión deben de ser entre 50 a 55 mL/min. Se obtienen 60 mL de concentrado celular.

El número total de células transplantadas por extremidad fue de  $15 \times 10^8 \pm 5 \times 10^8$  CD<sup>34+</sup>, para el Grupo No. 1 y  $17.4 \times 10^8 \pm 8 \times 10^8$  CD<sup>34+</sup> en el caso del Grupo No. 2.

## TÉCNICA QUIRÚRGICA

Bajo anestesia regional y sedación ligera utilizando la aguja del catéter BD Insite (16GA-1.77IN) (17 x 45 mm) se practican punciones en los compartimentos musculares guiados por ultrasonido. Los 60 mL de concentrado celular por extremidad se distribuyen de la siguiente manera: 10 mL en vasto interno, 10 mL en vasto externo, 10 mL compartimento muscular tibial anterior (A), 10 mL compartimento muscular posterior profundo (B) y 10 mL en compartimento muscular posterior superficial (C). Como parte final del procedimiento quirúrgico se localiza la vena safena interna a nivel del maléolo interno, se practica una pequeña incisión y se diseña el vaso refiriéndolo con catgut crómico 3-0, se liga la vena proximalmente y se hace una pequeña incisión aplicando un catéter BD Insite (16GA-1.77IN) (17 x 45 mm), a través del cual se realiza una heparinización regional retrógrada distal en el pie (1 mL de heparina 1:1,000 + 9 mL de solución salina) con aplicación de torniquete manual para evitar el retorno venoso durante 10 min; enseguida se aplican 10 mL de concentrado celular vía venosa retrógrada distal con torniquete manual durante 10 min (*Figuras 1 y 2*).

## TÉCNICA DE LÁSER DOPPLER

La medición de flujo por medio del láser Doppler es una técnica establecida para la medición en tiempo real de



**Figura 1.** Técnica de trasplante intramuscular con guía de ultrasonido para localizar los compartimentos.

la perfusión tisular a nivel microvascular. Por primera vez reportada en 1964 por Yeh y Cummins,<sup>13</sup> la señal de Láser Doppler del tejido se mide en Unidades de Perfusion (UP), que es una escala de unidades ya definida, cuidadosamente controlada, establecida en base a una suspensión de esferas de látex con movimiento. La técnica ofrece ventajas sustanciales con respecto a otros métodos para medir la perfusión a nivel microvascular. Los estudios muestran que es altamente sensible a la perfusión local y altamente versátil en casos que sea necesario monitoreo continuo. El método no es invasivo, ya que el transductor no requiere estar en contacto con la superficie del tejido, y de ninguna manera lastima o altera el estado fisiológico de la microcirculación. En el monitor se observa una señal que es proporcional a la perfusión de las células rojas (o flujo). Esto representa el transporte de células rojas a través de la microcirculación.<sup>14</sup>

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un estudio experimental, con asignación aleatoria, comparativo, con seguimiento longitudinal de dirección prospectiva, fuente prolectiva y evaluación abierta. De acuerdo a la evaluación clínica que se les realizó a los pacientes se obtuvo una base de datos cuantitativos correspondientes a las UP previo al procedimiento, y posteriormente a los 3 y 12 meses para los dos grupos. Las variables nominales se determinaron de acuerdo a los grupos y al tratamiento al que fueron sometidos.

Las comparaciones del crecimiento vascular entre los grupos según las unidades de perfusión se analizaron con la prueba de T-Pareada de acuerdo a su distribución, se consideraron las diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$  utilizando el paquete estadístico SPSS 16.0.



**Figura 2.** Técnica de trasplante celular vía vena safena distal en el pie de forma retrógrada distal (compresión manual para controlar el retorno venoso).

## RESULTADOS

Los pacientes fueron evaluados a los 1, 3, 12, 18, 24 y 40 meses del trasplante y las variables fueron: extremidades libres de amputación, distancia sin dolor en metros, IBT, UP, y angiografía por sustracción digital.

