

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Uso de células pluripotenciales en el tratamiento de la isquemia crítica

CÉSAR EDUARDO JIMÉNEZ¹, LEONARDO RANDIAL², IVÁN SILVA²

Palabras clave: células madre pluripotentes; trasplante de células madre; isquemia; extremidad inferior; enfermedad arterial periférica.

Resumen

La isquemia crítica de los miembros inferiores se define como la insuficiencia de flujo arterial a los miembros inferiores para mantener la viabilidad tisular, generalmente causada por enfermedad obstructiva arterial periférica. Las manifestaciones clínicas son dolor en reposo y presencia de úlceras o pérdida tisular espontánea.

El manejo con reperfusión quirúrgica (surgical revascularization) y terapia endovascular ha permitido lograr salvamentos importantes de extremidades pero, a pesar de estos avances, aproximadamente, entre el 20 y el 40 % de los pacientes con isquemia crítica no son candidatos a ninguno de estos tratamientos.

Se estima que anualmente se practican entre 120 y 500 amputaciones por cada millón de habitantes por enfermedad arterial; 25 % de los pacientes con

amputaciones mayores no recibe ningún tipo de rehabilitación. Por lo tanto, se necesita contar con nuevas estrategias para promover el salvamento de extremidades y disminuir las tasas tan altas de amputaciones.

En los últimos 20 años, el uso de células madre pluripotenciales ha demostrado ser un tratamiento efectivo y seguro para los pacientes con isquemia crítica con gran riesgo de pérdida de las extremidades.

Introducción

La isquemia crítica de los miembros inferiores se define como la insuficiencia de flujo arterial a los miembros inferiores para mantener la viabilidad tisular, generalmente causada por enfermedad obstructiva arterial periférica; las manifestaciones clínicas son el dolor en reposo y la presencia de úlceras o de pérdida tisular espontánea. La incidencia anual de isquemia crítica en el hemisferio occidental es, aproximadamente, de 220 casos por millón de habitantes. Con el incremento de la población y de su longevidad, el aumento del consumo de tabaco y de la diabetes, la isquemia crítica seguirá aumentando^{1,2}.

El manejo con reperfusión quirúrgica (*surgical revascularization*) y terapia endovascular ha demostrado lograr importantes salvamentos de extremidades pero, a pesar de estos avances, aproximadamente, entre el 20 y el 40 % de los pacientes con isquemia crítica no son candidatos a ninguno de estos tratamientos debido a la falta de venas ‘donadoras’ o de lechos distales receptores o a enfermedad arterial extensa que requieren amputaciones mayores².

1 Médico, cirujano vascular; jefe, Servicio de Cirugía Vascular, Hospital Universitario Clínica de San Rafael, Bogotá, D.C., Colombia

2 Médico, cirujano vascular, Hospital Universitario Clínica de San Rafael, Bogotá, D.C., Colombia

Fecha de recibido: 16 de mayo de 2017

Fecha de aprobación: 18 de mayo de 2017

Citar como: Jiménez CE, Randial LR, Silva I. Uso de células pluripotenciales en el tratamiento de la isquemia crítica. Rev Colomb Cir. 2017;32:146-51.

Se estima que anualmente se practican entre 120 y 500 amputaciones por enfermedad arterial por cada millón de habitantes; 25 % de los pacientes con amputaciones mayores no reciben ningún tipo de rehabilitación y requieren hospitalización crónica o asistencia profesional permanente; por consiguiente, el costo promedio del manejo de un paciente con una amputación es el doble del costo de salvar una extremidad; a los costos financieros se suman un costo emocional y uno social muy altos, lo cual hace que la calidad de vida de estos pacientes sea igual o peor que la de aquellos con cáncer terminal³⁻⁵.

Por lo tanto, se necesitan nuevas estrategias para promover el salvamento de extremidades y disminuir las tasas tan altas de amputaciones.

