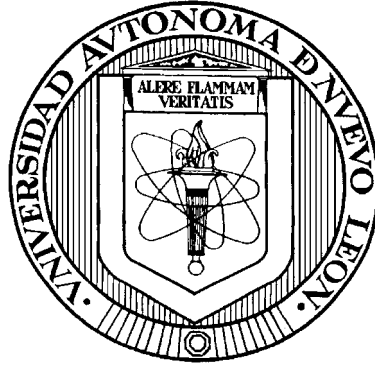


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**TRASPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS DE
MÉDULA ÓSEA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ISQUEMIA
CRÍTICA EN LA INSUFICIENCIA ARTERIAL PERIFÉRICA
EN EL PACIENTE DIABÉTICO.**

Por

GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN MEDICINA**

Marzo, 2008

**TRASPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS DE
MÉDULA ÓSEA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ISQUEMIA
CRÍTICA EN LA INSUFICIENCIA ARTERIAL PERIFÉRICA
EN EL PACIENTE DIABÉTICO.**

Aprobación de la Tesis:

Dr. med. Santos Guzmán López
Director de Tesis

Dr. David Gómez Almaguer
Codirector de Tesis

Dr. med. José Carlos Jaime Pérez
Codirector de Tesis

Dr. med. Sandra Nora González Díaz
Miembro de Comisión

Dr. med. Norberto López Serna
Miembro de Comisión

Dr. Dionicio Ángel Galarza Delgado
Subdirector de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi mas sincero agradecimiento a mis asesores de tesis el Dr. Santos Guzmán López y al Dr. David Gómez Almaguer que gracias a su asesoría se llevo acabo esta tesis. También me gustaría agradecer al Dr. med. José Carlos Jaime Pérez, Dr. Rogelio Salinas Domínguez, al Dr. Jesús Zacarías Villarreal Pérez, Dr. Mario Campos Coy que contribuyeron con sus aportaciones y así poder presentar un trabajo con mejor perspectiva de investigación y que sirva como una aportación a la investigación de nuestra Institución.

Al Director del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” el Dr Donato Saldívar Rodríguez por su apoyo incondicional en la elaboración de este trabajo. A mis colaboradores: Dr. Martín J. Álvarez Ovalle, Dr. Alfredo B. Cuellar Barbosa, Dra. Mariajesús Treviño Garza, Dr. Guillermo Ruiz Delgado, Dra. Luz del Carmen Tarin Arzago, Dr. Eduardo Vázquez Garza, Dra. Brenda E. Salinas Balboa, Dr. Jorge Manjarrez García, Dr. Jamyl Habib Castillo, Servicio de Cirugía General que su ayuda fue indispensable para este proyecto.

A mi familia y en especial a mi esposa Laura, a mis hijos Laura Berenice y Gerardo Raymundo como a todas las personas que con su apoyo me ayudaron a concretar este trabajo de investigación.

A mis Padres Juan Muñoz Ortega y Bertha Maldonado de Muñoz, Hermanos Bertha y Juan que para mi siempre fueron y serán ejemplo de perseverancia y trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

| Capítulo | Página |
|-------------------------------------|--------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Generalidades..... | 1 |
| 1.2. Antecedentes | 2 |
| 1.3. Importancia | 11 |
| 1.4. Originalidad..... | 11 |
| 1.5. Justificación | 11 |
| 2. HIPÓTESIS..... | 14 |
| 3. OBJETIVOS | 15 |
| 3.1. Objetivo General..... | 15 |
| 3.2. Objetivos Particulares | 15 |
| 4. MATERIAL Y METODOS..... | 17 |
| 4.1. Recursos Biológicos | 17 |
| 4.2. Materiales | 18 |
| 4.3. Instalaciones | 18 |
| 4.4. Métodos de Estudio | 19 |
| 4.5. Procedimiento Quirúrgico | 19 |
| 5. RECURSOS METODOLÓGICOS..... | 22 |

