

ARTÍCULO ORIGINAL

Células madre pluripotenciales en el tratamiento de la isquemia de miembros inferiores. Primer caso en Paraguay y nuestra experiencia en el Hospital de Clínicas de la Universidad Nacional de Asunción

Stem cells in the treatment of lower limb ischemia. First case in Paraguay and our experience in the Hospital of the National University of Asunción

Flores J¹, Cazal N², Recalde L², Ferreira J³, Corbeta R¹

¹ Primera Cátedra y Servicio de Clínica Quirúrgica. ² Hemocentro del Hospital de Clínicas. ³ Departamento de Hematología. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Asunción.

RESUMEN

Existe un grupo de pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores, en los cuales no es posible restablecer una adecuada perfusión sanguínea por métodos quirúrgicos o endovasculares y presentan una posibilidad elevada de amputación. En las últimas décadas se han identificado en la médula ósea la existencia de células madre del grupo CD34+, que proliferan ante la presencia de isquemia tisular y migran a través del torrente circulatorio hacia estas zonas, dando origen a arteriolas capilares y vénulas. Este mecanismo suele verse dificultado *in vivo* por la oclusión de las arterias que irrigan la región afectada. En este trabajo presentamos los resultados de nuestra experiencia en dos pacientes, que fueron sometidos a la extracción mecánica de tejido de su médula ósea, que posteriormente fue filtrado e implantado a lo largo de sus miembros inferiores isquémicos, con el objeto de estimular la neoformación de vasos sanguíneos para aumentar la perfusión de sangre a estas zonas, cicatrizando sus heridas, evitando de esta manera su amputación.

Palabras clave: Isquemia crítica, revascularización arterial, células madre.

Autor correspondiente: Prof. Dr. Jorge Flores, PhD. Profesor de la I Cátedra y Servicio de Clínica Quirúrgica. Avda. Mariscal López y Cruzada de la Amistad, Campus Universitario de la UNA. San Lorenzo – Paraguay. Correo electrónico: jf.gekkai@gmail.com

Fecha de recepción el 26 de marzo del 2015; aceptado el 28 de agosto del 2015

ABSTRACT

There is a group of patients with critical limb ischemia, whom are not adequate for surgical or endovascular revascularization. They present a high risk of amputation. In last decades, it has been identified a group of bone marrow CD34+ stem cells, that proliferate in case of tissue ischemia, migrate through the circulation to the ischemic tissue and originate new vessels. This event is complicated *in vivo* by the occlusion of arteries of the affected region. In this paper, we present our experience in two patients, who underwent harvesting of their bone marrow tissue, which has been strained and then sowed in the ischemic lower limb to develop new blood vessels, thus improving blood flow to this area and wound healing, avoiding lower limb amputation.

Key Words: Critical ischemia, arterial revascularization, stems cells.

INTRODUCCION

La isquemia crítica de miembros inferiores (ICMI) constituye el estadio final de la enfermedad arterial periférica y sus manifestaciones más comunes son el dolor de reposo, junto al desarrollo de úlceras y/o la gangrena de los tejidos debido a la pobre irrigación sanguínea por la oclusión de los vasos que los irrigan (1). Para evitar la amputación del mismo, es necesario restablecer la perfusión sanguínea por medio de una cirugía de bypass arterial o por técnicas endovasculares de angioplastia. En este grupo de pacientes, existe un 40% de los mismos, que no son candidatos a este tipo de procedimientos por presentar un lecho vascular desfavorable o un elevado riesgo por su precaria condición clínica (2). Hasta hace algunos años, el destino irrevocable de los mismos era la amputación del miembro afectado, sumado a un índice de mortalidad del 20% por año (3), por el hecho de tratarse de pacientes panvasculares; presentándose así, la necesidad de buscar nuevas estrategias para preservar la viabilidad de la extremidad isquémica, ofreciendo un tratamiento de revascularización efectivo.

En el año 1997 Asahara y colaboradores identificaron en la circulación sanguínea, un conjunto de células progenitoras endoteliales, del grupo de las células madre pluripotenciales (CMP), provenientes de la médula ósea, que contribuyen a la angiogénesis en tejidos isquémicos (4). Desde entonces numerosos estudios han reportado la capacidad de las células madre, implantadas localmente en tejidos lesionados, de reducir los daños ocasionados por la falta de una adecuada perfusión y promover su cicatrización (5, 6, 7, 8). El objetivo de este trabajo es presentar el primer caso en Paraguay de tratamiento de un paciente con isquemia crítica de un miembro inferior por medio del trasplante autólogo de CMP, provenientes de su médula ósea. En el mismo, se había descartado la posibilidad de realizar un procedimiento quirúrgico de reperfusión de su miembro afectado. Así mismo, es presentada nuestra experiencia en el Hospital de Clínicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNA, en una paciente con características similares al paciente anteriormente citado.

