



AUTOTRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE ADULTAS EN MIEMBROS INFERIORES CON ISQUEMIA CRÍTICA.

ADULT STEM CELL AUTOTRANSPLANTATION IN CHRONIC CRITICAL LIMB ISCHEMIA

Hernández P*, Artaza H**, Díaz AJ***, Cortina LD*, Lam RM*, Pol N**, Dorticós E*, Macías C*, del Valle L*, León L***

* Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana.

** Hospital Clínico Quirúrgico "Enrique Cabrera", La Habana.

*** Hospital Provincial "Abel Santamaría Cuadrado", Pinar del Río.

PALABRAS CLAVE:

Células madre, células mononucleares, angiogénesis, isquemia crítica de miembros inferiores

KEY WORDS:

Stem cells, mononuclear cells, angiogenesis, critical lower limb ischemia

Correspondencia:

DR. PORFIRIO HERNÁNDEZ RAMÍREZ
Instituto de Hematología e Inmunología AP 8070,
Ciudad de La Habana, CP 10800, Cuba.
E-mail: phernandez@hemato.sld.cu

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. Recientemente se ha hecho evidente el potencial terapéutico de las células madre adultas en el tratamiento de arteriopatías periféricas, pues la implantación en los miembros isquémicos de células mononucleares procedentes de la médula ósea (CMN-MO) o de la sangre periférica (CMN-SP) puede mejorar la vascularización del tejido.

MATERIAL Y MÉTODO. Se trataron 30 pacientes con isquemia crítica de un miembro inferior, en los que no existía ninguna posibilidad de revascularización por métodos tradicionales. En 13 se implantaron CMN-MO autólogas en el miembro isquémico y en 17 se utilizaron CMN-SP. Los pacientes se monitorearon durante 24 semanas con el índice de presiones tobillo-brazo (ITB) en reposo, la distancia de marcha sin claudicación y la evaluación de la escala del dolor de reposo.

RESULTADOS. Veintiún pacientes tenían indicación de amputación mayor del miembro afectado y en catorce (67%) de ellos se logró evitar. Tanto en los pacientes en que se emplearon CMN-MO como en los que recibieron CMN-SP hubo mejoría significativa del ITB en el miembro en que se hizo la implantación celular. El dolor de reposo mejoró significativamente en ambos grupos a las 4 semanas y a las 24 semanas había desaparecido. La distancia de marcha sin claudicación mejoró progresivamente en los dos grupos. En ningún caso se observaron efectos adversos secundarios al tratamiento.

CONCLUSIONES. Los métodos de implantación de CMN-MO y de CMN-SP autólogas en pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores resultaron procedimientos eficaces y sin complicaciones, lo que estimula a la continuación de los estudios clínicos en este campo.

ABSTRACT

INTRODUCTION. Recently the therapeutic potential of adult stem cells in the treatment of peripheral diseases has become increasingly evident, since implantation of bone marrow mononuclear cells (BM-MNC) or peripheral blood mononuclear cells (PB-MNC) into ischemic limbs can improve tissue vascularization.

PATIENTS AND METHODS. Thirty patients with severe unilateral lower limb ischemia, with no option for standard revascularization therapies, were treated. Autologous BM-MNC were implanted into the ischemic limb in 13 cases and 17 received PB-MNC. The patients were monitored during 24 weeks with resting ankle-brachial pressure index (ABI), pain-free walking distance and rest pain scale evaluation.

RESULTS. Twenty one patients had been specifically advised to undergo major limb amputation that was avoided in 14 (67%). ABI significantly improved in the treated limb in both groups. Rest pain significantly improved in both groups at week 4 and at 24 weeks patients were completely pain-free. Pain free walking distance progressively improved in both groups. No related adverse effects were observed in any patient throughout the therapeutic procedure.

CONCLUSIONS. The methods of autologous BM-MNC and PB-MNC implantation in patients with critical lower limb ischemia showed to be effective procedures without related complications. These results encourage to continue clinical studies in this field.