| | |
|---|----|
| 5.1. Diseño del Estudio | 22 |
| 5.2. Criterios de Inclusión: | 22 |
| 5.3. Criterios de Exclusión: | 23 |
| 5.4. Criterios de Éxito..... | 23 |
| 5.5. Criterios de Fracaso..... | 23 |
| 5.6. Criterios de Eliminacion | 24 |
| | |
| 6. MUESTREO / EVALUACIONES..... | 25 |
| | |
| 7. RESULTADOS..... | 27 |
| | |
| 8. DISCUSIÓN | 30 |
| | |
| 9. CONCLUSIONES | 34 |
| | |
| BIBLIOGRAFIA..... | 37 |
| | |
| APENDICES | 41 |
| | |
| APÉNDICE A.- HISTORIA CLÍNICA | 42 |
| APÉNDICE B.- MEDICIÓN DE OXIMETRÍA TRANSCUTÁNEA | 45 |
| APÉNDICE C.- CONSENTIMIENTO INFORMADO | 47 |
| APÉNDICE D.- HOJA DE CAPTURA DE DATOS. GRUPO I..... | 51 |
| APÉNDICE E.- HOJA DE CAPTURA DE DATOS. GRUPO II..... | 53 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página |
|---|---------------|
| I Tabla Comparativa General..... | 55 |
| II Clasificación Funcional de Leriche y Fontaine | 56 |
| III Clasificación de la Neoformación Vascular en la Angiorresonancia Pre y Postrasplante | 57 |
| IV Tabla Comparativa de Oximetría Trascutánea Grupo I | 58 |
| V Tabla Comparativa de Oximetría Trascutánea Grupo II | 59 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|---------------|
| 1. Procedimiento Quirúrgico Trasplante de CPE..... | 60 |
| 2. Medición de Oximetría Trascutánea..... | 61 |
| 3. Medidor de Oxígeno Trascutáneo Multicanal Modelo TCM-400 Marca Radiometer..... | 62 |
| 4. Material para Punción y Recolección de Médula Ósea..... | 63 |
| 5. Punción Sacra y Recolección de Médula Ósea..... | 64 |
| 6. Procedimiento de Centrifugación. Centrifuga Sigma EK15® | 65 |
| 7. Material para la Extracción de la Capa de Células Madre Posterior a la Centrifugación | 66 |
| 8. Delimitación de Área en Pantorrilla para la Inyección de Células Madre | 67 |
| 9. Angiorresonancia Magnética Pretrasplante y Postrasplante | 68 |
| 10. Amputación Transmetatarsiana..... | 69 |
| 11. Evolución de la Herida Posterior a un Mes de la Amputación | 70 |
| 12. Evolución de Herida Posterior a 2 Semanas del Trasplante | 71 |
| 13. Evolución de Herida Posterior a 7 Semanas del Trasplante | 72 |
| 14. Evolución de la Herida Posterior a 15 Semanas del Trasplante | 73 |

NOMENCLATURA

| | |
|--------|--|
| cc | Centrímetros Cúbicos |
| CPE | Células Progenitoras Endoteliales |
| DM | Diabetes Mellitus |
| G-CSR | Granulocyte - Colony Stimulating Factor |
| HES | Hydroxietilstarch |
| HLA | Human Leukocyte Antigen |
| MHz | Mega Hertz |
| ml | Mililitros |
| mm | Milímetros |
| mm Hg | Milímetros de Mercurio |
| ® | Marca Registrada |
| rpm | Revoluciones por Minuto |
| UANL | Universidad Autónoma de Nuevo León |
| VEGFR2 | Vascular Endothelial Cell Growth Factor Receptor |

CAPITULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

La enfermedad vascular periférica es una entidad muy frecuente en nuestro medio que se presenta principalmente en pacientes con diabetes mellitus (DM). El tratamiento quirúrgico de esta presenta una mortalidad de 1.9 a 15%, con mejoría limitada. El tratamiento médico sólo brinda mejoría parcial y temporal. Múltiples reportes indican que las células progenitoras endoteliales (CPE) pueden diferenciarse a diversas líneas celulares, se reproducen sin perder esa capacidad y participan en la neoangiogénesis. Estas células se encuentran en la médula ósea y la sangre circulante. Este estudio propone el trasplante autólogo de CPE obtenida de la médula ósea para el tratamiento de

la enfermedad vascular periférica avanzada en el paciente con DM a través de la estimulación de la neoangiogénesis. En este protocolo se estudiaron 20 pacientes, al grupo I (n= 5) se le suministró tratamiento médico e infiltración con plasma autólogo sin células madre, al grupo II (n=15) se le transplantaron CPE por vía intramuscular en el miembro inferior afectado, con el fin de distinguir si la neoangiogénesis se lleva a cabo por la diferenciación de las CPE o por un proceso inflamatorio local inducido por los elementos transplantados.