La angiogénesis mediada por células se inició hace más de una década, gracias a las observaciones hechas en células CD34, derivadas de sangre periférica y médula ósea que podían diferenciarse en células endoteliales, plenamente funcionales. Estas se denominaron células progenitoras endoteliales (*Endothelial Progenitor Cells*, EPC) y expresan los marcadores CD34, CD133 y KDR (*Kinase Insert Domain Receptor*) en su superficie; se ha demostrado que estas células participan en el desarrollo de nuevos vasos^{6,7}.

Células madre

El estudio de células madre ha abierto una nueva línea de tratamiento en medicina, conocida como medicina regenerativa o reparadora. Esta la lleva a cabo un grupo interdisciplinario de profesionales de la salud que adelantan investigaciones y desarrollan aplicaciones clínicas para las células pluripotenciales, con el objetivo de obtener procesos de reparación, reemplazo o regeneración de células, tejidos y órganos para restaurar una función deteriorada por cualquier causa, incluidos defectos congénitos, trauma o envejecimiento⁶⁻⁸.

Las células madre se han utilizado en diferentes protocolos para enfermedades crónicas o de difícil manejo, como la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, la diabetes, el lupus, la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la esclerosis lateral amiotrófica o enfermedad de Lou Gehrig, el trauma raquímedular, la enfermedad arterial periférica, la enfermedad coronaria, la seudoartrosis de rodilla, la isquemia cerebral, la tirosinemia (hepatopatías), la necrosis aseptica de cadera, la distrofia

de Duchenne, la osteogénesis imperfecta, la enfermedad discal crónica lumbar y las heridas crónicas⁷⁻⁹.

En 1981, se cultivaron por primera vez en el laboratorio células madre provenientes de ratón. En 1998, Gearhart y Thompson aislaron células madre del blastocisto humano, obtenidas de fetos humanos abortados; después las estimularon y obtuvieron diferentes líneas celulares. En el 2007, se obtuvieron células madre de piel humana^{8,9}.

Se definen las células madre como aquellas con la capacidad de diferenciarse en otros tipos celulares durante la vida embrionaria y adulta, o de autorreplicarse, pudiendo dividirse y transformarse ilimitadamente en otra célula madre o en una célula especializada^{10,11}. Según su origen, se dividen en células adultas y embrionarias.

Células adultas. Como su nombre lo indica, están presentes en la vida adulta, se encuentran en la médula ósea y en algunos tejidos especializados. Son las utilizadas para el manejo de la isquemia crítica. Se obtienen del mismo paciente y no plantean un dilema ético, ya que no provienen de otro organismo. Son células más viejas que pueden tener alteraciones cromosómicas, no son tan abundantes y son difíciles de cultivar en el laboratorio.

Células embrionarias. Son las células que están presentes en el blastocisto, entre el tercero y el quinto día después de la fertilización. Son más abundantes y tienen mayor capacidad de diferenciación que las adultas; pueden generar cualquier tipo de tejido, pero son más difíciles de diferenciar en el laboratorio; además, pueden generar autoinmunidad y plantean un dilema ético al ser células obtenidas de un ser vivo, en este caso, de un ser humano ya formado, por lo que la toma de sus células representaría la destrucción de este ser viviente.

Fuentes de células madre. Se toman de embriones obtenidos por fertilización *in vitro* o clonados por transferencia somática nuclear, de fetos abortados, cordones umbilicales, tejidos u órganos adultos (médula ósea, principalmente) y cadáveres hasta 20 horas después del fallecimiento^{12,13}.

Las acciones de las células madre son las siguientes:

1. Diferenciación en líneas celulares deterioradas.

2. Asentamiento en el tejido lesionado con producción de sustancias que estimulen el reclutamiento de otras células; este mecanismo es el más importante en la arteriogénesis, para el desarrollo de la circulación colateral.
3. Efecto antiinflamatorio.
4. Inhibición de la apoptosis.
5. Citoprotección y estimulación de células sanas presentes en la región lesionada (tejidos isquémicos o hipóxicos)¹⁴⁻¹⁶.

