

# Angiogénesis terapéutica en pacientes con isquemia crítica crónica de las extremidades inferiores.

Estudio fase II mediante inyección de células AC133+ obtenidas de sangre periférica movilizadas con G-CSF. Seguimiento de tres primeros casos

*Therapeutical angiogenesis in patients with critical leg ischemia. Phase II study with injection of AC133+ cells mobilized with G-CSF from peripheral blood. Follow-up of three first cases*

Barros M. B.<sup>1</sup>, González Porras J. R.<sup>2</sup>,  
Sánchez-Guijo F. M.<sup>2</sup>, del Cañizo M. C.<sup>2</sup>,  
Lozano F. S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Angiología y Cirugía Vascular  
<sup>2</sup> Servicio de Hematología y Unidad de Terapia Celular  
Hospital Clínico Universitario de Salamanca  
Universidad de Salamanca

## RESUMEN

**Introducción:** La insuficiencia arterial crónica de las extremidades inferiores es una enfermedad extremadamente incapacitante y que afecta un 3,5% de los varones mayores de 60 años. En el momento actual, la terapia celular es una alternativa de reciente aplicación que presenta grandes perspectivas en el tratamiento de las isquemias periféricas. El objetivo del presente estudio fue analizar la seguridad y eficacia de las células AC133+ autólogas en promover la revascularización de MMII en pacientes con isquemia crítica de las EEII.

**Material y Métodos:** Se han incluido 3 pacientes con isquemia crítica de las extremidades inferiores que fueron sometidos a movilización de células hematopoyéticas desde la médula osea a la sangre periférica (SP) a través del G-CSF. Posteriormente, los progenitores endoteliales autólogos AC133+, extraídos y seleccionados desde SP mediante el sistema CliniMACS® (Miltenyi Biotec), fueron inyectados intramuscularmente. Se hizo un seguimiento de los pacientes durante 6 meses según el protocolo del estudio, valorándose variables clínicas, funcionales, hemodinámicas, anatómicas y de calidad de vida.

## ABSTRACT

**Introduction:** Chronical arterial disease (CAD) is an extremely incapacitating illness which affects 3-5% of the male population above 60 years-old. Actually, cell therapy is an alternative that causes great expectation for the treatment of the peripheral ischemias. The aim of the present study was to analyze the efficiency and security of autologous AC133+ cells on promoting limb revascularization in patients with critical CAD.

**Material and Methods:** Three patients with critical CAD were included and followed up to date. The patients were subjected to mobilization of hematopoietic precursors from the bone marrow to peripheral blood with G-CSF. Later, the autologous endothelial stem cells AC133+, extracted and selected from blood through the CliniMACS® (Miltenyi Biotec) system, were injected intramuscularly. The patients were followed for 6 months as the study's protocol and clinical, functional, hemodynamic, anatomical and quality of life variables were evaluated.

**Results:** The process of mobilization, collection and infusion of the endothelial stem cells was well tolerated. Through the follow-up there were no amputations and there

## Correspondencia:

M. B. Barros. Dpto. de Cirugía. Facultad de Medicina  
Avda Alfonso X El Sabio s/n. 37007 Salamanca.  
marcelobb@bol.com.br

Beca Larramendi (FUNDACIÓN MAPFRE y Fundación Española de Hematología y Hemoterapia (FEHH))

**Resultados:** El proceso de movilización, recolección y infusión de los progenitores endoteliales fue bien tolerado. A lo largo del seguimiento no se ha producido ninguna amputación y hubo mejoría objetiva y subjetiva de algunas de las variables estudiadas.

**Conclusión:** Hasta el momento y con tres enfermos incluidos en el estudio el proceso de administración de las células AC133+ se ha mostrado seguro y sin complicaciones, entretanto hemos de ser prudentes en correlacionar la terapia celular y mejoría clínica. Con la inclusión de nuevos pacientes y su seguimiento a medio plazo seguramente se nos aclarará el efecto clínico de las células AC133+.

**Palabras clave:**

Isquemia crónica de extremidades, angiogénesis, AC133+, progenitores endoteliales.

was objective as well as subjective improvement of some studied variables.

**Conclusion:** So far and with three included patients, the process of administration of the AC133+ cells has shown security and lack of complication, although we have to be cautious on correlating cell therapy with clinical improvement. With the inclusion of new patients and their mid term follow-up we shall clarify the clinical effect of the AC133+ cells.

**Key words:**

Chronical limb ischemia; angiogénesis; AC133+; endothelial stem cell.

## INTRODUCCIÓN

La isquemia o insuficiencia arterial crónica, es el producto de una progresiva disminución de aporte sanguíneo (flujo arterial), en el presente caso a las extremidades inferiores (EEII), producido por el desarrollo y evolución de lesiones estenosantes u ocluyentes a nivel de sus arterias y que, según el grado de afectación, se expresa por diferentes manifestaciones clínicas de gravedad progresiva (estadios).