1.2. Antecedentes

La DM es una enfermedad crónica y heterogénea caracterizada por valores altos en la glucosa plasmática (2 tomas en sangre arriba de 126 mg/dl, tras 12 horas de ayuno) de múltiples presentaciones clínicas. De acuerdo a su etiología se divide en 4 grupos: 1. Diabetes mellitus tipo 1 (insulinodependiente), 2. Diabetes mellitus tipo 2 (no-insulinodependiente), 3. Diabetes gestacional y 4. Etiologías múltiples. La DM tipo 2 (DM2) prevalece en el 90% de los casos¹. En EUA existen 16.7 millones de diabéticos que consumen el 15% de presupuesto para salud, aproximadamente 100 billones de dólares al año². En México 10.9% de la población ha sido diagnosticada con DM2 y se registran 300,000 nuevos casos por año aproximadamente; la población con una tasa de afección mayor (1200/100,000) es la del grupo de edad de 45-65 años³ y el gasto anual del sector salud para el tratamiento de la misma y sus complicaciones, era en el 2005 de más de 300 millones de

dólares, con un aumento en gastos del 26% desde 2003⁴. La larga evolución de la DM resulta en complicaciones que afectan el entorno laboral, social y familiar del paciente; las complicaciones que representan mayor morbi/mortalidad en el paciente con DM son: aumento en el riesgo de infarto al miocardio, ceguera, insuficiencia renal, neuropatía periférica y enfermedad vascular periférica. Los pacientes con DM2 presentan con mayor frecuencia estas complicaciones, aunque los porcentajes no están bien establecidos por depender de múltiples factores. La enfermedad vascular periférica del paciente con DM2 predomina en las extremidades inferiores (90%), puede ser devastadora y dejar secuelas importantes, incapacidad permanente y/o dolor crónico de difícil tratamiento. En México es la principal causa de amputación en miembros inferiores⁵.

La enfermedad isquémica en el paciente con DM es el resultado de una degeneración arterosclerótica acelerada, principalmente de las arterias tibioperoneas⁶. La afectación vascular en los pacientes diabéticos involucra la micro y macrocirculación. En la microcirculación existe una reducida respuesta vasodilatadora, la cual se produce debido a una reducción a la respuesta dependiente del endotelio, de la fibra muscular lisa y del reflejo nervioso⁷. Nuevos estudios añaden a la fisiopatología de la enfermedad isquémica que, en los pacientes con DM (independiente del tipo), las CPE, descritas más adelante, muestran dificultad para su proliferación, adhesión e incorporación a las estructuras vasculares; debido a los efectos metabólicos adversos de la DM y al reducido número de estas células, así como a una disfunción en respuesta a la lesión del tejido⁸. Las CPE se encuentran en el adulto en la médula ósea y en

sangre periférica y estas células pueden contribuir a la neovascularización inducida por la lesión o patología preexistente⁹. Se han realizado modelos experimentales en animales en los cuales se desarrolló DM y se les transplantó médula ósea en los sitios donde existe lesión arterial y se observó un desarrollo rápido de la neovascularización, con mejoría de la isquemia que se presentó en los modelos animales¹⁰.

Por lo anterior una de las líneas que actualmente ha tomado gran impulso en el tratamiento de la enfermedad isquémica periférica en el paciente diabético es la utilización de CPE para la formación de nuevos vasos sanguíneos (neoangiogénesis). Las células hematopoyéticas progenitoras pueden diferenciarse a cualquier linaje de células hematológicas y se caracterizan principalmente por exhibir autorenovación; su utilización en el tratamiento de diversas enfermedades (principalmente oncológicas) se introdujo por primera vez a mediados del siglo XX, época en la que se realizaron los primeros intentos de alotrasplantes de médula y xenotrasplantes. Sin embargo fue necesario que se identificaran los antígenos del sistema HLA (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) y se desarrollarán los medicamentos inmunosupresores a principios de los años 60 para que esto se llevara a la práctica. En los años 70 se realizaron los primeros trasplantes de médula ósea que lograron curar a pacientes con leucemia. Las CPE forman parte de esta población de células hematopoyéticas progenitoras, en un principio se creyó que solo se producían durante la vida embriológica¹¹.