Presentación de casos

Caso I: Paciente de sexo masculino de 69 años de edad, derivado al servicio de cirugía vascular de un centro médico privado, con antecedentes de infarto agudo del miocardio, hipertenso, diabético insulino dependiente, con historia de 8 meses de evolución de úlcera en el segundo dedo del pie derecho, que fue aumentando de superficie paulatinamente y que al momento del examen abarcaba toda la cara plantar de aquel (Figura 1).

Una ecografía Doppler color practicada a este miembro reveló la oclusión de las arterias tibial anterior, tibial posterior, peronea, dorsal pedia, plantar interna y plantar externa; permaneciendo permeables las arterias femoral común, femoral profunda, femoral superficial y poplítea, constatándose escasa circulación calateral a partir de ramas arteriales geniculares aún permeables, que se originaban de la arteria poplítea, en el hueco popliteo. Con esto se concluyó la imposibilidad de practicar una cirugía de bypass arterial debido a la ausencia de alguna rama arterial permeable apropiada para practicar una anastomosis por debajo del nivel de la rodilla. Ante esta situación se planteó la alternativa de realizar en el mismo, un trasplante autólogo de CMP provenientes de su médula ósea. Una vez decidido el procedimiento y luego de sus estudios clínicos correspondientes, el paciente fue llevado al quirófano, en donde bajo anestesia raquídea, se posicionó al mismo en decúbito ventral y fueron punzadas ambas crestas ilíacas con un trócar, extrayéndose 240 centímetros cúbicos (cc) de médula ósea, filtrándose el material obtenido para separar el fluido de los restos de espículas óseas y tejido celular subcutáneo. Posteriormente, se lo posicionó en decúbito dorsal y el fluido obtenido fue inyectado en los planos musculares del miembro inferior derecho del paciente, por medio de una aguja hipodérmica tipo Tuohy de 16 Gauge (G), desde el tercio inferior del muslo, en donde aún persistía una irrigación sanguínea adecuada y a lo largo de la zona isquémica en la pierna y el pie, incluyendo la periferia de la úlcera. El miembro fue cubierto con apósitos y el paciente trasladado a su habitación, siendo dado de alta en el segundo día postoperatorio. El paciente fue sometido a curaciones diarias de sus heridas y evaluado por consultorio externo en forma semanal durante el primer mes y luego en forma mensual. La úlcera en cuestión presentó una buena evolución y cicatrizo por completo en el sexto mes postoperatorio (**Figura 2**). Desde la implantación de las células madre, el paciente no volvió a ser hospitalizado por ninguna causa relacionada con lesiones isquémicas de su miembro inferior derecho y sus niveles de glicemia no presentaron mayores cambios en relación a aquellos previos a su procedimiento.



Figura 1.



Figura 2.

Caso II: Paciente de sexo femenino de 68 años, hipertensa y diabética insulino dependiente, con antecedentes de amputación por gangrena del miembro inferior izquierdo, realizada un año antes en otro servicio. Seis meses atrás, desarrolló gangrena y posterior amputación del primer dedo del pie derecho. Ante este cuadro, fue sometida a una cirugía de revascularización arterial de esta extremidad por medio de un byppas femoro-popliteo con una prótesis anillada de expandex politetrafluoroetileno.

Un mes antes, había presentado dolor de reposo, que remitía al sentarse y colgar su extremidad inferior derecha, motivo por el cual adoptaba de manera permanente esta posición; además presentó gangrena del tercer dedo del pie derecho, junto a una úlcera necrótica infectada que abarcaba todo el tercio distal de la planta de este pie. Fue intervenida, amputándose el dedo gangrenado y desbridando la lesión plantar necrótica (**Figura 3**). Una arteriografía del miembro afectado, reveló que a nivel del muslo, la arteria femoral superficial se encontraba ocluida y la prótesis de su bypass presentaba trombosis parietal y estenosis suboclusiva de su luz, con un flujo de sangre filiforme en su mitad distal (**Figura 4a**). Se observó además, oclusión de las arterias peronea, tibial posterior, junto a sus ramas terminales plantar interna y plantar externa, además del tercio distal de la arteria tibial anterior y su rama terminal, la arteria dorsal pedia (**Figura 4b**). Ante este cuadro, se planteó la necesidad de un nuevo procedimiento de revascularización arterial para evitar una eventual amputación por isquemia crítica del miembro. Sin embargo, ya no quedaban arterias adecuadas permeables tanto en la pierna, como en el pie derecho de esta paciente, en las cuales se podría realizar una anastomosis distal en un eventual bypass femoro-distal. En esta situación, se concibió la posibilidad de realizar un trasplante autólogo de CMP para estimular y desarrollar la neoformación de vasos sanguíneos y restablecer una perfusión adecuada del miembro isquémico.