En los estudios más amplios y fiables, la prevalencia de claudicación intermitente (CI) en varones de 60 años es del 3,6%. En nuestro país, el recién finalizado estudio ESTIME indica cifras aún más elevadas. Según los datos del TransAtlantic Inter-Society Consensus (1) un 5% de los pacientes con CI necesitaran cirugía de revascularización y un 2% amputación de la extremidad. La progresión de una CI a isquemia crítica oscila entre el 3,8-25% (seguimiento a 5 años) y un 41% (seguimiento a 8 años), con una tasa de amputaciones de aproximadamente un 10% (seguimiento a 10 años) (2).

No existe tratamiento etiológico de la arteriosclerosis. Los objetivos terapéuticos en la isquemia crítica de las EEII serán aliviar los síntomas (dolor) y mejorar la calidad de vida (mejorando la función y evitando en lo posible la pérdida de la extremidad).

El continuo desarrollo de la cirugía vascular ha permitido grandes avances en relación a las conductas de salvamento de EEII y mejora de la cali-

dad de vida de los pacientes afectados de isquemia arterial periférica. Este hecho, ha permitido la aparición de casos cada vez más difíciles de solucionar, los cuales antiguamente se destinaban a una amputación primaria. Afortunadamente nuevas aportaciones provenientes del campo de la terapia génica han surgido; estas contribuyen a la aparición de terapias emergentes competitivas o alternativas a las existentes.

A partir de los estudios de Risau, nuevas evidencias mostraron que dentro de la médula ósea (MO) existe un progenitor común para las células hematopoyéticas y endoteliales: el hemangioblasto (3-5), identificado por la expresión del antígeno de superficie AC133. Estas, coexpresan también el antígeno CD34, aunque existe un pequeño porcentaje que son CD34 negativas (6). Puesto que, recientemente, Tateishi-Yuyama y cols. publicaron que la inyección de células mononucleadas de MO mejora la isquemia en miembros inferiores en humanos debido al aporte de células progenitoras endoteliales y la secreción de factores angiogénicos y/o citocinas (7), la evidencia de que la inducción de nuevos vasos en tejidos *in vivo*, a partir de células madre de la MO, es posible, puede ser debida a los hemangioblastos.

En 1997 el grupo de Asahara y cols. (8) logró demostrar la existencia de células progenitoras endoteliales, CPE (CD34+), en la sangre periférica (SP), capaces de diferenciarse *in vitro* a células en-

doteliales maduras, en respuesta a los factores de crecimiento (VEGF, Fibroblast Growing Factor [FGF] y angiopoyetinas), y que, *in vivo*, son capaces de contribuir a la angiogénesis. En un trabajo posterior (9), probaron que estas CPE, que se encontraban circulando en la sangre periférica de adultos provenían de la MO y contribuían tanto a la neovascularización endógena de los tumores en desarrollo como a la cicatrización de heridas, ó a la neovascularización fisiológica que se produce durante el ciclo ovulatorio.

El antígeno AC133, por tanto, identifica una población celular inmadura que co-expresa el antígeno CD34 en gran de parte de sus células y diversos autores han demostrado su capacidad de diferenciación a células endoteliales *in vitro* e *in vivo* (10, 11). Dicha población se puede encontrar en la MO, como ya hemos expuesto, y también en la SP de individuos adultos.

El presente trabajo tiene como objetivo principal analizar la seguridad y eficacia de las célu-

las AC133+, obtenidas de sangre periférica, en el tratamiento de pacientes con isquemia crítica de las EEII, así como determinar la seguridad de la administración Intra-Muscular de las células AC133+ movilizadas a Sangre Periférica y su capacidad de aumentar la revascularización de MMII en pacientes con isquemia crítica de las EEII.

### MATERIAL Y MÉTODOS

El presente ensayo ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de Salamanca y cumple con la Declaración de Helsinki de 1975, enmendada en 1983, 1989, 1996, 2000.

De junio de 2004 a noviembre de 2005 se han incluido 3 pacientes varones con enfermedad arterial, procedentes de la consulta de cirugía vascular. Los mismos cumplían con todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión (Tabla 1). To-

