

Angiogénesis terapéutica de extremidades isquémicas mediante linfocitos y monocitos de médula ósea en un modelo murino y de sangre periférica con uso clínico

Hongkun Zhang¹, Nan Zhang², Ming Li¹, Hua Feng¹, Wei Jin¹, Haige Zhao¹, Xudong Chen¹
y Lu Tian¹, Hangzhou, República de China

Investigamos la utilidad de la angiogénesis terapéutica con linfocitos y monocitos de médula ósea (LM-MO) en un modelo murino de isquemia de extremidad inferior y, con uso clínico, de los linfocitos y monocitos obtenidos a partir de sangre periférica (LM-SP) de los pacientes. En el modelo animal, los linfocitos y monocitos de médula ósea se aislaron e inyectaron en los músculos esqueléticos isquémicos de ratones. Después del procedimiento quirúrgico se efectuó una evaluación con láser Doppler e histológica. En el ensayo clínico, 15 pacientes con isquemia crítica de la extremidad inferior recibieron previamente inyecciones subcutáneas de factor humano recombinante estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF), a fin de estimular la producción de linfocitos y monocitos. Tras su aislamiento en sangre periférica se trasplantaron directamente en la extremidad isquémica. Las células endoteliales derivadas de linfocitos y monocitos de médula ósea se prepararon en una placa, y acto seguido, se indujeron para la formación de redes tridimensionales mediante invasión de Matrigel. En el modelo murino, a las 4 semanas de la implantación de los linfocitos y monocitos de médula ósea, el análisis con láser Doppler demostró que el cociente del flujo sanguíneo había aumentado significativamente en las patas isquémicas de los ratones ($0,67 \pm 0,2$ comparado con $0,44 \pm 0,02$). El análisis de fosfatasa alcalina y el inmunohistoquímico demostraron que la densidad capilar aumentó significativamente ($95,25 \pm 0,07\%$ comparado con $39,6 \pm 0,04\%$). En los pacientes incluidos en el ensayo clínico, a los 2 meses de la implantación de los linfocitos y monocitos de sangre periférica, los valores del índice tobillo-brazo, distancia deambulada, escala de dolor y presión de oxígeno transcutánea (TcO_2) mejoraron significativamente ($p < 0,005$). Después del trasplante de células se curó un total de seis de 15 úlceras de las extremidades de pacientes sometidos al trasplante. El implante de linfocitos de médula ósea fue capaz de inducir una angiogénesis funcional en la pata trasera isquémica de ratones. En el ensayo clínico se demuestra que el trasplante de linfocitos de sangre periférica tras estimular su producción con G-CSF es un tratamiento viable para la isquemia de la extremidad inferior.

INTRODUCCIÓN

La angiogénesis terapéutica se ha inducido eficazmente con diversos métodos, y ha demostrado su

utilidad como nuevo tratamiento de la arteriopatía periférica (AP) con isquémica crítica, así como en la cardiopatía no candidata a tratamiento con fármacos, endoprótesis o *bypass*¹⁻³. La médula ósea

DOI of original article: 10.1016/j.avsg.2007.07.037.

¹Department of Vascular Surgery, First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, República de China, 310003.

²Department of Endocrinology, Sir Run Run Shaw Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, República de China, 310003.

Correspondencia: Hongkun Zhang, MD, PhD, Department of Vascular Surgery, First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, 79 Qing Chun Road, Hangzhou, República de China, 310003. Correo electrónico: doczhk@yahoo.com.cn

Ann Vasc Surg 2008; 22: 238-247

DOI: 10.1016/j.avsp.2008.06.001

© Annals of Vascular Surgery Inc.

Publicado en la red: 10 de marzo de 2008

(MO) contiene muchos tipos de células madre, incluidas las células progenitoras endoteliales (CPE) y las células madre hematopoyéticas, que pueden ser identificadas a partir de la presencia de antígenos de superficie celular comunes, como CD34 y KDR. Estas células, dada su actividad proliferativa elevada, pueden inducirse para diferenciarse y multiplicarse en condiciones apropiadas. Las CPE pueden diferenciarse en células endoteliales (CE) y liberar diversos factores angiogénicos⁴. Las CE han demostrado capacidad de producir angiogénesis *in vivo*. De hecho, en diversos estudios experimentales y ensayos clínicos^{5,6}, se ha demostrado que un trasplante de células CD34⁺ de médula ósea induce angiogénesis terapéutica en la isquemia de la extremidad o miocárdica.

Sin embargo, pruebas recientes han sugerido que las CPE pueden estar presentes en sangre periférica adulta⁴; alrededor del 0,002% de la fracción de linfocitos y monocitos circulantes en sangre completa son CPE⁷. Se ha demostrado que las CPE circulantes participan en la angiogénesis post-natal tras su movilización de la médula ósea⁸. El factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) se usa ampliamente en clínica para el tratamiento de la neutropenia febril inducida por la quimioterapia, la quimioterapia en dosis altas con trasplante de células progenitoras y la movilización de células madre de sangre periférica. Recientemente, se ha ensayado la inyección miocárdica de células madre de sangre periférica inducidas por G-CSF para desencadenar angiogénesis⁹.

En el presente estudio, investigamos la eficacia de los linfocitos y monocitos de médula ósea (LM-MO) para la inducción de angiogénesis terapéutica en las patas traseras isquémicas de ratones al igual que de los linfocitos y monocitos de sangre periférica (LM-SP) para la angiogénesis terapéutica en la isquemia de las extremidades inferiores de pacientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimentos en animales

Animales. Para los experimentos se usaron ratones macho C57BL/6, de 8-10 semanas de edad y de 250-280 g de peso. Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el comité de investigación sobre experimentos en animales de la Zhejiang University School of Medicine.

Aislamiento de los LM-MO de ratón. Los ratones se sacrificaron con anestesia general profunda (100 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilazina); la médula ósea se obtuvo a partir de las tibias y fémures de los animales. Los LM-MO se aislaron mediante

un gradiente Histopaque-1077. Las células se cultivaron en un medio MCDB131 que contenía un 20% de suero bovino fetal (SBF), 2 mM de glutamina y factor de crecimiento endotelial vascular (20 ng/ml de VEGF) a 37 °C con un 5% de CO₂, como se ha descrito previamente¹⁰.

Identificación de las CE. Después de 14 días de cultivo, examinamos la captación de lipoproteína de baja densidad marcada con 1,1-dioctadecilo-3,3,3,3-tetrametilindocarbocianina (Dil) (Dil-ac-LDL; Biomedical Technologies Inc, Stoughton, MA). Las células en cultivo se incubaron con Dil-ac-LDL (10 µg/ml) en seis pocillos durante 4 h a 37 °C y se observaron con microscopio de fluorescencia¹¹. La proliferación de CE derivadas de LM-MO se mantuvo en un medio MCDB131 suplementado con un 20% de SBF y se usaron para los estudios *in vitro* e *in vivo*.