INTRODUCCIÓN

La arteriosclerosis ocluyente es la causa más frecuente de enfermedad oclusiva arterial en los adultos y su forma más común es la aterosclerosis (1). Esta enfermedad afecta alrededor del 15% de los adultos sobre los 55 años de edad y su forma más grave es la denominada isquemia crítica (1,2).

Se ha planteado que el objetivo terapéutico en la isquemia crónica de los miembros inferiores consiste en aliviar la sintomatología, particularmente el dolor, evitar la progresión de la enfermedad y disminuir el índice de amputaciones. Se ha señalado que la meta principal en la mayor parte de los pacientes con isquemia crítica es la preservación de la extremidad afectada.(3)

La medicina regenerativa ha surgido recientemente como una nueva especialidad, cuyo desarrollo está unido estrechamente con los nuevos conocimientos relacionados con las propiedades de las células madre embrionarias y adultas y el potencial regenerativo y terapéutico proporcionado por las células madre (4)

Recientemente, se ha propuesto este tipo de citoterapia para la inducción de angiogenesis (5,6), y se ha podido apreciar el potencial terapéutico de las células madre adultas en el tratamiento de enfermedades coronarias y de las arterias periféricas (7,8). Existen evidencias que la implantación de células mononucleares procedentes de la médula ósea (CMN-MO) en los miembros isquémicos puede mejorar la vascularización del tejido (9-14). Con la implantación de células madre provenientes de la sangre periférica se han obtenido resultados similares (10).

La terapia celular angiogénica se ha considerado un método integral para enfrentar el estado isquémico, pues el suministro de células madre puede influir en la liberación de varios factores angiogénicos y citocinas, o bien aportar progenitores de células endoteliales capaces de actuar directamente en el mecanismo angiogénico (15). Se ha señalado que la implantación de células mononucleares procedentes de médula ósea autóloga resulta segura y efectiva en la terapéutica angiogénica, pues ellas poseen esas dos propiedades (9).

Tomando en consideración esos antecedentes realizamos un ensayo clínico en pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores, para evaluar la eficacia y seguridad de la implantación de CMN-MO autólogas y de esas células movilizadas a la sangre periférica (CMN-SP) mediante el empleo del Factor Estimulador de Colonias Granulocíticas (FECG).

PACIENTES Y MÉTODOS

Se incluyeron 30 pacientes con isquemia crítica de un miembro inferior, que habían sido tratados previamente sin éxito con los métodos habituales y no existía ninguna posibilidad de revascularización por angioplastia o procedimientos quirúrgicos. Los pacientes tenían dolor isquémico de reposo con existencia o no de lesiones tróficas de la piel (úlceras no cicatrizantes o necrosis isquémica de dedos del pie), secundarios a oclusión arterial infrainguinal en el trayecto fémoropoplíteo o tibioperoneo.

Se excluyeron los casos con diabetes mellitus mal controlada, insuficiencia crónica renal, cardíaca o hepática y también cuando habían antecedentes o existencia de enfermedades malignas. Ninguno tenía una enfermedad infecciosa concurrente que pudiese entorpecer el tratamiento.

El diagnóstico del estado arterial del miembro inferior se confirmó mediante una arteriografía convencional.

En 13 pacientes el trasplante celular autólogo se hizo con CMN-MO y en 17 con CMN-SP.

OBTENCIÓN Y AISLAMIENTO DE LAS CÉLULAS MONONUCLEARES.

La obtención de la médula ósea para la extracción de las CMN-MO se realizó mientras los pacientes estaban bajo anestesia epidural. Se aspiraron 500 – 600 ml de médula ósea de la cresta iliaca posterior, que se depositaron en bolsas plásticas que contenían CPD-adenina.

Los enfermos se asignaron al azar a uno de dos grupos. En un grupo las CMN-MO se extrajeron con un equipo separador de células Fresenius AS 240 (Fresenius AG, Schweinfurt, Alemania) y se concentraron usando su programa BMSC (método automatizado) mientras que en el otro grupo, las células se aislaron mediante un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (método manual), según el proceder estandarizado que se emplea en nuestro instituto (16). Las células fueron finalmente resuspendidas en solución salina con heparina (10 000 UI/L) con lo que quedaron disponibles para su inyección.