TABLA 1. Criterios de inclusión, exclusión y retirada

INCLUSIÓN	EXCLUSIÓN	RETIRADA
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diagnóstico de isquemia crítica crónica de las extremidades inferiores;</li> <li>• Estadios III o IV: dolor reposo, úlcera o gangrena menor, sin amputación mayor;</li> <li>• Índice T/B &lt;0.60;</li> <li>• Arteriosclerosis o tromboangéitís obliterante (enfermedad de Buerger);</li> <li>• Contraindicación general (ASA 3-4 y 4) o inoperabilidad local (arteriografía);</li> <li>• Edad entre 18 y 75 años;</li> <li>• Serología VIH, VHB y VHC negativa;</li> <li>• En caso de mujer en edad fértil, test de embarazo negativo;</li> <li>• Firma del consentimiento informado por escrito ante testigo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diabetes mellítas;</li> <li>• Tratamiento concomitante con prostaglandinas;</li> <li>• Estimulación medular eléctrica o simpatectomía concomitante;</li> <li>• Cirugía arterial o angioplastia concomitante;</li> <li>• Enfermedad maligna concomitante o previamente tratada con quimioterapia;</li> <li>• Enfermedad grave concomitante no bien controlada;</li> <li>• No consentimiento informado.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presencia de acontecimiento adverso grave;</li> <li>• No obtención del mínimo de células AC133+ necesarias para la realización del estudio (0,5 x108 células AC133+);</li> <li>• Condiciones clínicas del paciente que impiden su continuidad:                         <ul style="list-style-type: none"> <li>o Necesidad de medicación concomitante excluyente del ensayo;</li> <li>o Necesidad de procedimiento excluyente del ensayo;</li> <li>o Dolor rebelde que precisa amputación;</li> </ul> </li> <li>• Otras violaciones del protocolo;</li> <li>• Decisión facultativa;</li> <li>• Renuncia del enfermo a continuar en el estudio;</li> <li>• Pérdida de seguimiento.</li> </ul>

dos los pacientes han firmado un consentimiento informado con explicaciones detalladas de la técnica (en dos fases), sus ventajas (alternativa a la amputación) e inconvenientes (problemas técnicos y posibles complicaciones).

### Paciente 1

Varón de 74 años, con antecedente de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, carcinoma epidermoide de laringe tratado con microcirugía laringea e hipertensión arterial. Fue sometido a tromboendarterectomía carotídea. Ex-fumador y ex-bebedor. Desde hace 9 años (1996) presenta en la extremidad inferior derecha una claudicación intermitente a 250 metros. En mayo/2002 (6 años después), progresa la enfermedad vascular periférica, presentando dolor a 50 metros y dos úlceras maleolares, que motivan la realización de un *bypass* axilo-femoral derecho. A los 9 meses (febrero/2003) dicho *bypass* se trombosa, practicándose entonces una trombectomía de la prótesis axilo-femoral y asociando un *bypass* femoro-poplíteo. Tres meses después reingresa (mayo/2003), por obstrucción del *bypass* axilo-femoral y femoro-poplíteo. En dicho momento, el paciente refiere dolor en reposo de la extremidad inferior derecha, de característica urente, que se exacerba con la elevación del miembro. En la exploración física de la pierna derecha destaca la presencia de dos úlceras, en tercio distal de la cara interna, de 6.2 x 2.8 cm (superficie = 11.6 cm<sup>2</sup>) y 5.2 x 3.8 cm (15.8 cm<sup>2</sup>) y otra úlcera en maléolo externo de 1 x 1 cm (0.8 cm<sup>2</sup>), todas ellas con signos de mala cicatrización (sin tejido de granulación). Así mismo presenta gangrena digital menor de los tres primeros dedos del pie derecho. No existe ninguna lesión trófica en extremidad inferior izquierda. En dicho momento se constata la ausencia de pulsos palpables a nivel femoral, poplíteo, tibial posterior o pedio de ambas extremidades. Índices tobillo/brazo: 0.23 (derecho), 0.46 (izquierdo). Claudicometría con distancia absoluta de 37 metros. En una escala del dolor de 0-10 puntos, en donde el 10 corresponde al máximo dolor soportable por el enfermo, el mismo se auto puntuaba en 5pts para miembro inferior derecho. Angiografía: enfermedad

aorto-iliaco-femoral bilateral con oclusión de iliaca común y externa derechas, femoral superficial derecha, con mala recanalización en femoral profunda derecha, oclusión poplíteo recanalizando tardíamente en arteria tibial anterior derecha. En el miembro inferior izquierdo se aprecia estenosis segmentarias en iliaca externa y oclusión de la arteria femoral superficial con abundante colateralización desde la arteria femoral profunda que recanaliza a la arteria poplíteo izquierda, tibial anterior, tronco tibio-peroneo y arteria peronea. Arteria tibial posterior ocluida. Angio-RM: similar resultado a la arteriografía.

Diagnóstico: isquemia crítica en extremidad inferior derecha (estadio IV de Fontaine) en paciente con enfermedad oclusiva aorto-iliaca y femoro-poplíteo combinada. El paciente rechaza nueva cirugía arterial directa. Se le proponen diversas alternativas.

### Paciente 2

Varón de 67 años, fumador de 14 cigarros por día, con antecedentes de nefrectomía por tuberculosis renal en 10/2002 y orquiectomía por tumoración en 1993. HTA controlada. Hipercolesterolémico. Acude por claudicación intermitente para 100m desde el año 2002 negándose a operarse de antemano. Ha seguido tratamiento conservador desde entonces con mejorías y empeoramientos de su claudicación nunca habiendo dejado de fumar.