Análisis de la formación de la red tridimensional *in vitro*. Para evaluar las actividades angiogénicas mediante la formación de túbulos de las CE diferenciadas usamos Matrigel (Sigma). El sistema Matrigel se preparó del modo siguiente: se mezclaron con hielo 5 volúmenes de la solución de Matrigel y 5 volúmenes de medio Eagle modificado por Dulbecco/F12 que se usó para revestir 24 pocillos (300 µl/pocillo). Al cabo de 20 min a 37 °C se formó un gel y se diferenciaron las CE (5 × 10⁴/ml) preteñidas con CM-Dil (Molecular Probes, Portland, OR) durante 20 min a 37 °C. Los geles se cultivaron en un medio MCDB131 suplementado con L-glutamina, SBF (2%), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF, 30 ng/ml, Sigma) y VEGF (20 ng/ml, Sigma). Los geles tridimensionales se incubaron a 37 °C durante 3 días. Para monitorizar la actividad angiogénica se fotografió la red funcional.

Isquemia unilateral de la extremidad inferior y trasplante de células. Se utilizó un modelo isquemia en la pata trasera izquierda de ratones macho C57BL. Bajo anestesia general, se ligaron, cortaron y seccionaron tanto la arteria y vena femoral superficial izquierda como la arteria y vena ilíaca externa y arterias y venas femoral profunda y circunfleja. En el modelo de ratón no se produce necrosis de la extremidad¹². En el día de la intervención, 10 ratones sometidos a este protocolo se asignaron aleatoriamente a uno de los dos grupos: con una aguja se inyectaron LM-MO heterólogos de ratón (1 × 10⁶ células, grupo B, n = 5) o suero fisiológico neutralizado con fosfato (SFP; grupo C, n = 5) en tres puntos de los músculos isquémicos del muslo.

Imágenes de la perfusión con láser Doppler. Determinamos el cociente del flujo sanguíneo de la extremidad isquémica (izquierda)/normal (derecha) usando un analizador de imagen de perfusión

con láser Doppler (IPLD) a los 14 y 28 días después de la implantación de células. Para reducir a un mínimo la variación de los datos debido a la luz y temperatura ambiental, las IPLD se expresaron como cociente del flujo sanguíneo de la extremidad isquémica/no isquémica.

Análisis histológico e inmunohistoquímico. Los ratones se sacrificaron a los 28 días. Se obtuvo el músculo del muslo de las patas traseras isquémicas y no isquémicas congelándose o fijándose en paraformaldehído al 4% para evaluar la densidad capilar. Los tejidos congelados se fijaron en ornitina carbamoil-transferasa (OCT) y se tiñeron en busca de fosfatasa alcalina (Biomed, Foster City, CA) utilizando un método de indoxil-tetrazolio para detectar las CE capilares, como se ha descrito previamente¹³. La tinción inmunohistoquímica se efectuó en los cortes fijados en parafina usando anticuerpos contra CD31 (primer anticuerpo, anticuerpos policlonales de ratón contra CD31; segundo anticuerpo, anticuerpo de carnero conjugado con isotiocianato de fluoresceína anti-inmunoglobulina G de ratón). Para los recuentos capilares se seleccionaron aleatoriamente cinco campos de dos muestras de músculo de cada animal. Para garantizar que las densidades capilares no se sobreestimaban o subestimaban debido al edema intersticial, se determinó el cociente capilar/fibra muscular.

Ensayo clínico

Pacientes. El estudio clínico fue aprobado por el comité de investigación Zhejiang University School of Medicine. Todos los participantes dieron y recibieron su consentimiento informado por escrito. Desde enero de 2004 a enero de 2005, se incluyeron 15 pacientes consecutivos con AP isquémica crítica en un ensayo clínico prospectivo cuyo objetivo era evaluar la seguridad, viabilidad y eficacia del trasplante de LM-SP. Todos los pacientes habían sido informados de que las arterias distales a la poplítea estaban obstruidas por completo, como se demostró mediante angiografía de sustracción digital (ASD) y angiografía por resonancia magnética (ARM) y habían perdido la posibilidad de cirugía o un tratamiento intervencionista. En 17 ocasiones se trasplantaron LM-SP autólogos en 15 pacientes, de los que 13 eran hombres y dos eran mujeres, 28-86 años de edad (media 60,7); duración de la enfermedad: 4 meses a 9 años (media 3,9 años); 10 casos de aterosclerosis ocluyente (ASO) de la extremidad inferior, cinco de tromboangiitis ocluyente (TAO), 11 con dolor en reposo, cuatro con claudicación intermitente, y seis con úlceras del pie (tres del primer dedo, una del tercer dedo y dos del quinto con

úlceras graves y exposición del hueso). El estado de la extremidad de los pacientes se evaluó con la clasificación de Fontaine. Cuatro pacientes se clasificaron en estadio II, cinco en estadio III y seis en estadio IV. Se habían sometido a cirugía mediante *bypass* arterial tres casos y a endarterectomía otro caso. Cuatro pacientes habían sido fumadores durante 3-5 años y dejaron de fumar antes del tratamiento. Hubo tres casos de diabetes y ningún caso de insuficiencia renal. No se observaron efectos satisfactorios después de más de 2 meses de tratamiento con fármacos como lipoprostaglandina E₁ (Mitsubishi Pharma Corp, Tokio, Japón), argatroban y cilostazol (China Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd, Zhejiang, China) y el mismo tratamiento farmacológico se continuó antes y después del trasplante.

Evaluación clínica. Todos los pacientes se evaluaron antes de la implantación. Los estudios de evaluación se efectuaron como se describe más adelante: (1) determinación del dolor utilizando una escala de dolor, (2) ASD o ARM, (3) índice de presión tobillo-brazo (ITB), (4) presión de oxígeno transcutánea (TcO₂) y (5) distancia deambulada sin dolor y distancia deambulada máxima sin pendiente. A los 2 y 12 meses tras la implantación, se evaluó a todos los pacientes mediante la escala de dolor, ITB, TcO₂ y distancia deambulada. En algunos pacientes se efectuó ASD.