Para la movilización de la CMN-SP los pacientes recibieron previamente tratamiento con 10µg / Kg de FECG humano recombinante (LeukoCIM, CIMAB S.A. La Habana, Cuba) administrado por vía subcutánea cada 12 horas hasta un total de 4 dosis. Tres horas después de la última inyección se obtuvieron 800-1000 ml de sangre total de acuerdo a la condición clínica de cada paciente. Posteriormente la CMN-SP se concentraron por sedimentación después de la adición a la sangre extraída de hidroxietilalmidón (HES) al 6% en una proporción de 1 ml de HES x 6 ml de sangre total.

Se usó una pequeña fracción de la suspensión de las células para el recuento celular, la determinación de la positividad CD34, la prueba de viabilidad mediante exclusión del azul tripan y para el estudio microbiológico. El recuento celular se hizo en un contador automático de células sanguíneas (SEAC, Genius, Italia) y el análisis de las células CD34+ se llevó a cabo por un procedimiento inmunocitoquímico previamente descrito (17), utilizando un anticuerpo CD34 de la Firma Serotec, Ltd, Reino Unido.

IMPLANTACIÓN DE LAS CÉLULAS MONONUCLEARES.

Las CMN se implantaron en los músculos gemelos de la pierna isquémica de acuerdo con un proceder previamente descrito (9) pero además se inyectaron en el músculo tibial anterior y en algunos casos también en el muslo cuando existía algún compromiso circulatorio de la femoral superficial. Las CMN concentradas se implantaron por inyecciones intramusculares múltiples. En cada sitio de inyección se implantó un volumen de 0.75 – 1 ml de CMN, mediante agujas 25 ó 26, a una profundidad de 1.5 cm y a una distancia de 3 cm entre los puntos de inyección. El volumen total inyectado varió de acuerdo con el concentrado celular obtenido y el número de regiones anatómicas inyectadas.

SEGUIMIENTO EVOLUTIVO.

Los pacientes se monitorearon con el índice de presiones tobillo-brazo (ITB) en reposo, la distancia de marcha sin claudicación y la evaluación de la escala del dolor de reposo, por métodos previamente descritos (9,18). Según las normas internacionales un ITB > 0.9 se consideró normal y un aumento mayor de 0.1 se juzgó como una mejoría significativa, más notable cuando el aumento era mayor de 0.15

Los enfermos se evaluaron evolutivamente durante 24 semanas. La mayoría no dio su consentimiento para las arteriografías de seguimiento. Como criterios de respuesta primaria se tomaron la disminución de la realización de una amputación mayor (por encima del tobillo) y la disminución del dolor de reposo sin uso de analgésicos o su desaparición dentro de las 24 semanas después del implante celular.

Los criterios de respuesta secundaria se definieron como mejoría del ITB y de la distancia de marcha sin claudicación dentro de las 24 semanas después de la implantación de las CMN, comparados con los resultados basales.

ASPECTOS ÉTICOS

El estudio se hizo de acuerdo con los principios establecidos en la Declaración de Helsinki, y fue aprobado por los comités científicos y de ética de las instituciones participantes. Todos los pacientes suministraron por escrito su consentimiento para la participación en el ensayo clínico.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En los grupos en que el procesamiento de las CMN-MO se hizo por un método automatizado o por uno manual, la comparación de los valores absolutos de CMN y de CD34+ se hizo mediante la t de Student.

Los resultados de las variables analizadas evolutivamente se presentaron como medianas y para la comparación de los resultados evolutivos en los mismos pacientes se utilizó la prueba de Wilcoxon Signed Rank. Se consideró estadísticamente significativa una $p < 0.05$, para una prueba de 2 colas. La evaluación estadística se realizó con el Programa SPSS (Versión 11.5) para Windows en una computadora IBM-compatible.

RESULTADOS

En los pacientes en que las CMN-MO se procesaron por el método automatizado o el manual, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, entre los promedios de los conteos absolutos de CMN y de células CD34+. Tomando en

Tabla I.

CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES

VARIABLES	PACIENTES		
	TOTAL n=30	CMN-MO n=13	CNM-SP n=17
<i>Edad (años)</i>			
Mediana	63	64	62
rango	46-88	46-73	52-88
<i>Sexo</i>			
Masculino	18 (60)	9 (69)	9 (53)
Femenino	12 (40)	4 (31)	8 (47)
INTERVENCIONES PREVIAS			
Puente revascularizador, (trombosado evolutivamente)	3 (10)	2 (15)	1 (6)
<i>Factores de riesgo</i>	30 (100)	13 (100)	17 (100)
Fumadores	20 (66)	8 (62)	12 (70)
Diabetes mellitus	20 (66)	10 (77)	10 (59)
Hipertensión arterial	22 (73)	8 (62)	14 (82)
<i>Factores de riesgo asociados</i>			
3	7 (23)	4 (31)	3 (18)
2	16 (53)	5 (38)	11 (65)
<i>Estado isquémico</i>			
Sólo dolor de reposo	3 (10)	2 (15)	1 (16)
Úlceras no cicatrizantes	7 (23)	5 (39)	2 (12)
Gangrena	17 (57)	6 (46)	11 (65)
Gangrena + úlcera	3 (10)	0	3 (17)
<i>Indicación de amputación mayor</i>	21 (70)	6 (46)	15 (88)

Células mononucleares de médula ósea, CMN-MO; Células mononucleares de sangre periférica, CNM-SP; Los valores entre paréntesis representan el porcentaje.



Figura 1.- A la izquierda estado de los pies de 2 pacientes pre-implante. A la derecha se muestran los resultados post implante.



Figura 2.- A la izquierda estado de los pies de 2 pacientes pre-implante. A la derecha se muestran después de la amputación transmetatarsiana.

cuenta estos resultados ambos grupos se unificaron en uno solo, representativo de los casos en que se administraron CMN-MO.

En el grupo en que se usaron CMN-MO el volumen final de la suspensión de células concentradas varió de 31–128 ml (mediana 90 ml) mientras que en el que se aplicaron CMN-SP este volumen varió de 75–150 ml (mediana 130 ml).

En ese volumen de CMN-MO la mediana del conteo absoluto de CMN fue 1.8×10^9 y en el de CMN-SP la mediana fue

6.1×10^9 . La mediana del conteo absoluto de células madre CD 34+ fue 7.7×10^7 en el concentrado final de CMN-MO y 11.5×10^7 en el de CMN-SP. En todos los casos la viabilidad celular fue superior al 90%.

Las características de los pacientes se muestran en la **Tabla I**. Tres pacientes (10%) habían sido tratados previamente con un puente revascularizador que se trombosó evolutivamente. Veintitrés casos (77%) tenían más de un factor de riesgo. Siete

pacientes tenían úlceras no cicatrizantes, diecisiete habían desarrollado gangrena por lo menos en un dedo del pie y otros 3 presentaban asociación de úlcera isquémica y gangrena. Veintiún pacientes (70%) tenían indicación de una amputación supracondilea del miembro afectado. La mayoría de ellos tenía el miembro afectado en un estado sumamente crítico, principalmente los enfermos incluidos en el grupo en que se implantaron CMN-SP. En catorce (67%) de los 21 casos que tenían indicación de amputación mayor se logró evitar esta intervención quirúrgica. Se evitó la amputación en 5 (83%) de los 6 casos con esta indicación en el grupo en que se implantaron CMN-MO y en 9 (60%) de los 15 con criterio de amputación supracondilea que recibieron CMN-SP. En la mayor parte de los que salvaron la pierna solo se hizo la amputación de los dedos con gangrena (Figura 1) y en unos pocos pacientes con notables alteraciones tróficas y riesgo de extensión de las lesiones se practicó una amputación transmetatarsiana (Figura 2).

De los 7 (33%) pacientes restantes con indicación de amputación supracondilea, la amputación se practicó en 6 entre los que se incluyeron 2 de los enfermos que presentaban asociación de gangrena de los dedos con úlcera isquémica. En el paciente restante se hizo una amputación infracondilea.