En el examen físico no presenta lesiones en EEII. Presencia de atrofia muscular (pantorrillas), distrofia de uñas y reducción del vello. Ausencia de pulsos en las dos extremidades a todos los niveles excepto en arteria femoral derecha (muy débil). ITB en reposo de 0.61/0.27. Claudicometría con distancia absoluta de 136 metros. En una escala del dolor de 0-10 puntos, en donde el 10 corresponde al máximo dolor soportable por el enfermo, el mismo se auto puntuaba en 8pts para miembro inferior izquierdo al caminar. La arteriografía demuestra oclusión de la arteria iliaca común izquierda y recanalización en femoral común izquierda, con el resto del árbol arterial del referido miembro sin alteraciones.

**Diagnóstico:** Isquemia crónica de las extremidades inferiores, mayor a la izquierda (estadio IIB de Fontaine). Se le propone *bypass* femoro-femoral cruzado que es rechazado por el enfermo diversas veces.

**Paciente 3**

Varón de 71 años, ex-fumador, hipertenso, hiperlipémico, cardiópata, con antecedentes de EPOC e prostatectomía por CA de próstata operado en 2002. Ya había sido operado con un *bypass* femoro-popliteo a la derecha (2004) y un *stent* coronario en el 2003 por IAM antero-septal. Acude por claudicación intermitente para 100 metros.

En el examen físico no presenta ulceraciones ni heridas en EEII, presenta disminución del vello y onicodistrofia. Ausencia de pulsos en los dos miembros inferiores excepto en femoral izquierdo muy débilmente. ITB 0.72/0.81. Claudicometría con distancia absoluta de 133 metros. En una escala del dolor de 0-10 puntos, en donde el 10 corresponde al máximo dolor soportable por el enfermo, el mismo se auto puntuaba en 8pts para miembro inferior derecho.

La arteriografía y angio-RM demuestran enfermedad arterial obstructiva con oclusión de la salida de la femoral superficial derecha recanalizando por colaterales y ocluyéndose nuevamente en el tercio distal. Poplíteo y trifurcación tibio-peronea recanalizan por colateralidad.

**Diagnóstico:** Isquemia crónica de las extremidades inferiores, más sintomática a la derecha (estadio IIB de Fontaine). La extremidad iz-

quierda presenta el mismo patrón. Elegida la extremidad derecha para el tratamiento.

**VARIABLES ESTUDIADAS Y CRITERIOS DE VALORACIÓN**

**Clínicas:** Se valoraron pruebas analíticas varias (Figura 1), el éxito técnico (sí/no), la morbi/mortalidad (sí/no), el dolor en reposo (mejoría/empeoramiento), la preservación de la extremidad (sí/no) y la cicatrización de lesiones (sí/no); Hemodinámicas y Funcionales: Índice tobillo/Brazo (ITB) y Claudicometría – Se consideraron significativos incrementos a partir de 0,15 para el ITB. Para la claudicometría se midió la distancia de claudicación inicial y absoluta (en metros). Se valoró el porcentaje de caída de presiones (%) y el tiempo de recuperación (hasta el basal) en minutos); Anatómicas (colateralidad): Angio-RM y Arteriografía. Se valoraron por pares (Radiólogo Vascular y Cirujano Vascular) el estado de los vasos colaterales: 0 (sin desarrollo colateral), +1 (pequeño), +2 (moderado) o +3 (abundante); Calidad de Vida: Intermitent Claudication Questionnaire (ICQ) – Puntuación según el protocolo ICQ (12). Se comparó con la puntuación basal antes de iniciar el estudio (valor máximo de la escala: 100) (Tabla 2).

Cada paciente ha sido acompañado a lo largo de seis meses conforme el protocolo del estudio (Figura 1). Se utilizó el miembro contralateral como control para la valoración clínica, hemodinámica, funcional y anatómica. Todas las variables han sido recogidas en cuadernillos de recogida de datos individualizados.

**TABLA 2. Calendario de exploraciones**

	PRE – TRANSPLANTE	POST – TRANSPLANTE			
		24H	4S	12S	24S
Exploración	X	X	X	X	X
ITB	X		X	X	X
Claudicometría	X				X
Arteriografía	X				X
Angio RM	X		X	X	X
Calidad de Vida	X				X

Obs: 24H – 24 horas; 4s, 12s, 24s – 4 semanas, 12 semanas y 24 semanas.