Mecanismos fisiológicos de compensación en isquemia crítica

Los dos mecanismos que estimulan la aparición de nuevos vasos ante una obstrucción arterial son la hipoxia y el *shear stress*, que se refiere al flujo turbulento y al aumento de la resistencia vascular ante una obstrucción. La hipoxia es un potente estímulo al generar la producción de sustancias proangiogénicas, como el VEGF1 (*Vascular Endothelial Growth Factor*) y otras sustancias que actúan como quimioatractantes para células madre y otras células involucradas en la formación de nuevos vasos¹⁷⁻²⁰.

Estos dos mecanismos estimulan la formación de nuevos vasos de dos formas: angiogénesis y arteriogénesis.

Angiogénesis

Es el proceso por medio del cual se obtiene una red capilar por la activación de células endoteliales de capilares ya preexistentes; está mediada por VEGF1, factores de crecimiento e hipoxia. Los capilares formados son muy pequeños (10-20 µm) que no son capaces de suprir las necesidades de una extremidad para que ejerza su actividad normal o para cerrar una herida, ya que la cicatrización es un proceso con gran demanda energética.

Arteriogénesis

Es un proceso mediado por cambios de la resistencia, mediante el estímulo del crecimiento de vasos colaterales ya preexistentes, aumentando hasta 20 veces su diámetro. Está mediado por la acumulación de linfocitos T, monocitos y granulocitos CD34+ y CD14+, que estimulan la liberación de sustancias como metaloproteinasas,

trombopoyetina, eritropoyetina y factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF), entre otras. Estas sustancias destruyen la periferia del vaso para que este pueda expandirse y crecer, aumentando su diámetro. El proceso dura entre cuatro y ocho semanas^{21,22}.

Objetivo de las células madre en la isquemia crítica

Consiste en imitar el proceso de arteriogénesis, potenciándolo al incrementar el número de células de la médula ósea que dan origen al proceso de arteriogénesis, tomándolas directamente de la fuente y extrayendo un concentrado rico en células promielocíticas CD34+ y CD14+. El objetivo es dejar un depósito celular rico en células promielocíticas en la extremidad isquémica para que actúe como una ‘fábrica de sustancias pro-arteriogénicas’ y potencie el mecanismo de arteriogénesis; este proceso fisiológico es deficitario en pacientes diabéticos, con insuficiencia renal, fumadores, con hiperlipidemia y ancianos, ya que en ellos el número de células madre promielocíticas es bajo²².

Obtención de células madre para tratamiento de la isquemia crítica

En los trabajos sobre enfermedades arteriales se han extraído las células madre de dos fuentes: sangre periférica y médula ósea; la primera tiene varios inconvenientes ya que necesita un banco de sangre completo con apoyo de un hematólogo, utilización de factores de crecimiento una semana antes para movilizar las células madre de la médula ósea a la sangre periférica y utilizar altos volúmenes de extracción de sangre periférica, lo que conlleva a anemia; además el porcentaje de células madre obtenidas por este método es bajo, comparada con el porcentaje extraído directamente de la médula ósea y, finalmente, es un proceso que toma más de una semana para que se obtenga un concentrado para inyectar²³.

Las células madre extraídas de la médula ósea por la técnica *SmartPrep®* de Terumo, es un proceso automatizado que requiere la extracción de un volumen de 120 a 240 ml de médula ósea. Se obtienen por aspirado medular que no requiere utilización de factores de crecimiento previos ni un banco de sangre, ya que la máquina realiza todo el proceso al utilizar un sistema de centrifugación especial, que dura 15 minutos y, luego de ello, proporciona un concentrado medular de 40 ml de volumen total, que

se inyecta en la extremidad isquémica, a 1 cm, paralelo al eje de las arterias principales.