Los 14 pacientes en que se evitó la amputación mayor junto con los 9 restantes que no tenían esta indicación continuaron su control evolutivo planificado.

En estos pacientes, tanto en los que se emplearon CMN-MO como en los que recibieron CMN-SP, el dolor de reposo había mejorado significativamente a las 4 semanas. A las 24 semanas había desaparecido en ambos grupos. La distancia de marcha sin claudicación también mejoró progresivamente en los dos grupos de pacientes (Tabla II). En ambos grupos hubo mejoría significativa del ITB en el miembro en que se hizo la implantación celular, sin que se apreciaran cambios

Tabla II.

RESULTADOS EVOLUTIVOS DE LAS VARIABLES CLÍNICAS ANALIZADAS.

GRUPO	VARIABLE	PREIMPLANTE	RESULTADOS		P 1	P 2
			POSTIMPLANTE			
			(SEMANAS)			
			4	24		
CMN-MO	Dolor de reposo (Escala 4 – 0)	4	1	0	0.001*	0.026*
	Distancia de marcha sin claudicación (metros)	0	135	250	0.005*	0.180
CMN-SP	Dolor de reposo (Escala 4 – 0)	4	2	0	0.000*	0.014*
	Distancia de marcha sin claudicación (metros)	10	30	225	0.109	0.043*

Los resultados se expresan en medianas; Escala del dolor: 4, intenso; 3, moderado; 2, ligero; 1, muy ligero; 0, sin dolor. P1, representa la comparación de los resultados basales con los obtenidos a las 4 semanas y P2, la comparación de los resultados a las 4 semanas con los de las 24 semanas; * Significación estadística.

Tabla III.

RESULTADOS EVOLUTIVOS DEL ÍNDICE DE PRESIONES TOBILLO – BRAZO.

GRUPO	VARIABLE	PREIMPLANTE	RESULTADOS		P 1	P 2
			POSTIMPLANTE			
			(SEMANAS)			
	ÍNDICE DE PRESIONES TOBILLO-BRAZO		4	24		
CMN-MO	Extremidad inyectada	0.31	0.48	0.49	0.004*	0.249
	Extremidad no inyectada	0.61	0.60	0.69	0.763	0.144
CMN-SP	Extremidad inyectada	0.26	0.39	0.48	0.041*	0.018*
	Extremidad no inyectada	0.68	0.68	0.58	0.680	1.000

Los resultados se expresan en medianas; P1, representa la comparación de los resultados basales con los obtenidos a las 4 semanas y P2, la comparación de los resultados a las 4 semanas con los de las 24 semanas. * Significación estadística.



Figura 3.- A la izquierda úlcera isquémica de larga evolución. A la derecha la úlcera cicatrizada post implante.

importantes de este índice en la extremidad no tratada, comparados con los valores que existían en condiciones basales (**Tabla III**).

El análisis individual de cada caso mostró una notable mejoría del dolor de reposo en todos los pacientes a las 4 semanas; 13 (56%) ya estaban libres de dolor en este período, de ellos 7 habían recibido CMN-MO y 6 CMN-SP. En el resto de los enfermos el dolor de reposo disminuyó progresivamente y a las 24 semanas después de la implantación celular ya había desaparecido. Los 3 pacientes que tenían dolor de reposo como única manifestación isquémica, mejoraron todos los parámetros monitoreados y a las 4 semanas ya no tenían dolor.

En el 50% de los pacientes el ITB aumentó >0.1 a las 24 semanas. Esto ocurrió en el 69.2% de los que fueron trasplantados con CMN-MO y en el 36% de los que recibieron CMN-SP. En ese mismo periodo el ITB había aumentado >0.15 en el 40% de los pacientes; en el 61% de los que recibieron CMN-MO y en el 24% de los implantados con CMN-SP.

En solo 5 casos se realizaron arteriografías evolutivas y en ellos se observó un aumento de ligero a moderado en la formación de nuevos capilares y en el número de vasos colaterales visibles, en un caso en un periodo tan temprano como a las 4 semanas de la implantación.