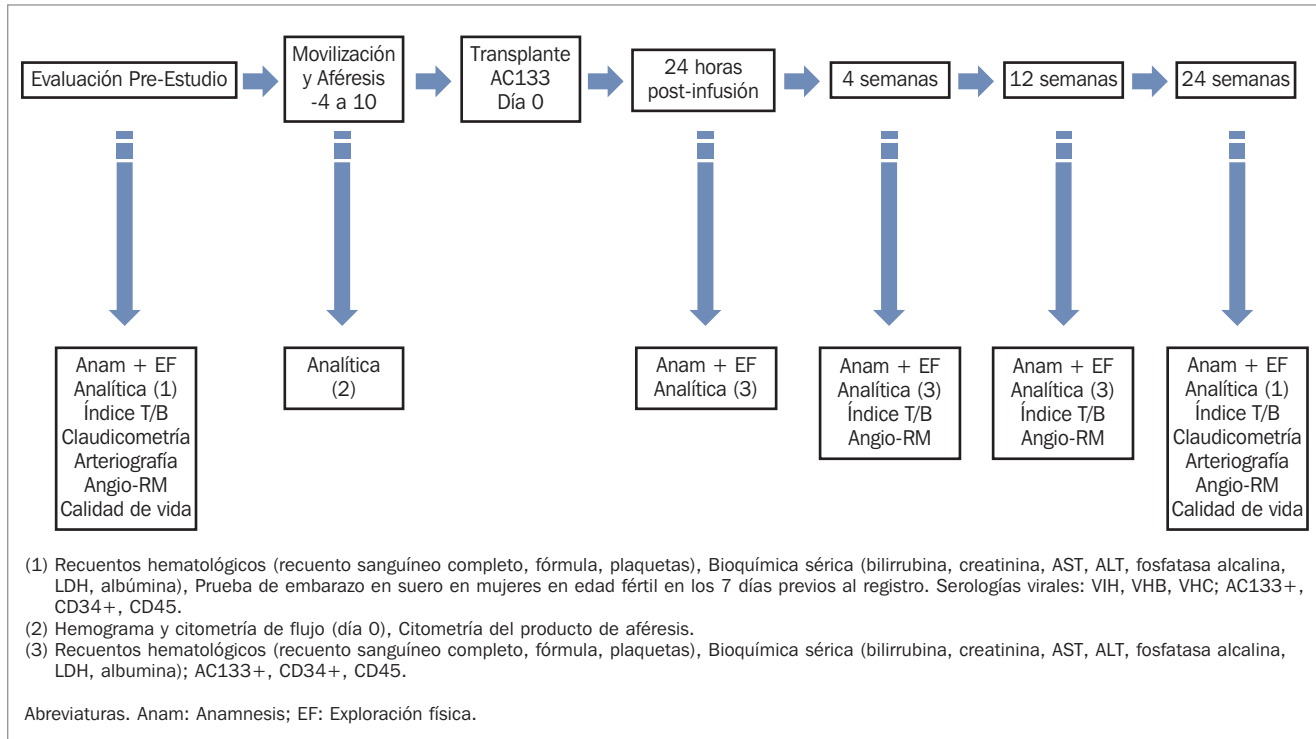


Fig. 1. Diseño del Estudio.

### MOVILIZACIÓN Y RECOLECCIÓN DE CÉLULAS AC133 DE SANGRE PERIFÉRICA

Para la movilización de las células hematopoyéticas a la SP desde la MO se utilizó un tratamiento estándar con Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) y para su recolección un procedimiento de aféresis de la siguiente forma:

- Administración de G-CSF 5 µg/Kg/12 horas, los días -4, -3, -2 y -1 (el día 0 recibió sólo una dosis al menos 2 horas antes de iniciar la leucoaféresis).
- De forma previa a la administración de la 9ª dosis de G-CSF se obtuvo una muestra de sangre periférica para determinar el porcentaje y el número total de células AC133 por µL.
- Recolección de células de sangre periférica utilizando el protocolo estándar de recolección de progenitores hematopoyéticos mediante el separador CobeSpectra (COBE BCT Inc). Se procesaron un total de 2-3 volemias por paciente.
- Selección de células AC133 positivas: una vez finalizado el proceso de leucoaféresis se determinó el número total de células AC133 y se

procedió a realizar una selección utilizando el sistema CliniMACS® (Miltenyi Biotec). El objetivo es obtener un mínimo de 0,5 x 10<sup>8</sup> células AC133 positivas.

- Las células se dividieron en dos alícuotas. Unas fueron criopreservadas y las otras se utilizaron para la inyección inicial en la extremidad con mayor isquemia. Las células se criopreservaron en un volumen aproximado de 50 mL con plasma autólogo y dimetil-sulfóxido (DMSO, al 10% del volumen final).

### ADMINISTRACIÓN DE LAS CÉLULAS A LOS PACIENTES

Se procedió en todos los casos a la administración de las células AC133+ antes de que se cumpliera 24 horas desde la aféresis y selección. El procedimiento se llevó a cabo en quirófano, con los cuidados de asepsia y antisepsia requeridos para una intervención quirúrgica, y anestesia loco-regional (peridural o raquidiana).

La administración se dio por medio de inyecciones intramusculares, en número de 10, en

puntos previamente marcados con un rotulador en el músculo gastrocnemio de la extremidad más afectada a una profundidad de 1,5 cm. Se inyectaron 0,50 ml por inyección separadas por una distancia de 2-3 cm (Figura 2).

Se empleó la pierna contralateral como control, aplicando con igual técnica solución salina 0,9%. La pierna no tratada sirvió como control comparando, su situación previa al inicio de la movilización, el posible beneficio obtenido únicamente con la movilización de los progenitores a la sangre periférica.