Métodos. Todos los pacientes recibieron tratamiento con una dosis de 5 µg/kg/día de G-CSF humano recombinante (Filgastrin Kirin Pharmaceuticals, Tokio, Japón) mediante inyección subcutánea durante 3 días para movilizar las CPE. Se efectuó un recuento diario de leucocitos en sangre periférica. Al tercer día después de la movilización, se obtuvo una suspensión de 60 ml de LM-SP de los pacientes a través de un dispositivo Fenwal CS 300 Plus (Baxter, Estados Unidos) a través de una vena superficial y se concentró hasta 1-2 × 10⁶ LM/ml.

Flujocitometría. Adicionalmente examinamos las CPE de la circulación y obtuvimos una suspensión de LM-SP utilizando un antígeno de superficie celular, como se ha descrito previamente¹⁴. Los linfocitos y monocitos circulantes con CD34 se definieron como CPE.

En el quirófano, con anestesia epidural o regional, implantamos estas células en los músculos isquémicos de la pantorrilla alrededor de 2 h después de su obtención. Utilizando una aguja de calibre 22, los LM-SP se inyectaron por vía intramuscular hasta una profundidad de unos 1,5-2 cm a lo largo de la cara interna y externa de la pantorrilla. El volumen total de inyección fue de unos 60 ml, y en cada lugar

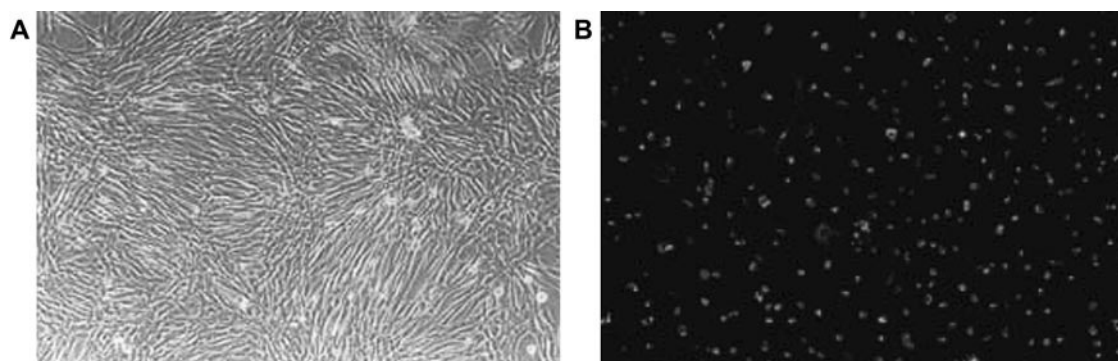


Fig. 1. Diferenciación de las células endoteliales (CE) a partir de linfocitos/monocitos de médula ósea *in vitro*. **A** Se produjo la clonación de células adherentes redondas, y las células continuaron expandiéndose y uniéndose formando una monocapa. **B** CE captadas por lipoproteína de baja densidad acetilada marcada con 1,1-dioctadecilo-3,3,3,3-tetrametilindocarbocianina (Dil-ac-LDL).

de inyección implantamos alrededor de 1 ml de LM-SP.

Obtención y evaluación de los datos. Los datos se obtuvieron prospectivamente y se efectuaron visitas de seguimiento desde los 4 a los 16 meses, con una media de 9,3 meses. Durante el seguimiento se prestó atención específica a cualquier efecto potencialmente adverso, en particular debido al trasplante. Utilizamos la escala de dolor en reposo (límites 0-10) sugerida por la universidad politécnica de Hong Kong¹⁵. En nuestro hospital para la evaluación de la distancia deambulada se usa una velocidad constante (3 km/h) en la misma calle. En el laboratorio vascular para todos los pacientes antes y después del tratamiento se determinaron el ITB y la TcO₂ de la cara medial del tobillo. A los 12 meses del tratamiento seis pacientes se sometieron a ASD.

Análisis estadístico

Todos los datos mostrados en el texto se expresan como medias \pm desviación estándar (DE). La significación estadística de las diferencias se analizó usando la prueba t de Student de dos colas. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos se efectuaron con el programa SPSS versión 10.0 para Windows (SPSS, Chicago, IL).

RESULTADOS

Estudio experimental en animales

Diferenciación de LM-MO e identificación de CE.

En el día 3, se produjo clonación de las células adherentes redondas. Las células también continuaron expandiéndose y las curvas de crecimiento mostraron un aumento de hasta 8 veces del número de

células tras 14 días de cultivo (fig. 1). La pureza de las CE se evaluó mediante la captación de Dil-ac-LDL, que demostró que era $> 80\%$ (fig. 1).

Estructura del modelo de formación de una red tridimensional. La pretinción de la monocapa de CE con CM-Dil y la observación *in situ* de la reconstrucción, mediante microscopio de contraste de fases y de fluorescencia, demostraron la formación de una monocapa confluyente en la superficie de Matrigel 6 h después de la siembra (fig. 2) a la que añadimos VEGF (20 ng/ml) y bFGF (20 ng/ml). A las 12 h, las células habían invadido el gel subyacente empezando a formar la estructura tubular (fig. 2). Después de 24 h de incubación, estas células se organizaron en capilares ramificados y formaron una red extensa (fig. 2).

Flujo sanguíneo evaluado mediante análisis IPLD.

La perfusión sanguínea de la pata trasera isquémica de los ratones, al igual que en los animales del grupo de control, se evaluó de inmediato tras la intervención y en los días postoperatorios 14 y 28 mediante técnicas de imagen con láser Doppler. En la figura 3 se muestran los resultados del análisis IPLD a los 0, 14 y 28 días después de la cirugía. En ambos grupos ($n = 5$) el cociente del flujo sanguíneo (izquierdo comparado con derecho, I/D) disminuyó inmediatamente después de la ligadura de la arteria femoral ($0,30 \pm 0,01$ [control] comparado con $0,30 \pm 0,02$ [LM-MO]). En el día 28, el flujo sanguíneo en el grupo tratado con LM-MO mejoró significativamente comparado con el de animales de control ($0,67 \pm 0,02$ comparado con $0,44 \pm 0,02$) (fig. 3).