Importancia de la isquemia crítica y nuevos tratamientos

El pronóstico de los pacientes con isquemia crítica a mediano plazo es muy malo, con alto riesgo de muerte durante el primer año del diagnóstico, por eventos cerebrovasculares o cardíacos; las técnicas endovasculares o quirúrgicas fallan o no se pueden realizar en el 30 % de los pacientes y conllevan morbilidad. No existe evidencia sólida para indicar medicamentos como la prostaglandina E1, en casos de isquemia crítica. Por lo tanto, se requiere contar con nuevas tecnologías para el manejo de estos enfermos.

Estudios clínicos de células madre en enfermedad arterial

Los primeros estudios con células madre se iniciaron con el descubrimiento de las células progenitoras endoteliales en ratones por Asahara, *et al.*, en 1997^{24,25}, de la línea monocito-macrófago y son idénticas a las que se activan en la isquemia arterial. Los trabajos con células madre en animales han sido muy difíciles de utilizar en personas ya que los resultados obtenidos no son equiparables, si se tiene en cuenta que la enfermedad arterial es un proceso crónico asociado a factores de riesgo que los animales no presentan y a que los fenómenos isquémicos en los animales se generan al ligar troncos arteriales principales, lo cual simula más una isquemia arterial aguda que un proceso crónico como es la claudicación de los miembros inferiores. Posteriormente, Asahara, *et al.*, en 2002, aislaron en sangre humana las células progenitoras endoteliales y las utilizaron para tratar pacientes con isquemia crítica, con buenos resultados. Huang, *et al.*, utilizaron las células madre por primera vez junto con factores de crecimiento y obtuvieron buenos resultados relacionados con el aumento de la distancia de marcha, mejoría en la cicatrización y dolor en reposo.

En 2002, se publicó en Japón el estudio TACT (*Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation*) por Tateishi y Yuyama, un estudio piloto abierto de 25 pacientes en el que se comparaban la seguridad y la eficacia de la aplicación de un concentrado medular de células madre frente a células madre derivadas de sangre periférica en pacientes con isquemia crítica y tromboangiitis obliterante

comparado contra un grupo placebo. Se logró mejoría del dolor y de la cicatrización de heridas, y aumento de la distancia de marcha; objetivamente, se observó aumento del índice brazo-tobillo y de la medición transcutánea de oxígeno (tCPO₂), siendo mejores los resultados de los pacientes tratados con concentrado medular que con sangre periférica; la tasa libre de amputación fue del 60 % para isquemia crítica y del 91 % para tromboangiitis obliterante a tres años; la necesidad de amputación alcanzó el 17 % en el grupo de concentrado medular y el 28,6 % en el grupo placebo^{26,27}.

Fadini, *et al.*, en el 2010, publicaron un metaanálisis de terapia de células madre para isquemia crítica; encontraron 108 estudios clínicos relevantes y la conclusión final fue que este tratamiento se recomienda para la isquemia crítica con base en la mejoría del dolor en reposo, la cicatrización y el aumento de distancia de marcha; además, no se observó ninguna diferencia en que se usaran o no factores de crecimiento, para obtener los mismos resultados, y demostró ser un procedimiento seguro²⁸.

Amman, *et al.*, en el 2002, publicaron el estudio BONMOT (*Bone Marrow Outcomes Trial 1*), con una tasa de salvamento de extremidades del 59 % a seis meses²⁹. En el 2012, en un metaanálisis chino³⁰, que utilizó bases de datos como PubMed, EBSCO y Cochrane, se encontraron más de 341 estudios relevantes relacionados con células madre y 7 estudios aleatorizados. La conclusión fue que la terapia con células madre disminuye la incidencia de amputación en pacientes con isquemia crítica, especialmente Rutherford 5, mejorando el dolor, la cicatrización y el aumento de la distancia de marcha²⁹⁻³¹.

En Latinoamérica, las principales fuentes de información sobre el uso de células madre son los estudios de Cuba, que reportan buenos resultados a corto plazo. En Colombia, García y Arismendi implantaron células madre tomadas de la médula ósea en cuatro pacientes con enfermedad arterial, previa estimulación con factores de crecimiento, y obtuvieron los siguientes resultados a corto plazo: en tres pacientes, se evidenció mejoría en la imagen angiográfica, del dolor y de la distancia de marcha. Concluyeron que es un tratamiento para pacientes con isquemia crítica en quienes no es posible la reperfusión quirúrgica³².