El beneficio de esta terapéutica se expresó por mejoría de las úlceras isquémicas con granulación hística en 4 (80%) de 5 pacientes que recibieron CMN-MO, en 3 de ellos la lesión estaba cicatrizada a las 24 semanas. Las 2 úlceras existentes en los enfermos tratados con CMN-SP también evolucionaron bien, pues una cicatrizó a las 4 semanas y la otra a las 24. (**Figura 3**) De los 3 casos con asociación de gangrena de los dedos y úlcera isquémica, solo 1 salvó la pierna.

Un aspecto interesante en el grupo que recibió CMN-MO fue la observación de que el paciente en que se implantó un volumen menor de concentrado celular y de células CD34+ (31 ml y 3.4×10^7 respectivamente) evolucionó tan rápidamente y

con similares resultados satisfactorios que otro enfermo con características clínicas semejantes en el que se inyectó una cantidad 4 veces superior de concentrado celular (128 ml) y de células CD34+ (12.5×10^7).

En ningún caso se observaron efectos adversos secundarios a la implantación celular durante el seguimiento evolutivo.

La evaluación después de las 24 semanas del implante celular aportó los siguientes datos en los pacientes en que se usaron CMN-MO: un enfermo en que se evitó la amputación mayor y que mantenía una buena evolución dejó de asistir a la consulta de control. Una paciente diabética en que se había hecho una amputación transmetatarsiana presentó a las 32 semanas una lesión séptica en el miembro inferior intervenido quirúrgicamente, que por sus características requirió una amputación supracondilea tras la cuál falleció en un cuadro de cetoacidosis diabética y bronconeumonía. Un paciente de 80 años que había mantenido una buena evolución con notable mejoría de su calidad de vida, falleció por un infarto cerebral dos años después de recibir el implante celular. A los dos años y medio del seguimiento el resto de los enfermos beneficiados con la terapéutica celular mantenían o habían incrementado las mejorías alcanzadas, excepto 2 casos con úlceras cutáneas que no habían cicatrizado completamente.

En los enfermos que recibieron CMN-SP el estudio evolutivo practicado al año evidenció que todos aquellos que habían alcanzado resultado satisfactorios a las 24 semanas mantenían la respuesta positiva alcanzada.

DISCUSIÓN

El tratamiento de la isquemia crítica de miembros inferiores se mantiene como un gran problema médico ya que la oclusión de una arteria periférica es una causa mayor de invalidez y riesgo de amputación. Hasta el presente no existe ningún tratamiento farmacológico efectivo para esta situación,

pero además muchos pacientes no son candidatos convenientes para intervenciones quirúrgicas o endovasculares o bien en ellos han fallado estos procedimientos.

Recientemente la implantación en los miembros isquémicos de CMN-MO o de CMN-SP ha surgido como una nueva y prometedora estrategia de terapéutica angiogénica. (9-14,18-20)

Con esta nueva conducta, en nuestra casuística se logró una notable disminución del número de amputaciones mayores pues en las dos terceras partes de los enfermos que tenían indicación de amputación mayor esta se pudo evitar. La eficacia de la terapia celular para evitar la amputación del miembro isquémico se observó tanto cuando se utilizaron CMN-MO como con la administración de CMN-SP. Este resultado concuerda con los datos comunicados por otros autores que han logrado evitar la amputación mayor en al menos el 50% de los pacientes que tenían esta indicación (9,18,21). En nuestros pacientes también se apreció una disminución significativa del dolor de reposo la que resultó más notable en aquellos que solo tenían esta manifestación clínica como expresión de su trastorno isquémico. Se debe destacar que estos importantes beneficios se alcanzaron a pesar de que en muchos enfermos las manifestaciones isquémicas estaban muy avanzadas. Todo esto permite sugerir que la terapia celular se haga lo más precozmente posible en los pacientes con isquemia crítica, sin otras posibilidades realmente efectivas de tratamiento.