Efecto de la implantación de LM-MO sobre la densidad capilar en las patas traseras isquémicas. La formación de capilares se evaluó mediante la tinción positiva para fosfatasa alcalina y CD31. La fosfatasa

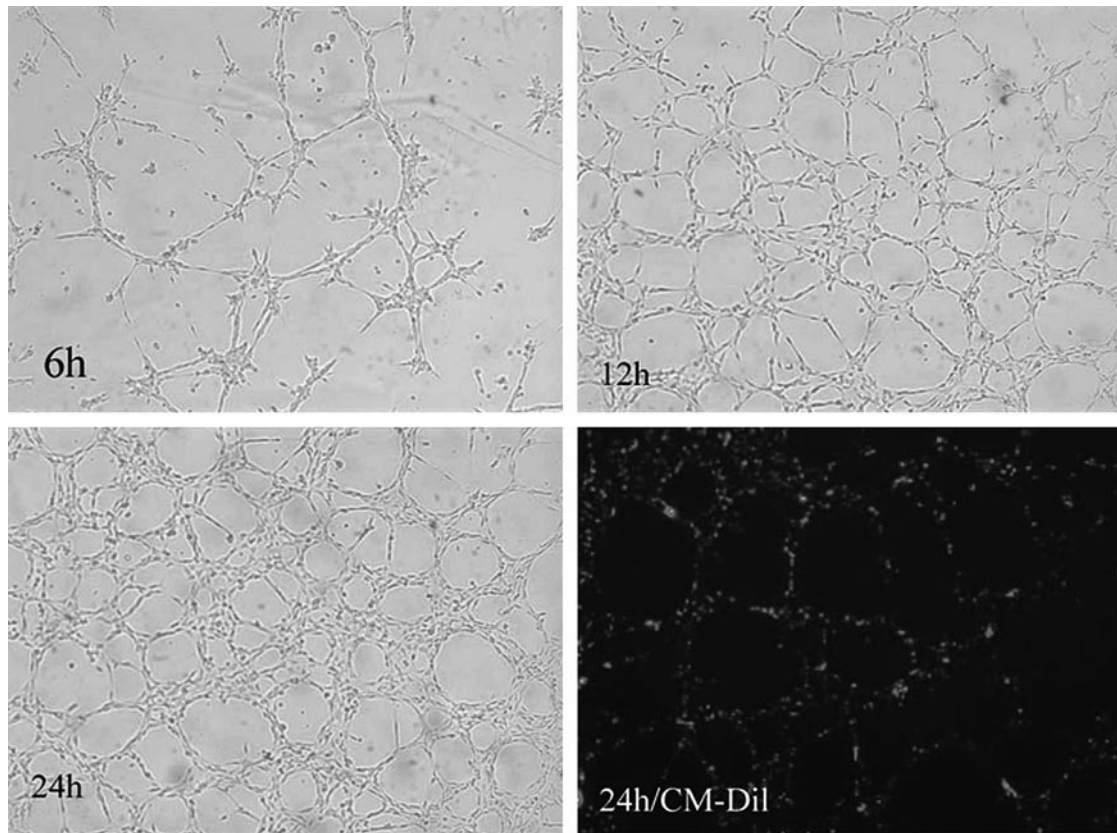


Fig. 2. Modelo *in vitro* de la formación de la red tridimensional. La microscopia de contraste de fases mostró la estructura tridimensional de la red en la superficie de Matrigel durante 6, 12 y 24 h incubado con bFGF (30 ng/ml) y VEGF (20 ng/ml). La pretinción de las células endoteliales con CM-Dil y la observación *in situ* mediante microscopia de fluorescencia invertida demostró la formación de una red a las 24 h.

alcalina es una enzima específica del endotelio de capilares, según lo evaluado usando un método con indoxil-tetrazolio para que la tinción de fosfatasa alcalina detectara capilares. Los músculos del muslo de las patas traseras isquémicas se examinaron histológicamente en el día 28. Como se muestra en la figura 4, la tinción de fosfatasa alcalina reveló la presencia de numerosas CE capilares en el grupo sometido a la implantación de LM-MO, pero un reducido número en el grupo de control. El cociente capilar/fibra muscular fue significativamente mayor en el grupo sometido a la implantación de LM-MO ($95,25 \pm 0,07\%$) que en el grupo de control ($39,6 \pm 0,04\%$). Se observaron resultados similares en la tinción de CD31 usando microscopia de fluorescencia (fig. 4).

Ensayo clínico

Análisis de las células CD34⁺. El porcentaje de células CD34⁺ en los LM-SP antes y después de la movilización por G-CSF fue de $0,013 \pm 0,005\%$ y

$0,86 \pm 0,80\%$ ($n = 17$, $p < 0,001$), respectivamente. En la suspensión final de LM-SP movilizados por G-CSF, el porcentaje de células CD34⁺ fue de $2,24 \pm 1,27\%$, como se demostró mediante el análisis de clasificación de las células activadas por fluorescencia (CCAF) (tabla I).

Durante y después del trasplante de LM-SP en ninguno de los 15 casos se observaron efectos adversos de gravedad, excepto un caso de inflamación de la extremidad, y los síntomas clínicos principales de los grupos con ASO y TAO mejoraron de manera destacada. A los 2 y 12 meses de la implantación de LM-SP, en ambos subgrupos, los valores del ITB, distancia deambulada, escala de dolor y TcO₂ mejoraron significativamente ($p < 0,005$) (tabla II, fig. 5). En la visita final se observó la curación completa de las úlceras en cinco de los casos, excepto en uno con una úlcera en el dedo pequeño. En los pacientes sometidos a trasplante no se produjeron amputaciones.

Evaluación angiográfica. A las 24 semanas después del trasplante, en seis de 15 pacientes el análisis