Use of stem cells in the treatment of critical ischemia

Abstract

Critical ischemia of the lower limbs is defined as insufficiency of arterial flow to the lower limbs to maintain tissue viability, usually caused by obstructive peripheral arterial disease. The clinical manifestations are pain at rest and presence of ulcers or spontaneous tissue loss. Management with surgical revascularization and endovascular therapy has shown high limb salvage, but in spite of these advances approximately 20% to 40% of patients with critical limb ischemia are not candidates for any of these therapies. It is estimated that between 120 and 500 amputations are done per year per million inhabitants per arterial disease; 25% of patients with major amputations do not receive rehabilitation. Therefore, we need new strategies to promote limb salvage and reduce such high amputation rates.

The use of stem cells over the last 20 years has proven to be an effective and safe treatment for patients with critical ischemia with a high risk of limb loss.

Key words: Pluripotent stem cells; stem cell transplantation; ischemia; lower extremity; peripheral arterial disease.

Referencias

1. Holger L, Bramlage P, Amann B. Treatment of peripheral arterial disease using stem and progenitor cell therapy. *J Vasc Surg.* 2011;53:445-53.
2. Lawall H, Bramlage P, Amann B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. A critical appraisal. *Thromb Haemost.* 2010;103:696-709.
3. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzer NR, Chair Ziv J, Haskal L, Norman R, et al. ACC/AHA 2005 practice guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic). *Circulation.* 2006;113:e463-654.
4. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kensuke N, Taguchi A, Chayama K, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation Res.* 1999;85:221-8.
5. Matoba S, Tatsumi T, Murohara T, Imaizumi T, Katsuda Y, Ito M, et al. Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia. *Am Heart J.* 2008;156:1010-8.
6. Aranguren XL, Verfaillie CM, Luttun A. Emerging hurdles in stem cell therapy for peripheral vascular disease. *J Mol Med.* 2009;87:3-16.
7. Meléndez M, Martiato M, Barrios S. Las células madre en la terapia celular, consideraciones éticas. *Rev Cubana Invest Biomed.* 2007;26:123-5.
8. Robert E. Stem cell tourism: The new “snake oil” of the 21st century. *Dedmon Asian Biomedicine.* 2009;3:339-42.
9. González-Sarasúa J, Pérez-López S, Álvarez-Viejo M, Pérez-Basterrechea M, Fernández-Rodríguez A, Ferrero-Gutiérrez A. Treatment of pressure ulcers with autologous bone marrow nuclear cells in patients with spinal cord injury. *J Spinal Cord Med.* 2011;34:56-7.
10. Amann B, Lüdemann C, Ratei R, Schmidt-Lucke JA. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for induction of arteriogenesis for limb salvage in critical limb ischaemia. *Zentralbl Chir.* 2009;134:298-304.
11. Tomanek RJ, Schatteman GC. Angiogenesis: New insights and therapeutic potential. *Anat Rec.* 2000;261:126-35.
12. Iafrati MD, Hallett JW, Geils G, Pearl G, Lumsden A, Peden E. Early results and lessons learned from a multicenter randomized, double-blind trial of bone marrow aspirate concentrate in critical limb ischemia. *J Vasc Surg.* 2011;54:1650-8.
13. The European TAO Study Group: Oral iloprost in the treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger’s disease): A double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1998;15:300-7.
14. Zijiang Y, Di Santo, Kalkac C. Current developments in the use of stem cell for therapeutic neovascularisation: Is the future therapy “cell-free”? *Swiss Med Wkly.* 2010;140:w13130.
15. Burt R, Pearce W, Luo K, Oyama Y, Davidson C, Beohar N, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for cardiac and peripheral vascular disease. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32:S29-31.
16. Losordo DW, Kibbe MR, Mendelsohn F, Marston M, Driver VR, Sharafuddin M, et al. A randomized controlled pilot study of autologous CD34+ cell therapy for critical limb ischemia. *Circ Cardiovasc Interv.* 2012;5:821-30.
17. Duong van Huyen JP, Smadja D, Bruneval P. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy induces distal angiogenesis after local injection in critical leg ischemia. *Mod Pathol.* 2008;21:837-46.