El análisis de la respuesta secundaria mostró un aumento significativo de la distancia de marcha sin claudicación y del ITB. El ITB indicó incrementos representativos de un mejor flujo sanguíneo.(9,21). Por el contrario, la ausencia de cambios importantes del ITB, en las piernas no tratadas, indicó que no se había producido modificación de su estado de perfusión, en contraste con la mejoría obtenida en los miembros tratados. Este comportamiento del ITB en las extremidades no tratadas ya ha sido previamente comunicado. (22,23)

Nuestros datos están de acuerdo con estudios anteriores (9-14,21,22). Aunque hay relativamente pocas investigaciones clínicas en este campo, algunas de ellas pequeños ensayos no controlados, estas han evidenciado efectos beneficiosos de la implantación de CMN-MO o de CMN-SP en los miembros isquémicos, con mejoría de la función vascular y de los síntomas isquémicos. Todos estos resultados estimulan a la continuación de los ensayos clínicos en esta área.

En nuestro estudio se utilizaron 3 métodos para la separación de las células mononucleares: uno automatizado y dos manuales (separación celular mediante un gradiente de densidad con Ficoll y la separación por sedimentación mediante el empleo de hidroxietilalmidón al 6%). Con estos métodos de separación se obtuvo un número adecuado de células mononucleares comparable a los valores reportados por otros autores, muchos de ellos usando un proceder automatizado con alguno de los equipos de aféresis actualmente disponibles (9,10,12,18). Las cifras ligeramente superiores que obtuvimos de células CD34+ probablemente estén relacionadas con la técnica de cuantificación empleada que pudiera aportar porcentajes mayores que los que habitualmente expresa la citofluorometría, que es la técnica más usada en la actualidad. El método de Ficoll utilizado en nuestra institución, así como la separación de la CMN mediante sedimentación con HES al 6% resultaron dos procedimientos simples y efectivos que tienen importantes ventajas desde los puntos de vista económicos y técnicos, principalmente para aquellas instituciones que no poseen medios sofisticados.

Por otra parte, los buenos resultados aportados por la implantación de CMN-SP movilizadas con el FECG demostraron su utilidad y coincidieron con lo informado por otros autores (10,18-20). Este es un proceder que tiene ventajas para el paciente pues no es necesario administrar anestésicos ni usar el salón de operaciones como sucede cuando se extrae médula ósea.

Una investigación reciente en que se comparó la aplicación de células madre de la médula ósea con la de células madre procedentes de la sangre comprobó la efectividad de ambas conductas en el tratamiento de la isquemia de miembros inferiores y no se evidenciaron diferencias significativas entre los resultados de estos métodos (24).

Se conoce que las células hematopoyéticas pueden liberar diferentes factores angiogénicos y citocinas. La fracción CD34+ en las CMN-MO, y probablemente otras fracciones celulares, puede suministrar células progenitoras endoteliales y secretar varios factores de crecimiento angiogénico así como angiopoietinas que pueden iniciar y contribuir a la angiogénesis (9,11). Además, se ha observado que la implantación de CMN-MO mejora la vasodilatación dependiente del endotelio en los pacientes con isquemia de los miembros. (12). Mecanismos similares pudieran ocurrir con la implantación de CMN-SP movilizadas con FECG (18).

Aunque la terapia génica con el factor de crecimiento del endotelio vascular ha sido efectiva en pacientes con isquemia crítica de miembros, la terapéutica con implantación de CMN-MO o de CMN-SP puede proporcionar una estrategia angiogénica más integral en estos enfermos.

El conocimiento actual sobre esta materia apoya la opinión de que la implantación de CMN-MO y la de CMN-SP son procedimientos prácticos, seguros y efectivos que pueden contribuir significativamente al tratamiento de los pacientes con miembros isquémicos y a reducir el número de amputaciones mayores. Sin embargo, sería conveniente hacer ensayos aleatorizados con mayor número de casos, con la finalidad de obtener una respuesta más definida sobre la eficacia de esta nueva conducta terapéutica y de algunas interrogantes que aún persisten (21).