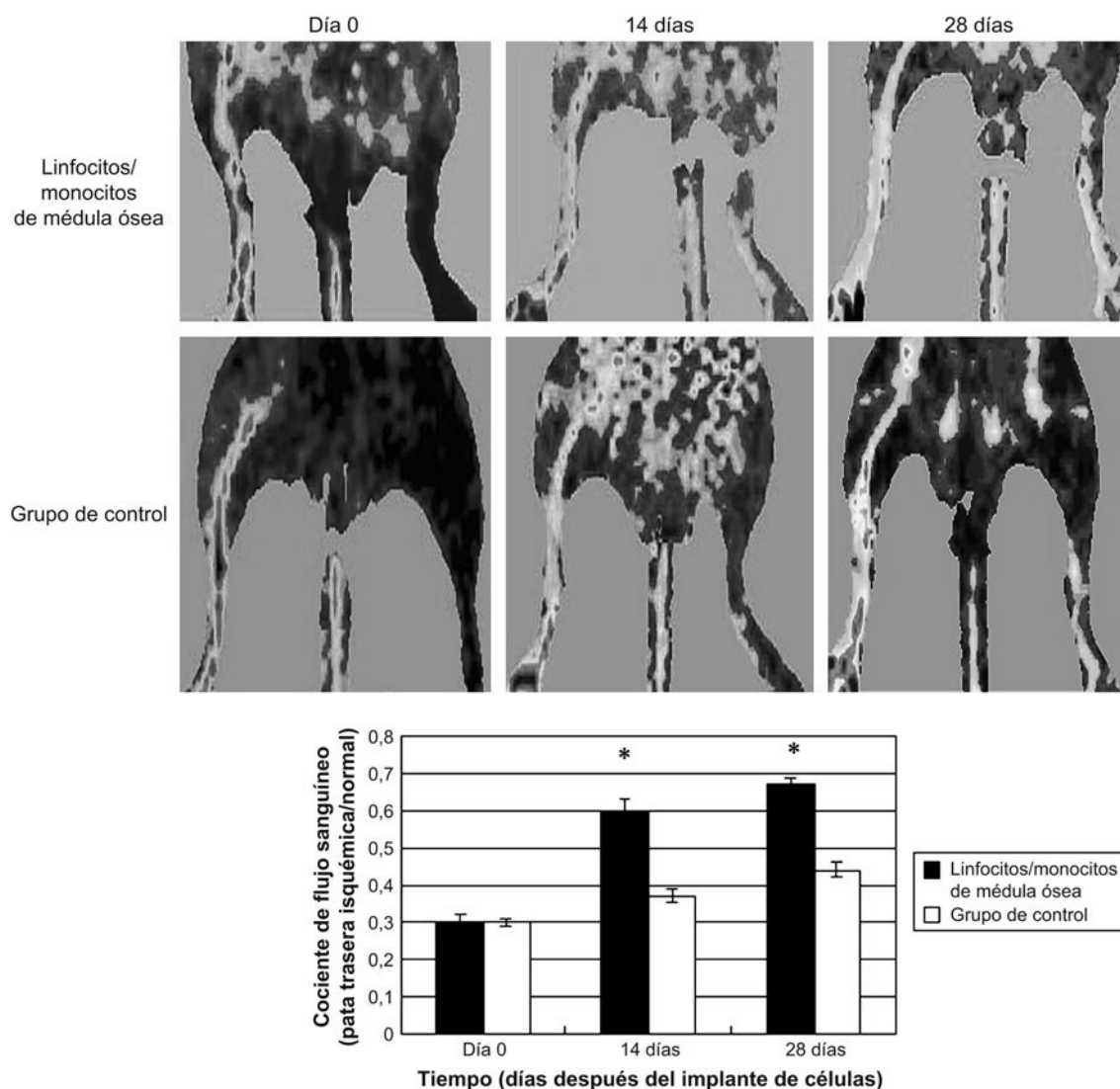


Fig. 3. Análisis de las imágenes de perfusión con láser Doppler (IPLD) de la reperusión sanguínea en la pata trasera isquémica de ratón. El flujo sanguíneo de las patas traseras se determinó utilizando un analizador IPLD. **A** resultados representativos del análisis IPLD realizado inmediatamente después del desarrollo de isquemia de pata trasera y, de nuevo, 7 y 28 días más tarde. El análisis IPLD demostró una profunda mejora de la perfusión de las patas traseras al cabo de 28 días del trasplante de linfocitos/monocitos de médula ósea. **B** El análisis IPLD asistido por ordenador reveló un cociente de perfusión de las patas traseras isquémicas (*izquierda*): patas traseras normales (*derecha*) significativamente mayor en el grupo sometido al trasplante que en el de control (* $p < 0,05$ comparado con grupo de control).

mediante ASD reveló la formación significativa de nuevos vasos¹⁶ (fig. 6).

DISCUSIÓN

Es bien conocido que la médula ósea contiene muchos tipos de células inmaduras, incluidas las CPE, algunas de las cuales muestran antígeno CD34⁺. Las CPE pueden inducirse para diferenciarse en CE vasculares en ciertas condiciones. Charles et al¹⁷ aislaron células CD34⁺ de médula

ósea y las inyectaron directamente en el miocardio isquémico. Se formaron nuevos vasos colaterales en el área isquémica. En nuestro estudio previo¹⁸, trasplantamos células CD34⁺ de MO autóloga para inducir la angiogénesis en un modelo de isquemia de pata trasera de perro. La microscopia de fluorescencia reveló que las células trasplantadas se incorporaron a la red capilar. En el grupo sometido al trasplante de células CD34⁺ se detectó un mayor número de vasos colaterales en la angiografía y una mayor densidad capilar en la histología, lo que