En 1997 se rompió el paradigma clásico de que las células angioblásticas con capacidad para diferenciarse en células endoteliales para la neoformación de vasos sanguíneos, sólo se producían durante el período embriológico. Asahara y colaboradores publicaron en este año que células hematopoyéticas del adulto, marcadas con la molécula de superficie CD34, podían diferenciarse a células endoteliales exvivo, a éstas células las llamaron CPE¹². Estas células pueden ser obtenidas de sangre periférica, médula ósea y sangre de cordón umbilical. La identificación y conteo de estas células se realiza utilizando el marcador de superficie CD34, que es el antígeno monoclonal desarrollado para moléculas de superficie específicas de las células hematopoyéticas progenitoras¹³. También se observó que estas células endoteliales primitivas eran positivas para el marcador conocido como Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGFR2, por sus siglas en inglés) que había sido identificado en estudios previos durante procesos de revascularización en modelos animales¹⁴. Las CPE también son positivas para la molécula de superficie CD133, también nombrada prominina o AC133 que es un antígeno conservado por estas células desde la vida embriológica con actividad biológica desconocida. Las CPE son por lo tanto células CD34, CD133 y VEGFR2 positivas, sin embargo la mayoría de los estudios para revascularización utilizando CPE han aplicado el marcador CD34 por que este ha sido mejor estudiado¹⁵. Las CPE son células mononucleares y desde el punto de vista morfológico se definieron originalmente en dos grupos: el primero conocido como “células huso” que tienen baja proliferación y el segundo como “células de paso” que tienen una capacidad mucho mayor de proliferación. Estudios sugirieron que el primer

grupo por su baja proliferación debía estar formado por células endoteliales locales maduras bien diferenciadas; mientras que las “células de paso”, encontradas en mayor número en las muestras de médula ósea, eran las CPE. No se ha logrado demostrar esta hipótesis en la actualidad¹⁶. Otros estudios han sugerido que las CPE pueden obtenerse también de células progenitoras no hematológicas de la médula ósea^{17,18} o provenientes de otros tejidos como corazón; el marcaje inmunológico de estas no ha sido posible hasta el momento¹⁹. Es difícil por lo tanto definir a la CPE como un grupo único de células mononucleares provenientes del linaje de las células hematopoyéticas progenitoras y se requerirá de mayor experimentación inmunológica para que puedan caracterizarse en su totalidad²⁰.

El número de células CD34 positivas puede incrementarse por el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), que promueve la proliferación y movilización de las células progenitoras medulares incluyendo a las CPE. Múltiples estudios demostraron que cuando se estimulan células CD34 positivas con G-CSF se obtiene un cultivo que puede dividirse en dos grandes líneas celulares, la primera formada por células mononucleares (grupo de las CPE), granulocitos y algunas células dendríticas; el segundo grupo se compone principalmente de células dendríticas^{13,21}. En relación a la incidencia de arteriopatía periférica, aunque variable según los distintos estudios, supone unos 20 casos nuevos por 100.000 habitantes/año, lo que da una prevalencia de un 5% de la población, al tratarse de una enfermedad no curable, aunque si tratable consiguiendo una buena calidad de vida. Predomina entre los 55 y 60

años de edad, afecta al hombre 5 veces más que a la mujer y se localizan en un 90% en las extremidades inferiores y en un 10% en las extremidades superiores²².

El paciente con DM, que presenta enfermedad isquémica puede presentar un síndrome conocido como “pie diabético”, definido por la OMS como la ulceración, infección y/o gangrena del pie que están asociados a neuropatía y a diferentes grados de enfermedad arterial periférica. Este síndrome es una complicación grave que puede resultar en la amputación del miembro. La polineuropatía sensoriomotora que sufren los pacientes con DM debida a daños en la microcirculación de los nervios autónomos evoluciona a degeneración de los músculos lumbricales e interóseos, esto resulta en la pérdida del arco plantar. Debido a la remodelación del pie del paciente diabético por el mecanismo mencionado, los puntos de apoyo del pie cambian, propiciándose traumatismos crónicos con la marcha; a este fenómeno se le suma el riego sanguíneo insuficiente que afecta la resolución normal de los procesos inflamatorios. Este conjunto de afecciones evolucionan finalmente al “pie diabético”⁶. Por su alta frecuencia y los enormes costos sanitarios y sociales constituye un grave problema de salud pública²³. Aproximadamente un 20% de los pacientes diabéticos desarrollarán úlceras del pie en algún momento de su vida. En el año de 1995 vivían en México 3.8 millones de adultos con diabetes mellitus, lo que lo colocaba en el noveno lugar entre los 10 países con mayor número de diabéticos; para el año 2025 se calcula que esta cifra llegará a 11.7 millones y México ocupará la séptima posición a nivel

mundial²⁴. Los costos estimados del tratamiento de una úlcera del pie en EUA en 1999 eran de US 28,000, siendo en otro estudio en Suecia de US 18,000 sin amputación, y EUA 34,000 con amputación²⁵.