BIBLIOGRAFIA

1. Regensteiner JG, Hiatt WR. Current medical therapies for patients with peripheral vascular disease: a critical review. *Am J Med* 2002;112:49-57.
2. Peñafiel R, Martínez FJ. *Isquemia crónica de los miembros inferiores: patología vascular periférica en geriatría*. Barcelona: Masson; 1998. p. 97-104.
3. Santilli JD, Santilli SM. Chronic critical limb ischemia: diagnosis, treatment and prognosis. *Am Fam Physician* 1999;59:1899-908.
4. Mironov V, Visconti R, Markwald R. What is regenerative medicine? Emergence of applied stem cell and developmental biology. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:73-81.
5. Fam NP, Verma S, Kutryk K, Stewart DJ. Clinician guide to angiogenesis. *Circulation* 2003;108:2613-8
6. Yoon YS, Lee N, Scadova H. Myocardial regeneration with bone-marrow-derived stem cell. *Biol Cell* 2005; 97:253-63.

7. Fraser JK, Schreiber RE, Zuk PA, Hedrick MH. Adult stem cell therapy for the heart. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:658-66.
8. Hughes GC, Annex BH. Angiogenic therapy for coronary artery and peripheral arterial disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2005;3:521-35.
9. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda Y, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:427-35.
10. Huang PP, Li SZ, Han MZ, Xiao ZJ, Yang RC, Qiu LG, et al. Autologous transplantation of peripheral blood stem cells as an effective therapeutic approach for severe arteriosclerosis obliterans of lower extremities. *Thromb Haemost* 2004;91:606-9.
11. Raffi S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003;9:702-12.
12. Higashi Y, Kimura M, Hara K, Noma K, Jitsuiki D, Nakagawa K, et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circulation* 2004;109:1215-8.
13. Teiji O. Treatment for limb ulcer with severe ischemia: Therapeutic angiogenesis by autologous transplantation of bone - marrow. *Wound Repair Regen (abstract)*, 2004;12:A5. p-I-04.
14. Hasebe H, Osada M, Kodama Y, Fujioka D, Sano K, Nakamura T, et al. Therapeutic angiogenesis by autologous transplantation of bone marrow cells in a patients with progressive limb ischemia due to arteriosclerosis obliterans: a case report. *J Cardiol* 2004;43:179-83.
15. Sylvester JS, Lery BL. Angiogenesis therapy in ischemic disease. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2002;95:189-96.
16. Boyum A, Lovhaug D, Tresland L, Nordlie EM. Separation of leukocytes: improved cell purity by fine adjustments of gradient medium density and osmolaty. *Scand J Immunol* 1991;34:697-712.
17. Krans BR, Thierfelder S. Improved detection of terminal transferase (TdT): the use of detergents on glutaraldehyde-fixed nondehydrated cells prevents denaturation and diffusion artifacts. *Leuk Res* 1986;10:1041-9
18. Huang PP, Li SZ, Han MZ, Xiao ZJ, Yang RC, Han ZC. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:2155-60
19. Yang XF, Wu YX, Wang HM, XU YF, Lü X, Zhang YB, et al. Autologous peripheral blood stem cells transplantation in treatment of 62 cases of lower extremity ischemic disorder. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2005;44: 95-8 (artículo en chino).
20. Lenk K, Adams V, Lurz P, Erbs S, Linke A, Gielen S, et al. Therapeutical potential of blood-derived progenitor cells in patients with peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischaemia. *Eur Heart J* 2005;26:1903-9.
21. Kolvenbach R, Kreissig C, Ludwig E, Cagiannos C. Stem cell use in critical limb ischemia. *J Cardiovasc Surg* 2007;48:39-44
22. Nizankowski R, Petriczek T, Skotnicki A, Szczeklik R. The treatment of advanced chronic lower limb ischaemia with marrow stem cell autotransplantation. *Kardiol Pol* 2005;63:351-60
23. Hernández P, Cortina L, Artaza H, Pol N, Lam RM, Dorticós E, et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation in patients with severe lower limb ischaemia: A comparison of using blood cell separator and Ficoll density gradient centrifugation. *Atherosclerosis*, 2006 ; (prepublicación online 15 de septiembre)
24. Gu Y, Zhang J, Qi L. Comparative study on autologous implantation between bone marrow stem cell and peripheral blood stem cells for treatment of lower limb ischemia. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wal Ke Za Zhi* 2007;21:675-8 (artículo en chino)