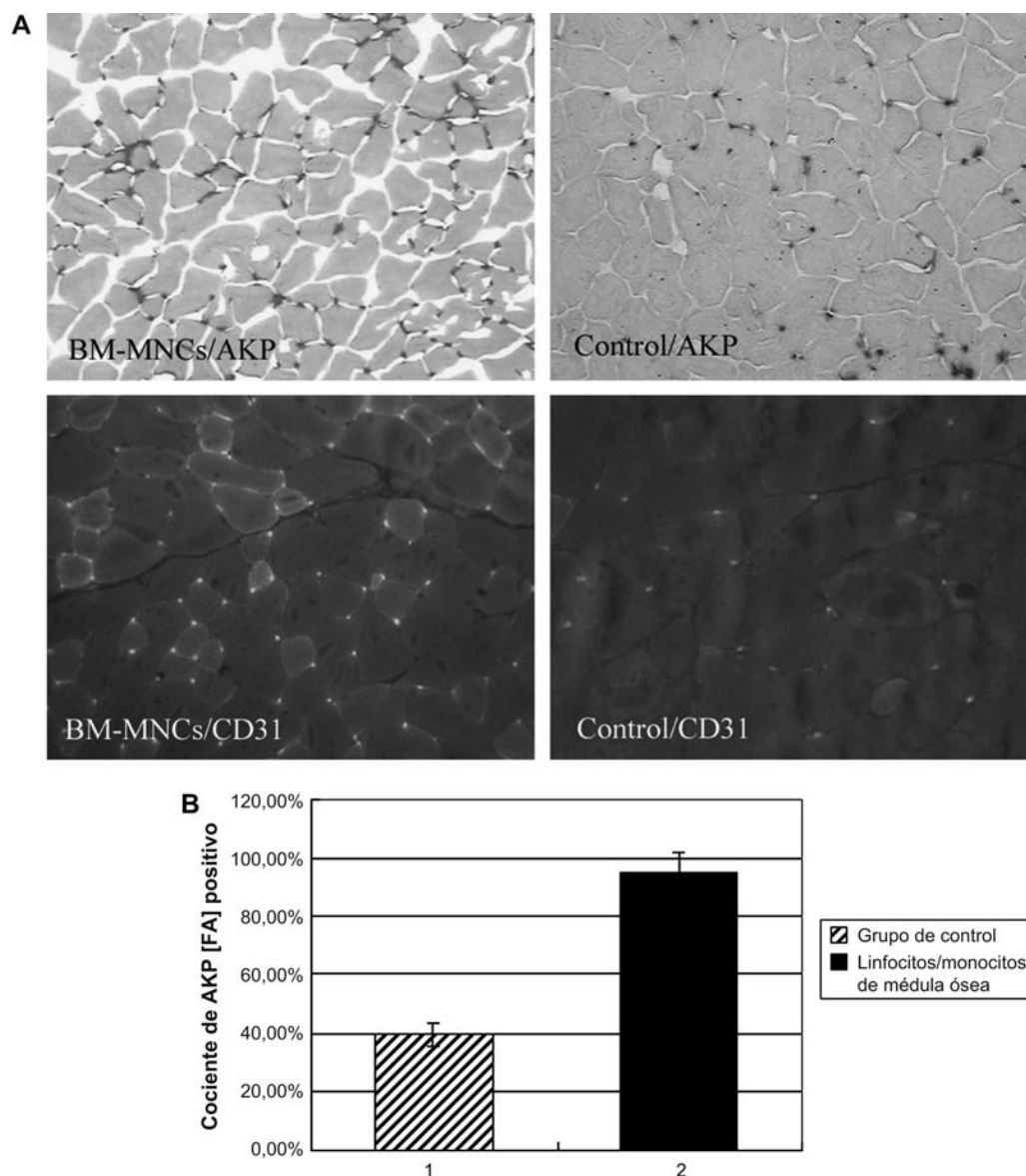


Fig. 4. Evaluación histológica de la angiogenesis en los músculos esqueléticos isquémicos. **A** La tinción de fosfatasa alcalina (AKP [FA]) y de CD31⁺ reveló la presencia de numerosos capilares en ratones sometidos al trasplante de linfocitos/monocitos de médula ósea. Sin embargo, en el grupo de control se observó un menor número de capilares. **B** Los análisis cuantitativos revelaron que en los tejidos musculares esqueléticos isquémicos el cociente capilares/fibras musculares fue significativamente mayor en el grupo sometido al trasplante que en el de control (**p* < 0,05 comparado con el grupo de control).

Tabla I. Cambio proporcional de CD34 antes y después de la obtención de células madre mediante análisis flujocitométrico

		Suspensión final LM-SP movilizados G-CSF		
	N.º	LM-SP ($\times 10^8/l$)	CD34 ⁺ (%)	CD34 ⁻ (%)
Antes	17	0,66 \pm 0,11	0,86 \pm 0,80	75,87 \pm 7,81
Después	17	17,87 \pm 4,85	2,24 \pm 1,27	74,10 \pm 9,30

LM-SP: linfocitos y monocitos de sangre periférica.

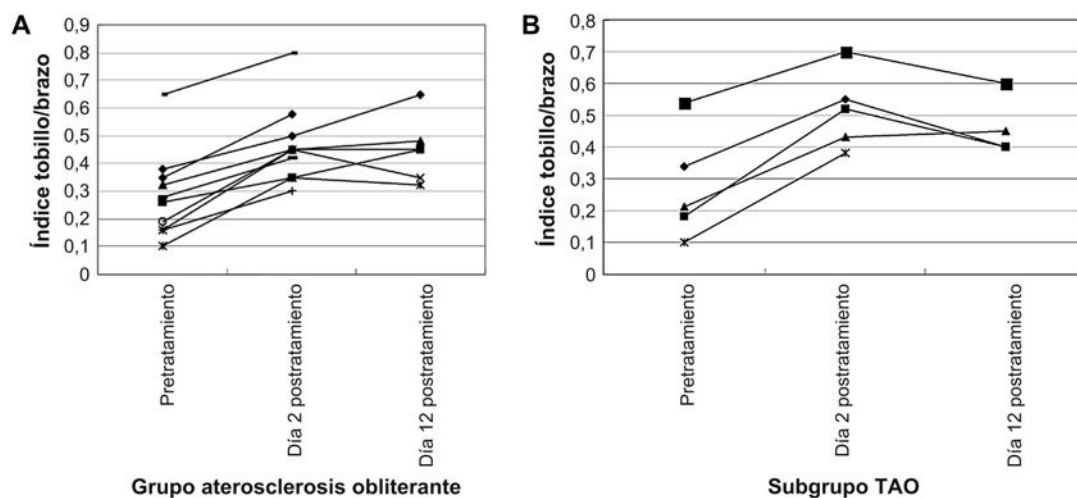
sugirió de forma preliminar que las células CD34⁺ de la médula ósea pueden potenciar la formación de angiogenesis.

Sin embargo, las células CD34⁺ suponen el 2-3% de linfocitos/monocitos en médula ósea. Recientemente, Asahara et al¹⁹ documentaron que el cocultivo de linfocitos/monocitos que contenían CD34⁺ y CD34⁻ deparó un mayor número de CPE que el cultivo exclusivo de células CD34⁺, lo que sugiere que la comunicación intercelular entre las células CD34⁺ y las restantes células CD34⁻ es

Tabla II. Comparación de las determinaciones antes y después del trasplante

Distancia deambulada (km)	ASO			TAO		
	Pre	2 meses	Un año	Pre	2 meses	Un año
Sin dolor	0,15 ± 0,14	0,57 ± 0,23*	0,65 ± 0,16*	0,21 ± 0,17	0,80 ± 0,28*	0,91 ± 0,31*
Máxima	0,74 ± 0,53	1,79 ± 0,69*	1,41 ± 0,43*	0,99 ± 0,52	2,30 ± 0,82*	2,40 ± 0,63*
TcO ₂ (mm Hg)	4,16 ± 1,89	18,68 ± 3,51*	23,17 ± 4,58*	4,15 ± 1,90	22,80 ± 4,76*	23,75 ± 5,56*
Escala de dolor	4,00 ± 2,40	0,20 ± 0,42*	0,33 ± 0,52*	4,40 ± 2,51	0,20 ± 0,45*	0,25 ± 0,50*

ASO: arteriosclerosis obliterante; TAO: tromboangiítis obliterante.

* $p < 0,05$ comparado con antes de la intervención.**Fig. 5.** Valores del índice tobillo/brazo de todos los pacientes antes y después de la inyección de células. TAO: tromboangiítis obliterante.

importante para la diferenciación de las CPE. En segundo lugar, la pureza y calidad de las CPE en una población cultivada son superiores a las de las células CD34⁺ recién aisladas porque originalmente estas células se describieron como el prototipo de antígeno expresado por células tanto madre hematopoyéticas como de linaje endotelial²⁰. Además, se ha descrito que las células madre están presentes incluso entre las CD34⁻²¹. Por esta razón, para la angiogénesis eficaz sería preferible la implantación de LM-MO que la de células CD34⁺ exclusivas.