De septiembre de 2007 a octubre de 2010 (3 años) fueron evaluadas 20 extremidades de 14 pacientes con isquemia severa (Fontaine II-b Rutherford 3). Las características clínicas y antecedentes se resumen en el cuadro I.

En el periodo postratamiento, que va de 3 a 37 meses (con un promedio de 23); en el Grupo No. 1 sólo se amputó una extremidad a los 20 meses, la distancia sin dolor

mejoró de 62 a 350 m y el IBT mejoró de 0.42 a 0.68. En el Grupo No. 2, no se practicó ninguna amputación, la distancia sin dolor mejoró de 57 a 450 m, el IBT mejoró de 0.38 a 0.65 (Cuadros II y III).

Hasta el momento 3 pacientes fallecieron por causas como neumonía e infarto agudo al miocardio, con la extremidad viable y mejoría clínica, no se presentaron complicaciones derivadas de procedimiento de cosecha celular y trasplante.

Con el estudio de láser Doppler las UP se ven incrementadas a través del tiempo para todos los pacientes, en el Grupo No. 1 las UP mejoraron en un rango de 7.14 a 225.31. En el Grupo No. 2, el rango va de 6.64

Cuadro I. Características clínicas de los pacientes.		
Características	I.M. Grupo 1 N = 10	I.M. + I.V. Grupo 2 N = 10
Tabaquismo	5	8
Hipercolesterolemia	6	5
Diabetes mellitus	2	6
Hipertensión arterial	6	8
Infarto al miocardio	2	2

Cuadro II. Mejoría clínica en los pacientes.		
	I.M.	I.M. + I.V.
Amputaciones	1	0
Úlcera	0	1
Distancia sin dolor en metros	De 62 a 350	De 57 a 450
Índice brazo/tobillo	De 0.42 a 0.68	De 0.38 a 0.65

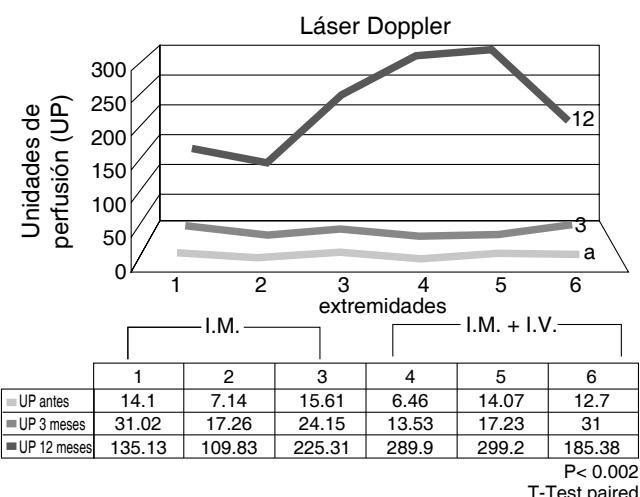
Cuadro III. Distribución de los 14 pacientes. Fecha de trasplante y evolución.						
Número paciente	Edad	Extremidad Grupo 1	Extremidad Grupo 2	Fecha de trasplante	Tiempo en meses	Evolución
1	72	MPD		22/09/2007	37	Salvamento
2	73	MPI		14/11/2007	35	Salvamento
3	79		MPD	06/02/2008	32	Salvamento
4	59		MPI	27/02/2008	32	Salvamento
5	67		MPD	02/07/2008	27	Salvamento
6	54	MPI		06/08/2008	26	Salvamento
7	46	MPD		05/09/2008	25	Salvamento
8	78	MPD		24/09/2008	24	Salvamento*
9	70		MPD	22/10/2008	23	Salvamento
10	68		MPD	12/11/2008	22	Salvamento*
11	70	MPD		27/02/2009	20	Amputación
12	64	MPD		25/03/2009	19	Salvamento
13	63	MPI		08/04/2009	18	Salvamento*
14	77	MPD		21/07/2010	3	Salvamento