Clínicamente podemos sospechar de enfermedad isquémica de la extremidad inferior en un paciente con: retraso del llenado capilar, palidez a la elevación de la extremidad, rubor al descenso de la misma, pérdida del vello local, engrosamiento de las uñas, ausencia o disminución de pulsos y/o claudicación intermitente (dolor a la marcha). El dolor domina la escena clínica, es severo, a menudo intolerable, ocurre primordialmente durante a la noche, siendo permanente cuando la presión de perfusión se reduce críticamente, disminuyendo considerablemente la calidad de vida del paciente²⁶. El dolor al reposo es el signo clínico indicativo de isquemia severa^{6, 27}. Existen diferentes herramientas útiles para la evaluación de la isquemia de miembros periféricos, unas son indirectas como el índice tobillo-brazo; este consiste en un radio obtenido de la siguiente manera: se mide primero la presión sistólica a la altura de la arteria pedia dorsal o de la tibial posterior utilizando un esfigmomanómetro con manguito convencional, posteriormente se divide entre el valor obtenido con la misma técnica, de la arteria braquial. Usualmente la presión en el tobillo excede a la del brazo por 12-24 mmHg, cuando obtenemos un índice tobillo-brazo menor a 0.9 es indicativo de enfermedad oclusiva; cuando obtenemos un valor menor a 0.3 esto nos habla de isquemia severa^{28, 29}. La arterosclerosis de los vasos periféricos en los pacientes con DM puede alterar esta medición, provocando valores anormalmente elevados. La monografía vascular o Doppler

segmentario utiliza la transmisión de ondas de sonido ultrasónicas (2-10 mgHz), posteriormente cuando estas rebotan en el tejido son captadas como ecos por el mismo transductor que las interpreta como sonidos o como imágenes dependiendo del dispositivo. El registro de las ondas utilizando el Doppler segmentario no son afectados por la arterosclerosis, lo que lo convierte en una herramienta esencial para la evaluación del flujo vascular en el “pie diabético”; sin embargo la evaluación de dichas ondas es fundamentalmente cualitativa y no cuantitativa, además la calidad de dichas ondas es afectada por el edema periférico y la presencia de ulceración. La oximetría trascutánea regional es un medidor objetivo y cuantitativo de la microvasculatura, actúa calentando la piel a 44°C por medio de un electrodo de Clark lo que origina vasodilatación; posteriormente registra la concentración de oxígeno que es perfundida al tejido y la registra en milímetros de mercurio Figuras: 1,2 y 3. Se considera una medición por debajo de 25 mm Hg en posición supina como un pie con riesgo de desarrollar complicaciones³⁰, menor de 10-15 mm Hg se considera una isquemia crítica en posición supina y se toman valores de 40 mm Hg para isquemia crítica cuando se hace la prueba con el paciente sentado. Existe una prueba de provocación que consiste en elevar la extremidad entre 30°-45°, cuando la presión de mercurio disminuye menos de 10 existe un buen pronóstico, cuando es mayor de 10 mm Hg el pronóstico es malo; esta prueba tiene un valor predictivo de 80%. Estas mediciones no son afectadas por la arterosclerosis el paciente con DM, y múltiples estudios han enfatizado su utilidad en la evaluación del “pie diabético” debido su adecuada sensibilidad (85%) y especificidad (92%)^{31,32}.

En general, la afectación de la vasculatura del miembro inferior en el pie diabético, es multisegmentaria, aunque predomina claramente el sector infrapatelar. Las lesiones infrapatelares tienen una característica propia que es el compromiso más frecuente del sector distal de la arteria poplítea, el tronco tibio-peroneo y el sector proximal y medio de las arterias tibiales, dejando en un alto porcentaje de los casos indemne el sector pedal o pedio. Existen opciones no quirúrgicas que incluyen la administración de vasodilatadores y hemorreológicos con efectividad no concluyente por los estudios actuales³³. La cirugía de by pass, que utiliza un trasplante autólogo de la vena safena interna del paciente para revascularizar el área de mayor oclusión, solo puede ser ofrecida a un limitado número de pacientes, debido a la dificultad en obtener un adecuado conducto, edad avanzada, gran co- ° morbilidad cardiaca, renal, pulmonar, entre otras limitantes³⁴.

Los avances en la tecnología, la genética y la biología celular podrían proveer nuevas opciones de tratamiento en los pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores que no son candidatos a los procedimientos usuales de revascularización. Los estudios en animales y recientes resultados en humanos sugieren que la administración de factores de crecimiento o genes reguladores y el trasplante de células progenitoras podrían proveer nuevas opciones terapéuticas para inducir angiogénesis^{35, 36}.