En el presente estudio, se cultivaron LM-MO heterólogos aislados de ratón en MCDB131 con VEGF y, acto seguido, se trasplantaron localmente en la extremidad isquémica, lo que favoreció satisfactoriamente la angiogénesis en dichos tejidos. Los datos de la IPLD revelaron que la implantación de LM-MO produjo un aumento del flujo sanguíneo tisular. Los datos histológicos también mostraron un aumento del número de vasos colaterales causado por la implantación de LM-MO. Estos hallazgos proporcionan pruebas de que las CPE administradas

aumentan de forma natural la angiogénesis deteriorada en el modelo de isquemia en patas traseras de ratón.

Muchos estudios han demostrado que en la circulación periférica pueden detectarse CPE como consecuencia de un traumatismo o de estados patológicos. No obstante, estos estudios han demostrado que las células CD34⁺ tan sólo suponen el 0,002% de LM-SP y su expansión e inducción de colonias endoteliales *in vitro* son difíciles. Puede obtenerse una mayor movilización de CPE derivadas de MO usando diversas citocinas, incluido el G-CSF, de forma similar a la estrategia usada en la preparación de trasplantes de linfocitos/monocitos. Algunos estudios han demostrado que las CPE pueden aislarse de sangre periférica de seres humanos adultos y de conejos y que el G-CSF puede movilizar las células CD34⁺, las CD133⁺ y KDR⁺ en sangre periférica, con capacidad para diferenciarse en CPE que pueden incorporarse a los vasos neoformados^{22,23}. Por lo tanto, la movilización de G-CSF es una estrategia alternativa para obtener un elevado número de células progenitoras de sangre



Fig. 6. Angiografía de sustracción digital representativa de un paciente obtenida a los 6 meses de la intervención. En la extremidad isquémica se habían formado numerosos vasos colaterales.

periférica. Además, el G-CSF aumenta la diferenciación de las células progenitoras en CE, lo que da lugar al restablecimiento inmediato del flujo sanguíneo en los tejidos isquémicos²⁴. Sin embargo, la simple administración de este factor no habría afectado significativamente al proceso clínico en pacientes diabéticos²⁵.

Cuando la obstrucción vascular es extensa, en ocasiones no es viable una revascularización quirúrgica. Recientemente la angiogénesis terapéutica mediante un trasplante de células se ha convertido en un tratamiento eficaz de pacientes con isquemia de extremidades²⁶. Aunque el aislamiento de los L/M para la inducción y expansión de las CPE *in vitro* puede favorecer la formación de angiogénesis en

extremidades isquémicas utilizando 10-20 ml de médula ósea^{10,17,27}, este procedimiento se acompaña de algunas desventajas en la aplicación clínica. En primer lugar, la inducción y proliferación de LM-MO se producen *in vitro*, lo que introduce el riesgo potencial de contaminación y el posible efecto tumorigénico de usar citocinas²⁸. Además, este proceso tiene un coste elevado y requiere la inversión de mucho tiempo. En segundo lugar, es probable que durante el proceso se eliminen células y factores de crecimiento desconocidos que influyen positivamente en la angiogénesis. En el campo clínico, algunos investigadores²⁹ han aspirado grandes cantidades de médula ósea del ilion con anestesia general para trasplante. La aspiración de células de la médula ósea se asocia con algunos problemas, principalmente debidos a la anestesia general y a la anemia a causa de la obtención de unos 800 ml de sangre. El proceso de purificación también es complejo.

Sugerimos que la movilización de G-CFS más el trasplante de LM-SP en los músculos isquémicos es una estrategia terapéutica alternativa para la isquemia crítica de la extremidad. En primer lugar, las inyecciones de G-CFS movilizan los LM-SP en las extremidades isquémicas, dirigiendo directamente a las CPE al tejido isquémico donde pueden iniciar la angiogénesis. En segundo lugar, en los lugares de la inyección el elevado número de LM-SP trasplantados puede secretar *in vivo* diversos factores angiogénicos que activen las CPE en los tejidos isquémicos circundantes para formar nuevos vasos¹¹. Además, Kamihata et al³⁰ demostraron que el número de CE *in vitro*, diferenciadas a partir de LM-SP, fue aproximadamente 500 veces mayor que el de LM-MO. En tercer lugar, nuestro procedimiento no se asocia a riesgos y es de bajo coste en comparación con un trasplante autólogo de células de la médula ósea. Además, el tiempo necesario para este método sólo requiere unas 5 h, incluido el trasplante de células³¹.

Sin embargo, el número de células progenitoras de sangre periférica es reducido, de modo que optamos por estimular su producción con G-CSF, aumentando sus niveles en sangre periférica. Acto seguido, obtuvimos los LM-SP usando el dispositivo de aislamiento CS-3000Plus de células madre y los trasplantamos en los músculos de las extremidades isquémicas.

En este ensayo clínico los LM-SP se trasplantaron en 17 ocasiones en 15 pacientes. A los 2-10 días del trasplante, en todos los pacientes se detectaron diferentes grados de inflamación y aumentos de la temperatura cutánea de la extremidad; más tarde, estos pacientes refirieron un aumento de temperatura de

toda la extremidad, la resolución del dolor y en general la desaparición de la inflamación 2 semanas después de la cirugía. Consideramos que el edema de la extremidad se debió principalmente a una inflamación aséptica regional tras el trasplante de células, aunque no hubo una relación con la angiogénesis. Durante los 2 meses después del trasplante, el dolor de la extremidad inferior, la distancia deambulada y el ITB mejoraron en la mayor parte de pacientes; en 4 de 5 con úlceras del pie se demostró su curación; y la ASD efectuada después del trasplante en 6 pacientes demostró un aumento significativo de la circulación colateral. Estos resultados indican que el trasplante de LM-SP es una estrategia terapéutica eficaz y segura para la isquemia de la extremidad inferior.

Se ha descrito un caso de angina de pecho debida a la movilización de G-CSF³², y se sospechó que el mecanismo primario implicado era la oclusión arterial por un trombo. Hill et al³³ documentaron que en 12 pacientes con angina intratable la administración de G-CSF se asoció con dos casos de infarto agudo de miocardio y uno de muerte de origen cardíaco. La experiencia en el uso de este factor en pacientes con infarto de miocardio es limitada, pero, en otro estudio⁹, no se describieron efectos adversos graves de este tratamiento. En el presente estudio, un paciente manifestó dolor torácico y precordial y un aumento de la concentración de enzimas miocárdicas en el segundo día después de la movilización de MO. La movilización de G-CSF y el trasplante de células se terminaron y el paciente se restableció 3 días más tarde. Las propiedades trombogénicas de la sangre periférica son consecuencia de la mayor viscosidad debido a la movilización de G-CSF; sugerimos que durante la movilización de la médula ósea el recuento de leucocitos no supere $30,0 \times 10^3/\text{ml}$ y que se administre heparina de bajo peso molecular.