\* Pacientes que fallecieron por causas ajenas al procedimiento. \*\* Caso de úlcera. MPD = Miembro pélvico derecho. MPI = Miembro pélvico izquierdo.

a 299.2. El ejemplo de los resultados significativos ( $p = 0.002$ ) son representados en la figura 3. Por no contar con arteriografías preoperatorias estandarizadas, no se aplicó el procedimiento de medición de índice angiográfico, pero en la mayoría de los casos de ambos grupos se observó un incremento en la circulación colateral (Figura 4).

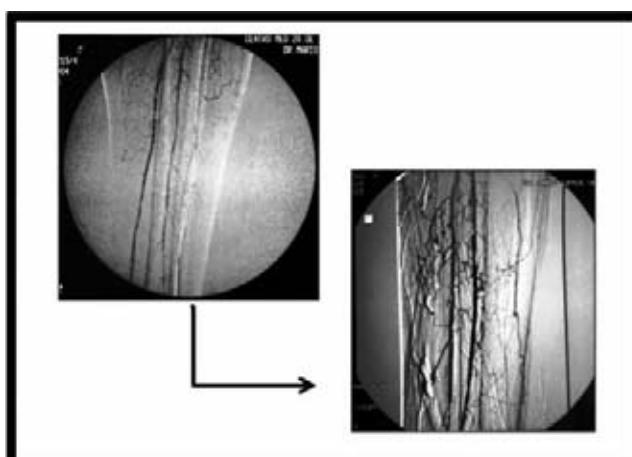
## DISCUSIÓN

En este estudio experimental en pacientes con ISMI queda demostrado que ambos procedimientos, la vía intramuscular sola y la vía combinada con la vía intravenosa retrógrada distal por la vena safena en el pie, son inductores de an-



UP = unidades de perfusión.

**Figura 3.** Resultados de láser Doppler en 6 pacientes a los 3 y 12 meses.



**Figura 4.** Arteriografías pre y postratamiento.

giogénesis suficiente para mejorar los parámetros clínicos y evitar la amputación.

Se demuestra una ligera superioridad con el procedimiento combinado IM+IV pero sin diferencia estadísticamente significativa. En un estudio anterior nuestro grupo trasplantó CMN en túneles fibrocolágenos a 8 extremidades de pacientes con ISMI; el resultado inicial fue de mejoría clínica significativa en cinco extremidades y mala evolución en tres que mejoraron su perfusión vascular proximal, pero desarrollaron necrosis de ortejos. Interpretamos que en estos tres pacientes el trasplante no logró que las células llegaran a los vasos capilares digitales. Para tratar de resolver el problema diseñamos un protocolo en ratas y demostramos que la vía endovenosa retrógrada distal logra más angiogénesis en comparación con la vía intramuscular. Se observó que las CMN se adhieren al segmento capilar más pequeño sirviendo como "andamiaje", ayudando a su sobrevida, logrando su reproducción y diferenciación en células endoteliales.<sup>15</sup>

Tepper<sup>16</sup> y Lawall<sup>17</sup> demuestran que para la inducción de angiogénesis o vasculogénesis es necesario el estímulo inicial de isquemia e inflamación muscular que libera citocinas y factores de crecimiento (VEGF, bFGF, SDF-1 $\alpha$ , PDG-BB, IGF-1, TGF-B), que activan a las células endoteliales para iniciar su proliferación, migración y formación de tubos por lo que se justifica tener al músculo como blanco del trasplante celular, sin embargo, seguimos pensando en la necesidad de aplicar por una segunda vía el trasplante de CMN.

Van Tongeren,<sup>10</sup> ya demostró la eficiencia y superioridad de la vía combinada intramuscular e intrarterial contra solo intramuscular y será necesario llevar a cabo estudios comparativos y de largo plazo que incluyan la vía intravenosa retrógrada distal.