1.3. Importancia

El estudio detallado del trasplante de células hematopoyéticas como medida terapéutica para aliviar la isquemia crítica en la insuficiencia arterial periférica en pacientes con DM sería una aportación útil hacia el tratamiento no quirúrgico, con la finalidad principal de aliviar los síntomas clínicos y evitar la amputación de las extremidades.

1.4. Originalidad

La aportación de este trabajo fue la utilización de un grupo control a quienes se les trató con el sustrato (plasma autólogo) en el que se encuentran las células madre y al otro con las células hematopoyéticas y se observó si realmente son las células las que ocasionan la neoangiogénesis, o si solo es el proceso inflamatorio local inducido el que lo provoca. Es importante destacar que en la bibliografía los grupos en los que se realizó este procedimiento utilizaron sangre periférica y un número pequeño de casos, nosotros utilizamos médula ósea y un número mayor de pacientes.

1.5. Justificación

Existen escasos estudios de inducción de revascularización en el diabético, ninguno de ellos ha sido concluyente. No se sabe con certeza si la revascularización es producida por la infiltración de las sustancias que acompañan a las células progenitoras o si son estas células progenitoras las

que per se producen el efecto observado. Por tal motivo es muy importante determinar si este efecto es secundario a la acción de las CPE, o a la inflamación secundaria que existe en el sitio de la inoculación^{37, 38}.

Creemos que el trasplante autólogo de células progenitoras hematopoyéticas para generación de angiogénesis puede ser parte importante del tratamiento del “pie diabético” y las extremidades con isquemia crítica³⁹, las ventajas que ofrece en relación al tratamiento quirúrgico son las siguientes:

1. La población a tratar tiene habitualmente un alto riesgo quirúrgico (edad avanzada, cardiopatía isquémica asociada, EPOC secundario a tabaquismo, compromiso severo de otros territorios vasculares, insuficiencia renal, entre otros) lo que contraindica en forma absoluta o relativa una anestesia general, debido primordialmente el estrés sistémico provocado por una cirugía prolongada, compleja⁴⁰.
2. No hay casos reportados de mortalidad en el trasplante de médula ósea comparado con el de la cirugía el cual oscila entre 1.9% y 15.7%^{41,42}.
3. El trasplante fallido no excluye un procedimiento de reconstrucción quirúrgica, mientras que la cirugía, salvo raras excepciones, excluye un posterior tratamiento.
4. La revascularización quirúrgica requiere un completo control previo de la infección, lo que en casos complicados, críticos, demora la revascularización. Esto no sucede con el trasplante. El ambiente de infección local y regional de las úlceras explica la relativamente frecuente infección de las heridas quirúrgicas y de los injertos.

5. La combinación de una neuropatía sensitivo-motora asociada a la pérdida de la respuesta inflamatoria neurogénica y a la disfunción microvascular, da como consecuencia una pierna y pie biológicamente comprometidos, lo que interfiere con la cicatrización de las heridas quirúrgicas, frecuentemente largas y múltiples, lo que hace la evolución de la cicatrización de las mismas lenta y tórpida.

6. La localización muy distal de la arteria pedia necesita de una vena larga, la cual no siempre se puede conseguir excepto que el paciente tenga un buen “flujo” desde la arteria poplítea o femoral superficial distal⁴³.

7. La vena safena interna no debe utilizarse ya que es prioritario conservarla para la revascularización coronaria. Debe recordarse que el compromiso del árbol coronario está presente en más del 70% de este tipo de pacientes⁴⁴.

La obtención de neoformación de vasos sanguíneos reflejada en la mejoría clínica y en los parámetros de oximetría trascutánea de la extremidad con la isquemia crítica (después de tres meses de la realización de un injerto autólogo) permitirá utilizar este método como una alternativa viable para evitar un procedimiento quirúrgico en pacientes de alto riesgo.

CAPITULO 2

2. HIPÓTESIS

El trasplante autólogo de células hematopoyéticas de médula ósea CD34 positivas inducirá neovascularización de la extremidad isquémica, mejorando significativamente la circulación, y evitará el tratamiento quirúrgico y/o la amputación.

CAPITULO 3

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Determinar la eficiencia del trasplante autólogo de células progenitoras de médula ósea contenidas en la médula ósea como parte del tratamiento de la enfermedad arterial isquémica periférica grave en pacientes con DM y/o aterosclerosis.