Terminada la inyección, las dos piernas han sido curadas con apósitos y vendas sin compresión, que fueron retiradas al día siguiente tras la exploración clínica y analítica (Figura 1). Se procedió al alta de los pacientes tras la analítica.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Por tratarse de un estudio que aún se está desarrollando y no tener finalizado el periodo de inclusión de pacientes nos limitamos a comentar el seguimiento de los tres primeros casos sin hacer análisis estadístico de los resultados del ensayo.

### RESULTADOS

#### Paciente 1

**Aféresis:** Se procesaron 3 volemiás y se recolectaron  $595 \times 10^8$  de células nucleadas. **Selección:** Se obtuvieron  $1.9 \times 10^8$  de células AC133 positivas. Las células se dividieron en dos alícuotas: una de ellas con  $0.95 \times 10^8$  de células AC133+ se utilizó para la inyección en la pantorrilla en las 6 horas siguientes tras la finalización de la leucoaféresis. La otra alícuota se criopreservó en un volumen de 50 ml con plasma autólogo y dimetil-sulfóxido (DMSO, al 10% del volumen final).

El procedimiento de aféresis y la inyección de células AC133+ fueron bien tolerados. Tras más de un año de seguimiento se constata preservación de la extremidad (no amputación). El paciente no presenta dolor de reposo y es capaz de caminar hasta 200 metros. Desaparición de los puntos de gangrena digital, cicatrización de la úlcera situada en el maléolo externo. Las úlceras

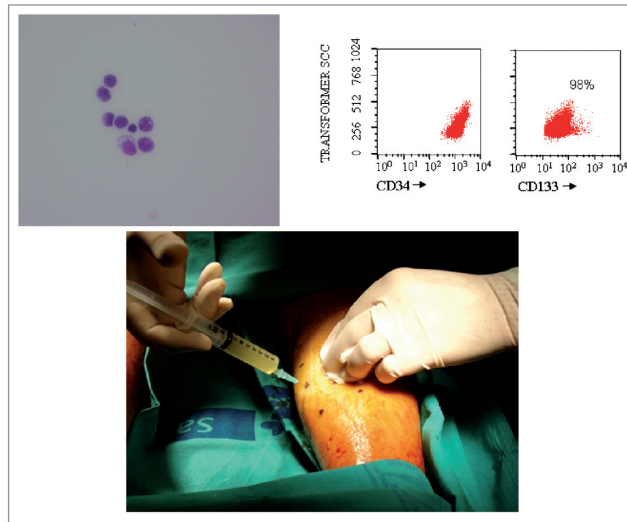


Fig. 2. Infusión intramuscular en el gastrocnemio de células AC133+ (Inf.). Identificación mediante citometría de flujo, expresión de los antígenos CD34 y AC133 (Sup.).



Fig. 3. Cicatrización de las lesiones cutáneas post infusión de progenitores AC133+. Área total de las lesiones: pre-infusión: 37,12cm<sup>2</sup>; Post-infusion: 17,25cm<sup>2</sup>. Reducción del 53,26%.

maleolares internas no han reducido su tamaño hasta pasados 1 año y medio desde el transplante. Actualmente con 2 años de seguimiento hubo una reducción de más del 50% del área total de las mismas (Figura 3). Los índices tobillo/brazo no se han modificado significativamente (0.25/0.53). Los estudios de imagen objetivan mayor captación en la arteria tibial anterior derecha y flujo en la arteria peronea derecha (que no presentaba en la exploración pre-procedimiento), mientras que la extremidad contralateral no evidencia alteraciones (Figura 4). La valoración por parte del paciente del dolor ha pasado de 5 a 2 puntos y la puntuación del WIQ de 48 a 54.

Barros M. B., González Porras J. R.,  
Sánchez-Guijo F. M., et al.

Angiogenesis Terapéutica Mediante AC133+



Fig. 4. Angio-RMN pre y post infusión (24 semanas) de células AC133+. Aparición de la arteria peronea derecha (flecha).

### Paciente 2

**Aféresis:** Se procesaron 2,6 volemias y se recolectaron 525 x 108 de células nucleadas. **Selección:** Se obtuvieron 2,26 x 108 de células AC133 positivas. Las células se dividieron en dos alícuotas: una de ellas con 1,13 x 108 de células AC133+ se utilizó para la inyección en la pantorrilla en las 6 horas siguientes tras la finalización de la leucoaféresis, la otra se criopreservó.

Igualmente al primer paciente, el procedimiento de aféresis y la inyección de células AC133+ fueron bien tolerados. Tras más de seis meses de seguimiento se constata preservación de la extremidad (no amputación). El paciente no presenta dolor de reposo y es capaz de caminar más de 144 metros. Los índices tobillo/brazo se han modificado de 0.61 D / 0.27 I a 0.63 D / 0.37 I. El grado de dolor puntuado por el paciente varió de 8 para 5. La angio-RM objetiva mayor captación en la arteria tibial anterior izquierda y aumento de la colateralización en pantorrilla izquierda (que no presentaba en la exploración pre-procedimiento), mientras que la extremidad contralateral no evidencia alteraciones. La arteriografía no evidencia aumento de colateralización en pantorrilla izda. La puntuación del WIQ de 64 a 70.