En el grupo del presente estudio los pacientes con tromboangéitis obliterante eran de menor edad y su grado de actividad mayor. Aunque los síntomas pueden mejorar significativamente mediante el trasplante de LM-SP, la necesidad de actividad nunca puede satisfacerse por completo; por lo tanto, debe considerarse un segundo trasplante. En general, recomendamos que se efectúe 6 meses a un año después del primero; en este estudio, dos pacientes se sometieron a un segundo trasplante. De acuerdo con los resultados del recuento de células antes del procedimiento, las células que trasplantamos podrían incrementarse hasta una cifra de 10^8 . No obstante, de acuerdo con el recuento de la flujocitometría, las células CD34⁺ sólo

representaron 10^6 , una cantidad más bien reducida. La insuficiencia de células trasplantadas podría generar cierta incertidumbre sobre su efecto terapéutico. Por esta razón, se suscita la necesidad urgente de estandarizar el tratamiento clínico: ¿cuál es la cantidad más apropiada de células en el trasplante? Si un trasplante no puede mejorar el síndrome de isquemia de la extremidad, ¿es útil efectuar un segundo intento? La respuesta a estas preguntas todavía no está clara. Por lo tanto, es esencial efectuar experimentos adicionales en muestras a mayor escala con períodos de seguimiento prolongados.

CONCLUSIÓN

En resumen, los hallazgos del presente estudio sugieren que el implante de L/M de médula ósea indujo una angiogénesis funcional en la pata trasera isquémica de ratón. El ensayo clínico demuestra que el trasplante de LM-SP basado en G-CSF es un tratamiento viable para el tratamiento de la isquemia de la extremidad inferior. A pesar del efecto adverso observado sobre la coronariopatía, los datos del presente estudio respaldan el uso de linfocitos-monocitos de sangre periférica para la angiogénesis terapéutica.

El presente proyecto estuvo financiado por la National Natural Science Fund (30300335).

BIBLIOGRAFÍA

1. Esato K, Hamano K, Li TS, et al. Neovascularization induced by autologous bone marrow cell implantation in peripheral arterial disease. *Cell Transplant* 2002;11:747-752.
2. Hamano K, Li TS, Kobayashi T, et al. The induction of angiogenesis by the implantation of autologous bone marrow cells: a novel and simple therapeutic method. *Surgery* 2001;130:44-54.
3. Unger EF, Goncalves L, Epstein SE, et al. Effects of a single intracoronary injection of basic fibroblast growth factor in stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 2000;85:1414-1419.
4. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-967.
5. Edelberg JM, Tang L, Hattori K, et al. Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. *Circ Res* 2002;90:E89.
6. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands and cytokines. *Circulation* 2001;104:1046-1052.
7. Rafii S, Avezilla S, Shmelkov S, et al. Angiogenic factors reconstitute hematopoiesis by recruiting stem cells from bone marrow microenvironment. *Ann NY Acad Sci* 2003;996:49-60.

8. Hill JM, Zalos G, Halcox JP. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003;348:593-600.
9. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomized clinical trial. *Lancet* 2004;363:751-756.
10. Zhang HK, Zhang N, Wang ZG, et al. Induction of CD34⁺ cells in vitro and application in endothelialization of prostheses. *J Zhejiang Univ (Med Sci)* 2004;33:63-66.
11. Iba O, Matsubara H, Nozawa Y, et al. Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation* 2002;106:2019-2025.
12. Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A, et al. Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. *Circ Res* 2002;90:966-973.
13. Wagatsuma A. Effect of aging on expression of angiogenesis-related factors in mouse skeletal muscle. *Exp Gerontol* 2006;41:49-54.
14. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, et al. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1-6.
15. Chung JW, Wong CH, Yang JC, et al. The construction of a pain intensity verbal rating scale in Chinese. *Acta Anaesthesiol Sin* 1999;37:65-71.
16. Kudo FA, Nishibe T, Nishibe M, et al. Autologous transplantation of peripheral blood endothelial progenitor cells (CD34⁺) for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. *Int Angiol* 2003;22:344-348.
17. Charles E, Mark H, Hans R, et al. Haematopoietic stem cells do not trans-differentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004;428:664-668.
18. Zhang HK, Zhang N, Wu LH, et al. Therapeutic neovascularization with autologous bone marrow CD34⁺ cells transplantation in hindlimb ischemia. *Chin J Surg* 2005;43:1275-1278.
19. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:965-967.
20. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3422-3427.
21. Ogawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34⁺ low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996;273:242-245.
22. Ivan-Loukianova E, Awad OA, Stepanovic V, et al. CD34⁺ blood cells accelerate vascularization and healing of diabetic mouse skin wounds. *J Vasc Res* 2003;40:368-377.
23. Szmitko PE, Fedak PW, Weisel RD, et al. Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart. *Circulation* 2003;107:3093-3100.
24. Minamino K, Adachi Y, Okigaki M, et al. Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), as well as granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), accelerates neovascularization. *Stem Cells* 2005;23:347-354.
25. De Lalla F, Pellizzer G, Strazzabosco M, et al. Randomized prospective controlled trial of recombinant granulocyte colony-stimulating factor as adjunctive therapy for limb-threatening diabetic foot infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1094-1098.
26. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, 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;360:427-435.
27. Zhang HK, Zheng SS, Wang ZG, et al. Experiment and study of endothelialization of prostheses with bone marrow CD34⁺ Cells. *Chin J Surg* 2004;42:1-4.
28. Li TS, Hamano K, Hirata K, et al. The safety and feasibility of the local implantation of autologous bone marrow cells for ischemic heart disease. *J Card Surg* 2003;18(Suppl. 2):S69-S75.
29. Higashi Y, Kimura M, Hara K, et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circulation* 2004;109:1215-1218.
30. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Improvement of collateral perfusion and regional function by implantation of peripheral blood mononuclear cells into ischemic hibernating myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1804-1810.
31. Kawamura A, Horie T, Tsuda I, et al. Clinical study of therapeutic angiogenesis by autologous peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation in 92 patients with critically ischemic limbs. *J Artif Organs* 2006;9:226-233.
32. Dorros G, Jaff MR, Dorros AM, et al. Tibioperoneal (outflow lesion) angioplasty can be used as primary treatment in 235 patients with critical limb ischemia: five-year follow-up. *Circulation* 2001;104:2057-2062.
33. Hill JM, Dick AJ, Raman VK, et al. Serial cardiac magnetic resonance imaging of injected mesenchymal stem cells. *Circulation* 2003;108:1009-1014.