3.2. Objetivos Particulares

3.2.1 Demostrar que el transplante autólogo es efectivo en la estenosis crítica de la insuficiencia arterial periférica del paciente diabético.

3.2.2 Observar y evaluar la recuperación y complicaciones después de 3 meses del procedimiento

3.2.3 Determinar los costos del procedimiento.

3.2.4 Comparar la utilización del sustrato de las células madre (plasma autólogo) en el grupo control para determinar si la neoangiogénesis es secundaria al proceso inflamatorio o es debido a los elementos celulares del procedimiento.

3.2.5 Comparar el procedimiento con los tratamientos médicos convencionales

CAPITULO 4

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. Pacientes

Fueron incluidos 20 pacientes de la consulta del Servicio de Cirugía General, Hematología y Endocrinología del Hospital Universitario, “Dr. José Eleuterio González” de la U.A.N.L diagnosticados con diabetes mellitus con o sin aterosclerosis que revelaran enfermedad vascular periférica con signos de isquemia en una o ambas extremidades, manifestadas por lesión atrófica o dolor.

Grupo I, n=5 grupo control, a los que se aplicó solo el sustrato de las células madre (plasma sin células madre) en la extremidad afecta y que

recibieron el tratamiento médico por tres meses a base de hemorreológicos y vasodilatadores⁴⁵.

Grupo II, n=15 recibieron la terapia de trasplante de células hematopoyéticas en la extremidad afecta y terapia a base de hemorreológicos y vasodilatadores.

4.2. Materiales

Equipo de asepsia y antisepsia, aguja de Jamshidi para aspiración de médula ósea, agujas No.25 y juego de jeringas (Figura 4) Ropa para cirugía menor. Medidor de oxígeno transcutáneo multicanal modelo TCM-400 marca Radiometer (Figura 3), Doppler vascular y esfignomanómetro, marcador quirúrgico, equipo de radiodiagnóstico y material para angiorresonancia, pruebas de laboratorio (Bh, perfil bioquímico), equipo de aféresis celular, equipo de cómputo con multimedia, Filgrastim 600 microgramos/k/día/4 días vía subcutánea para los pacientes de trasplante, lidocaína al 2%, clopidrogel 75mg c 24 hrs., pentoxifilina 400 mg c/8 hrs., tramadol/acetaminofen 325 mg c/12 hrs. además para los pacientes del grupo control 20 cc de plasma autólogo.

4.3. Instalaciones

Laboratorio de Hematología, que llevó a cabo el procesamiento de las células a transplantar (Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL). Quirófano equipado para la intervención de sujetos de estudio (Cirugía Ambulatoria Servicio de Cirugía General, Hospital Universitario “Dr. José

Eleuterio González” de la UANL). Departamento de radiología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL. Biblio-hemeroteca. (Facultad de Medicina de la UANL). Área de trabajo para evaluación de resultados, redacción de informes (Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL).

4.4. Métodos de Estudio

Se llevó a cabo la selección de sujetos para el estudio con base a los criterios de inclusión y exclusión descritos más adelante y se realizó la evaluación del estado de salud general de los pacientes previo al inicio del estudio.

4.5. Procedimiento

Se capturaron todos los pacientes que acuden a los Servicios de Cirugía General o Endocrinología que reunieron los criterios de inclusión. Durante el tiempo que duró el protocolo el paciente recibió el cuidado convencional de sus úlceras (curaciones) y se incluyó antibioticoterapia en caso de que presentara signos de infección local leve.

Visita 1: Se realizó historia clínica completa, revisión de los criterios de inclusión y exclusión, firma de la carta de consentimiento informado, se solicitaron exámenes de laboratorio generales (biometría hemática, perfil bioquímico), tele de tórax, eco doppler de extremidades con determinación del índice brazo-tobillo, se clasificó de acuerdo a la escala de Leriche y Fontaine⁴⁶

(Tabla II), además se realizó medición de presión de oxígeno transcutáneo y angiorresonancia de extremidad afectada.

Se explicó el procedimiento al paciente invitándolo a participar, previa firma del consentimiento informado.

Visita 2: Se inició el factor estimulante de colonias (Filgastrim) a 600 microgramos/k/día/4 días vía subcutánea.