### Paciente 3

**Aféresis:** Se procesaron 2 volemias y se recolectaron 669 x 108 de células nucleadas. **Selección:** Se obtuvieron 1,88 x 108 de células AC133 positivas. Las células se dividieron en dos alícuotas: una de ellas con 0,94 x 108 de células AC133+

se utilizó para la inyección en la pantorrilla en las 6 horas siguientes tras la finalización de la leucoaféresis, la otra se criopreservó.

El procedimiento de aféresis y la inyección de células AC133+ también fueron bien tolerados. Tras 6 meses de seguimiento se constata mejoría subjetiva. El paciente no presenta dolor de reposo y es capaz de caminar 118 metros. Los índices tobillo/brazo se han modificado de 0.72 D / 0.81 I a 0.56 D / 0.64 I reflejando progresión lenta de la enfermedad bilateralmente. El grado de dolor puntuado por el paciente varió de 8 para 6 en la extremidad tratada y no varió en la contralateral. La angio-RM objetiva mayor captación en la arteria peronea derecha y aumento de la colateralización en pantorrilla derecha (que no presentaba en la exploración pre-procedimiento), mientras que la extremidad contralateral no evidencia alteraciones. La arteriografía no evidencia aumento de colateralización en pantorrilla derecha. La puntuación del WIQ de 75 a 69. El paciente refiere mejoría en la calidad del dolor en la extremidad tratada con menos dolor que en la contralateral (mejoría subjetiva).

### DISCUSIÓN

La Terapia Celular es una alternativa clínica de reciente aplicación que presenta grandes perspectivas en el tratamiento de diferentes patologías como el infarto de miocardio, diabetes, enfermedad de Parkinson, isquemias periféricas, etc. Además, el número de órganos productores de células madre en individuos adultos ha aumentado, existiendo, en la actualidad, diversas localizaciones de las mismas: MO, SP movilizada, músculo, etc.

Estudios preclínicos han demostrado que factores de crecimiento angiogénico promueven el desarrollo de arterias colaterales, lo cual se denomina «angiogénesis terapéutica»(13). Al mismo tiempo, las células madre adultas (células madre obtenidas de tejidos adultos) han demostrado su capacidad de diferenciarse a tejidos derivados de las tres capas embrionarias. En concreto, diversos trabajos han demostrado que existen células en la médula ósea adulta, como las células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas y, más recientemente, las células madre multipoten-



ciales (MAPC), con capacidad de diferenciarse a distintos tejidos (14-18).

Entre las células madre existentes en médula ósea, la expresión del antígeno de superficie AC133, como ya abordado anteriormente, define una población enriquecida en progenitores hemangioblásticos (célula con capacidad de diferenciarse tanto a células hematopoyéticas como a células endoteliales) (10, 19). Las células AC133+ co-expresan el antígeno CD34, aunque existe un pequeño porcentaje que son CD34 negativas (6).

Se encontraron, además, indicios de que estas mismas células estaban presentes en diversos órganos (bazo, pulmones, hígado, intestino, piel y musculatura isquémica), lo que implica un papel de las CPE en el mantenimiento fisiológico de los órganos. Las CPE derivadas de la MO circulantes deben dirigirse hacia el estroma de los órganos, en respuesta a ciertos estímulos como el trauma o la isquemia (20, 21) con el propósito de suministrar reservorios de mantenimiento de células endoteliales (EC). Estos hallazgos sugieren que tanto el endotelio vascular como las células mesenquimales pueden derivarse de la MO y contribuir a la regeneración y mantenimiento de los órganos.

El presente estudio se basa en los siguientes principios: 1. Las células AC133+ son capaces de diferenciarse, tanto *in vitro* como *in vivo*, a células endoteliales y contribuir a la angiogénesis y vasculogénesis (10, 11, 25). 2. La administración de progenitores hemangioblásticos enriquecidos en células AC133+ en un modelo animal de infarto de Miocardio aumenta la vasculogénesis y angiogénesis en la región infartada y contribuye a mejorar la función cardiaca previniendo la apoptosis de cardiomiocitos (15). 3. Es posible obtener un número elevado de células AC133+ a partir de sangre periférica mediante el tratamiento durante 5 días con G-CSF (20). 4. Las células AC133+ pueden ser seleccionadas mediante un sistema comercial aprobado para su utilización clínica. 5. Existen poblaciones de células madre en médula ósea con capacidad de ser movilizadas a sangre periférica y de diferenciarse hacia células con características de endotelio 6. El ensayo llevado a cabo por Tateishi-Yuyama et al. demuestra que la inyección de células de MO sin seleccionar permite la revascularización en EEII isquémicas.