18. Akar R, Durdu S, Arat M, Tuncay N, Arslan O, Çorapçioğlu T, et al. Therapeutic angiogenesis by autologous transplantation of bone-marrow mononuclear cells for Buerger' patients with retractable limb ischaemia: A preliminary report. *Turk J Haematol.* 2004;21:13-21.
19. Miyamoto K, Nishigami K, Nagaya N, Akutsu K. Unblinded pilot study of autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with thromboangiitis obliterans. *Circulation.* 2006;114:2679-84.
20. Nehler MR, Brass EP, Anthony R, Dormandy J. Adjunctive parenteral therapy with lipo-epraprost, a prostaglandin E1 analog, in patients with critical limb ischemia undergoing distal revascularization does not improve 6-month outcomes. *J Vasc Surg.* 2007;45:953-61.
21. Schiavetta A, Maione C, Botti C, Marino G, Lillo S, Garrone A, et al. A phase II trial of autologous transplantation of bone marrow stem cells for critical limb ischemia: Results of the Naples and Pietra Ligure Evaluation of Stem Cells Study. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1:572-8.
22. Lee KB, Kang ES, Kim AK, Kim MH, Do YS, Park KB, et al. Stem cell therapy in patients with thromboangiitis obliterans: Assessment of the long-term clinical outcome and analysis of the prognostic factors. *Int J Stem Cells.* 2011;4:88-98.
23. Amann B, Luedemann C, Ratei R, Schmidt-Lucke JA. Autologous bone marrow cell transplantation increases leg perfusion and reduces amputations in patients with advanced critical limb ischemia due to peripheral artery disease. *Cell Transplant.* 2009;18:371-80.
24. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275:964-7.
25. Idei N, Soga J, Hata T, Fujii Y, Fujimura N, Mikami S, et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation reduces long-term major amputation risk in patients with critical limb ischemia: A comparison of atherosclerotic peripheral arterial disease and Buerger disease. *Circ Cardiovasc Interv.* 2011;4:15-25.
26. 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;360:427-35.
27. Kim DI, Kim MJ, Joh JH, Shin SW, Do YS, Moon JY, et al. Angiogenesis facilitated by autologous whole bone marrow stem cell transplantation for Buerger's disease. *Stem Cells.* 2006;24:1194-200.
28. Fadini GP, Agostini C, Avogaro A. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature. *Atherosclerosis.* 2010;209:10-7.
29. Amann B, Lüdemann C, Rückert R, Lawall H, Liesenfeld B, Schneider M, et al. Design and rationale of a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study for autologous bone marrow cell transplantation in critical limb ischemia: The Bone Marrow Outcomes Trial in Critical Limb Ischemia (BONMOT-CLI). *Vasa.* 2008;37:319-25.
30. Liu FP, Dong JJ, Sun SJ, Gao WY, Zhang ZW, Zhou XJ, et al. Autologous bone marrow stem cell transplantation in critical limb ischemia: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Chin Med J (Engl).* 2012;125:4296-300.
31. Brass D, Anthony R, Dormandy J. Parenteral therapy with lipo-epraprost, a lipid-based formulation of a PGE1 analog, does not alter six-month outcomes in patients with critical leg ischemia. *J Vasc Surg.* 2006;43:752-9.
32. García MG, Arismendi I. Transplante de células madre autólogas en pacientes con isquemia crítica no revascularizable. *Rev Colomb Cir Vasc.* 2007;7:12-6.

Correspondencia: César Jiménez, MD
 Correo electrónico: cesarejmd@yahoo.com
 Bogotá, D.C., Colombia