Figura 3.



Figura 4a.



Figura 4b.

Luego de los estudios y evaluaciones preoperatorias, la paciente fue llevada al quirófano y bajo anestesia raquídea, ambas crestas ilíacas fueron punzadas y se aspiró 240 cc de médula ósea. El fluido obtenido fue sometido a una variante de la técnica anterior, realizándose una centrifugación del mismo para separar y extraer de este, espículas de hueso y tejido celular subcutáneo. Luego fue inyectado en la masa muscular del miembro isquémico por medio de una aguja Tuohy de 16 G, desde la raíz del muslo hasta el pie. Se cubrieron las heridas con apósitos y la paciente fue trasladada a su habitación, siendo dada de alta en buenas condiciones en su segundo día postoperatorio. Actualmente, tres meses luego del procedimiento, el miembro intervenido se encuentra viable, con temperatura conservada y buena coloración. El dolor de reposo que presentaba ha remitido en su totalidad, permitiendo a la paciente adoptar el decúbito. El muñón de amputación del tercer dedo ha cicatrizado y el lecho de la úlcera en la planta del pie se encuentra seco y presenta buena granulación en sus márgenes (**Figura 5**).



Figura 5.

DISCUSIÓN

La alternativa terapéutica de elección a aplicar en pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores que no fueran candidatos a revascularización quirúrgica convencional o por medios endovasculares, hasta hace pocos años consistía en analgésicos y vasodilatadores arteriales; evolucionando la mayoría de ellos hacia la amputación en un corto período de tiempo. Estudios recientes han demostrado que los tejidos isquémicos liberan factores bioquímicos, que activan la proliferación de colonias de CMP en la médula ósea, estimulando posteriormente la migración de estas hacia las zonas isquémicas, a través de las arterias que las irrigan; circunscribiéndose la función de estas células en las regiones afectadas, a la neoformación de arteriolas capilares y vénulas, acelerando además la cicatrización de las heridas por medio de la modulación del entorno inflamatorio, promoviendo el desarrollo de una matriz de granulación, estimulando la migración de queratocitos e inhibiendo la muerte por apoptosis de las células del tejido de cicatrización. Numerosos estudios in vivo, han aportado evidencias de que los componentes biológicamente activos secretados por las CMP, juegan un importante rol en su potencial terapéutico (8,9,10), demostrando de esta manera la existencia de dos vías de reparación del tejido isquémico; por un lado, la neovascularización y por el otro, la creación de un entorno tisular adecuado para el crecimiento del tejido de granulación.

Se denomina angiogénesis al desarrollo de nuevos vasos sanguíneos y este evento es mediado por un complejo proceso que incluye una serie de acontecimientos celulares que culminan con el desarrollo de arteriolas, capilares y vénulas en un tejido determinado. Primero, estímulos como la isquemia tisular fomentan la proliferación de las CMP, especialmente las del grupo CD34+ (11,12), progenitoras de diferentes linajes celulares que darán origen a nuevos vasos sanguíneos; al mismo tiempo, aumentan la capacidad de extravasación del endotelio de aquellos vasos aún permeables en la región afectada. Segundo, se produce la proteólisis de los componentes de la membrana basal de la zona afectada para promover la invasión de células endoteliales al estroma del tejido circundante, para lo que son requeridas la actividad cooperativa de mediadores químicos como el *activador del plasminógeno*, junto a *metaloproteinasas de la matriz*. Tercero, las células endoteliales migran y se disponen de tal manera que dan origen a la luz de nuevos vasos, formando el andamiaje en el que se van asentando diferentes tipos celulares, constituyendo así una estructura multicelular, que conformará un nuevo canal capilar. Finalmente, estos capilares son estabilizados mediante el desarrollo de una nueva membrana basal, juntas de adherencia y la migración de más células endoteliales (7).