Otro aspecto interesante será crear un banco de células criopreservadas para retrasplante en pacientes que presenten nuevamente sintomatología de isquemia de miembros inferiores.

## AGRADECIMIENTO

Agradecemos la colaboración en la elaboración de este trabajo a: EG María de Lourdes Lanciego Martínez, QFB María Antonieta Medina Serratos y Lab. Lucero Pérez Cruz por su valioso apoyo en el Servicio de Hematología Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE.

## REFERENCIAS

1. Dormandy JP, Rutherford RB. Transatlantic interconsensus (tasc) management of peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 2000; 31: S1-S278.

2. Franz R, Parks A et al. Use of autologous bone marrow mononuclear cell implantation therapy as a limb salvage procedure in patients with severe peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 2009; 50: 1378-1390.
3. Aranguren XL, Verfaillie CM, Lettun A. Emerging hurdles in stem cell therapy for peripheral vascular disease. *J Mol Med* 2009; 87: 3-16.
4. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone marrow cells: a pilot study and randomized controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 427-425.
5. Yang X, Wu Y, Wang H et al. Transplantation of mobilized peripheral blood mononuclear cells of peripheral arterial occlusive disease of the lower extremity. *J Ger Car* 2006; 3: 181-3.
6. Shiba Y, Takahashi M, Ikeda U. Models for the study of angiogenesis. *Curr Pharmac Design* 2008; 14: 371-7.
7. Durdu S, Akar AR, Arat M, Sancak T, Eren NT, Ozyurda U. Autologous bone marrow mononuclear cell implantation for patients with Rutherford grade II-III thromboangiitis obliterans. *J Vasc Surg* 2006; 44: 732-9.
8. Sprengers RW, Moll F, Teraa M et al. Rationale and designing of the JUVENTAS trial for repeated intra-arterial infusion of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg* 2010; 51: 1564-8.
9. Bartsch T, Brehm M et al. Transplantation of autologous mononuclear bone marrow stem cells in patients with peripheral arterial disease (The TAM-PAD study). *Clin Res Cardiol* 2007; 96: 819-899.
10. Van Tongeren R, Hamming J et al. Intramuscular or combined intramuscular/intra-arterial administration of bone marrow mononuclear cells: a clinical trial in patients with advanced limb ischemia. *J Cardiovasc Surg* 2008; 49: 51-8.
11. Padilla SL, Krötzsch E, Schalch P et al. Administration of bone marrow cells into surgically induced fibrocollagenous tunnels induces angiogenesis. In ischemic rat hind limb model. *Microsurgery* 2003; 23: 568-574.
12. Padilla SL, Krötzsch E, Rodríguez J, Escotto I, Villegas F, Di Silvio M. Bone marrow mononuclear cells stimulate angiogenesis when transplanted into surgically induced fibrocollagenous tunnels: Results from a canine ischemic hind limb model. *Microsurgery* 2007; 27: 91-97.
13. Yeh Y, Cummins H. Localized fluid flows measurements with a He-Ne laser spectrometer. *Appl Phys Lett* 1964; 4: 176-178.
14. Kvernebo K, Slagsvold CE et al. Laser Doppler flowmetry in evaluation of lower limb resting skin circulation. A study in healthy controls and atherosclerotic patients. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 1988; 48(7): 621-626.
15. Padilla SL, Rodríguez TJ, Escotto SI, De Diego FJ, Rodríguez RN et al. Trasplante de células mononucleares progenitoras derivadas de médula ósea por vía endovenosa retrógrada distal para inducir angiogénesis en miembros inferiores con isquemia. *Cir Gen* 2009; 31: 213-218.
16. Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, Callaghan MJ. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood* 2009; 105: 1068-1077.
17. Lawall H, Bramage P, Amann B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. *Thromb Haemost* 2010; 103: 696-709.