En nuestro estudio, buscamos aislar tal célula, el hemangioblasto (AC133+ inyectarlas directamente en la zona afectada (EEII isquémicas), a diferencia de lo que hicieron Tateishi-Yuyama et al (7). El valor potencial de este abordaje reside en el hecho de que proporciona una fuente de células endoteliales resistentes que puede complementar las estrategias actuales de terapia con factores de crecimiento angiogénicos. De hecho, actualmente se piensa que parte del impacto favorable de la terapia con estos factores se debe a la movilización de las EPC (9) desde la MO (22, 23). Estudios con el VEGF y FGF-2 como inductores de neovascularización, demuestran que la contribución de las EPC movilizadas desde la MO es de hasta un 26% y que las mismas actúan no solamente al estar involucradas directamente en la formación del nuevo vaso, sino también como fuentes productoras de factores de crecimiento/citocinas (24).

Nuestros resultados aunque preliminares son esperanzadores; en todos los casos la valoración del procedimiento (movilización, recolección e inyección de las células) ha transcurrido sin morbi/mortalidad alguna; pero lo más relevante es la favorable evolución a medio-largo plazo, tanto objetiva (casos 1 y 2) como subjetiva (caso 3).

A pesar de todo ello, hemos de ser prudentes en correlacionar causa (terapia celular) y efecto (mejoría clínica). En este periodo, nuestros pacientes no han recibido ningún tratamiento hiperémico (prostaglandinas, simpatectomía lumbar o neuroestimulador), y solo han continuado con la medicación previa a la terapia celular (antiagregación plaquetaria convencional y heparina de bajo peso molecular a dosis profilácticas). Evidentemente, la evolución natural de la enfermedad isquémica puede haber generado circulación colateral, y también es sabido que la heparina de bajo peso molecular tiene propiedades relacionadas con la angiogénesis; sin embargo estas dos condiciones no afectaron en nada a la extremidad contralateral (que actuó como control). Los resultados finales del ensayo referido, donde nos falta incluir tres nuevos casos con estrictos criterios de inclusión-exclusión, y el seguimiento de los mismos a medio plazo seguramente nos clarifique el deseado efecto clínico de las células AC133 positivas, obtenidas de sangre periférica, en la isquemia crítica de las extremidades inferiores.

## Referencias bibliográficas

- Dormandy JA, Rutherford RB. Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). *J Vasc Surg.* 2000 Jan;31(1 Pt 2):S1-S296.
- Andreozzi GM, Martini R. The fate of the claudicant limb. *Eur Heart J* 2002 Mar Suppl 4: B41-B45.
- Flame I, Risau W. Induction of vasculogenesis and hemopoiesis *in vitro*. *Development.* 1992 Oct;116(2):435-9.
- His W. Leiothoblast und angioblast der wirbelthiere. *Abhandl K S Ges Wiss Math Phys* 1900; 22:171-328.
- Weiss M, Orkin SH. *In vitro* differentiation of murine embryonic stem cells: new approaches to old problems. *J Clin Invest.* 1996 Feb 1;97(3):591-5.
- Almeida J, Bueno C, Alguero MC, Sánchez ML, Cañizo MC, Fernández ME et al. Extensive characterization of the immunophenotype and pattern of cytokine production by distinct subpopulations of normal human peripheral blood MHC II+/lineage-cells. *Clin Exp Immunol.* 1999 Dec;118(3):392-401.
- Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, 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 Aug 10;360(9331):427-35.
- 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 Feb 14;275(5302):964-7.
- 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 Aug 6;85(3):221-8.
- Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, et al. *In vitro* differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood.* 2000 May 15;95(10):3106-12.
- Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Delilieri GL. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol.* 2001 Oct;115(1):186-94.
- Chong PF, Garratt AM, Golledge J, Greenhalgh RM, Davies AH. The intermittent claudication questionnaire: a patient-assessed condition-specific health outcome measure. *J Vasc Surg.* 2002 Oct;36(4):764-71.
- Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest.* 1999 May;103(9):1231-6.
- Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest.* 2001 Jun;107(11):1395-402.
- Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* 2001 Apr;7(4):430-6.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001 Apr 5;410(6829):701-5.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 28;98(18):10344-9.
- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 2002 Jan 1;105(1):93-8.
- de Wynter EA, Buck D, Hart C, Heywood R, Coutinho LH, Clayton A, et al. CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells.* 1998;16(6):387-96.
- Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 1999 Apr;5(4):434-8.
- Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)/AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res.* 2001 Feb 2;88(2):167-74.
- Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 1999 Jul 15;18(14):3964-72.
- Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravereaux E, et al. Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res.* 2000 Jun 23;86(12):1198-202.
- Murayama T, Tepper OM, Silver M, Ma H, Losordo DW, Isner JM, et al. Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization *in vivo*. *Exp Hematol.* 2002 Aug;30(8):967-72.
- Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000 Feb 1;95(3):952-8.