La vasculogénesis de los tejidos es rápida en aquellos pacientes que mantienen una buena perfusión tisular, cuando todas o la mayoría de las arterias que irrigan la zona afectada se encuentran permeables, debido a que las CMP pueden migrar, en caso de ser estimuladas, sin mayores dificultades desde la médula ósea hasta los tejidos a ser reparados. Sin embargo, en pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores, la migración de CMP se ve dificultada por la oclusión de la mayoría de las arterias que perfunden la región. De esta manera y una vez demostrada por métodos auxiliares de diagnóstico, como angiografía o ecografía Doppler color, la existencia de una condición isquémica crítica en un determinado miembro, las células progenitoras pueden ser extraídas por medios mecánicos de su lecho natural, en la médula ósea, separadas por filtración o centrifugación de otras estructuras tisulares e implantadas en el tejido isquémico con el objeto de que al proliferar y desarrollarse aumenten la perfusión sanguínea del mismo (12,13,14)

La aplicación de CMP a pacientes con ICMI es generalmente acompañada por la remisión del dolor isquémico en un corto período de tiempo, debido probablemente a que este síntoma es ocasionado por la liberación de metabolitos del metabolismo anaeróbico hacia los músculos del miembro afectado y una vez que se hayan formado nuevos vasos sanguíneos, el flujo de sangre aumenta, al igual que la nutrición y oxigenación de los tejidos, remitiendo así la isquemia y sus manifestaciones. Las citoquinas liberadas en el lecho tisular isquémico por las CMP son las principales moléculas en el proceso de cicatrización del mismo (6,15). La desaparición del dolor, es seguida en la mayoría de los casos por la cicatrización de las lesiones isquémicas, como es el caso de los dos pacientes presentados en esta casuística.

En la actualidad reservamos la indicación del procedimiento de trasplante de CMP en miembros inferiores para aquellos pacientes con enfermedad isquémica terminal, en la que el miembro es aún viable y se haya comprobado objetivamente la imposibilidad de aplicar otras alternativas de revascularización arterial. En conclusión, esta opción terapéutica, según los criterios mencionados, ha demostrado resultados satisfactorios en los dos pacientes de nuestra serie, con remisión total del dolor y granulación de sus heridas, evitándose de esta manera la amputación del miembro afectado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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(7):572-578.
2. Zankhana R, Losordo DW. Cell therapy of peripheral arterial disease. *Circ Res* 2013; 112(9): 1288-1302.
3. Suzuki H, Iso Y. Clinical application of vascular regenerative therapy for peripheral artery disease. *Bio med Res Int.* 2013;2013:179730.
4. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964 – 967.
5. Kerwin KB, Pearl GJ, Molina CD, Coker PJ, Pineiro LA, Urschel HC Jr, et al. Avoidance of lower-limb amputation by surgical implantation of autologous stem cells. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2013;26(3): 285-287.
6. Gupta PK, Chullikana A, Parakh R, Desai S, Das A, Gottipamula S, et al. A double blind randomized placebo controlled phase I/II study assessing the safety and efficacy of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cell in critical limb ischemia. *J Transl Med.* 2013;11:143.
7. Yoo SY, Kwon SM. Angiogenesis and its therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm* 2013;2013:127170.
8. Altaner C, Altanerova V, Cihova M, Hunakova L, Kaiserova K, Klepanec A, et al. Characterization of mesenchymal stem cells of no-options patients with critical limb ischemia treated by autologous bone marrow mononuclear cells. *PLoS One.* 2013 Sep 12;8(9):e73722.
9. Wang ZX, Li D, Cao JX, Liu YS, Wang M, Zhang XY, et al. Efficacy of autologous bone marrow mononuclear cell therapy in patients with peripheral arterial disease. *J Atheroscler Tromb* 2014; 21: 1183 – 1196.
10. Karakoyun R, Koksoy C, Yilmaz T, Altun H, Banli O, Albayrak A, et al. The angiogenic effects of ischemic conditioning in experimental critical limb ischemia. *Eu J Vasc Endovasc Sug* 2014; 47: 172-179.
11. Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 427- 435.
12. Fujita Y, Kinoshita M, Furukawa Y, Nagano T, Hashimoto H, Hiramami Y, et al. Phase II clinical trial of CD 34+ cell therapy to explore endpoint selection and timing in patients with critical limb ischemia. *Circ J* 2014; 78: 490 – 501.

13. Shimamura M, Nakagami H, Koriyama H, Morishita R. Gene therapy and cell-based therapies for therapeutic angiogenesis in peripheral artery disease. *Biomed Res Int* 2013; 2013:186215.
14. Higashi Y, Kimura M, Hara K, Noma K, Jitsuiki D, Nakagawa K, et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilatation in patients with limb ischemia. *Circulation* 2004; 109: 1215 – 1218.
15. Kudo F, Nishibe T, Nishibe M, Yasuda K. Autologous transplantation of peripheral blood endothelial progenitor cells (CD 34+) for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. *Int Angiol* 2003; 22: 344 – 348.