Visita 3: Se realizó un procedimiento de punción y recolección de médula ósea con anestesia local de la cresta iliaca posterior o sacro, con aguja de Jamshidi para aspirado con el fin de obtener 100ml (Figura 5). El producto obtenido se procesó en una centrifuga refrigerada Sigma EK15® a 3500 rpm/15 minutos a 8°C con HES 6% (pentalmidon 6g/100ml)) para obtener la capa de células mononucleares (Figuras: 6 y 7). Una vez obtenidas las células se realizó un conteo de células CD34+ y su viabilidad fue evaluada con un citofluómetro FACScalibur de Becton Dickinson® con CD45FITC (Isotiocianato de Fluoresceína)/CD34PE (Ficoeritrina)/7AAD (7-Amino Actinomicyn D). Se ajustó la meta a 2×10^6 de células mononucleares, en un tubo de falcón estéril de 50 ml y se llevaron a quirófano para administrar al paciente por vía intramuscular de 0.5 a 1 ml en 30 a 50 sitios de la extremidad afectada (Figura 1 y 8), con una profundidad de aproximadamente un centímetro, utilizando una aguja número 25. La administración se llevó acabo en quirófano, bajo anestesia raquídea o sedación en caso de ser necesario. El objetivo era administrar al paciente más de 2×10^6 células totales.

Visita 4 y subsecuentes: Se realizó una evaluación clínica semanal, vigilando especialmente datos de infección en los sitios de punción, además se

realizó oximetría transcutánea semanalmente comparativa en tórax y extremidad afecta para ver los cambios durante el periodo de observación. En la semana 12 postransplante de células, se efectuó la última revisión semanal y se realizó una angiorresonancia para determinar el grado de neoangiogénesis posterior al tratamiento (Tabla I, III y Figura 9).

CAPITULO 5

5. RECURSOS METODOLÓGICOS

5.1. Diseño del Estudio

Clínico tipo: Casos y controles.

Dirección y Enfoque de la investigación: Prospectivo y Longitudinal

5.2. Criterios de Inclusión:

Pacientes con diabetes mellitus y/o aterosclerosis que presenten como complicación enfermedad arterial periférica con isquemia grave de una o ambas extremidades inferiores manifestada por lesión trófica y/o dolor. Pacientes con amputación distal reciente, en la cual no ha existido mejoría importante

posterior al tratamiento convencional a base de curaciones y medicamentos. Pacientes de sexo indistinto, mayores de 18 años que deseen participar en el estudio y que hayan firmado un consentimiento informado.

5.3. Criterios de Exclusión:

Pacientes con estados hipercoagulables. Con antecedentes de enfermedad vascular obstructiva en cerebro, riñones o corazón. Pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva (fracción de eyección menor a 30%). Enfermedad neoplásica maligna. Gangrena que requiera de la amputación parcial o total de una extremidad. Paciente con un proceso infeccioso activo, grave en cualquier sitio del organismo, diabetes mellitus descompensada o mayores de 75 años de edad.

5.4. Criterios de Éxito

Se consideró éxito cuando hubo mejoría clínica (Clasificación funcional de Leriche y Fontaine) y/o existió desarrollo moderado o abundante de vasos colaterales y una oximetría transcutánea mayor de 40 mm Hg.

5.5. Criterios de Fracaso

Se consideró fracaso si no existió mejoría clínica (Clasificación funcional de Leriche y Fontaine) y/o no existió desarrollo de nuevos vasos colaterales mediante angiografía comparativa y una evaluación de oximetría transcutánea menor de 40 mm Hg.

5.6 Criterios de Eliminación

Pacientes que no desearon participar más en el protocolo. Pacientes que durante el proceso de estimulación presentaron alguno de los criterios de exclusión antes mencionados.

CAPITULO 6

6. MUESTREO / EVALUACIONES

Evaluación previa a trasplante: estado de salud, criterios de inclusión, exámenes de laboratorio y gabinete (incluye angiorresonancia).

- Semanal (por 12 semanas): Estado de salud, mejoría de síntomas (dolor en reposo o al ejercicio), índice tobillo-brazo, características de los sitios de punciones y oximetría transcutánea.
- A los 3 meses: Angiorresonancia de control, y revisión de todos los datos obtenidos durante las evaluaciones semanales.
- Evaluación final de todos los resultados.
- Análisis Estadístico.

Se realizaron pruebas de estadística descriptiva para analizar los resultados de este trabajo, tales como: medidas de tendencia central (promedio, moda y mediana) y medidas de dispersión (desviación estándar, rango).

Estadística inferencial: Contrastación múltiple de medias y prueba de Kolmogorov-Smirnov, T de Student y Chi cuadrada.

CAPITULO 7

7. RESULTADOS

Dentro de los criterios de éxito del presente estudio se tomaron como parámetros la mejoría clínica evidenciada a través de un cambio positivo o negativo en la clasificación funcional de Leriche y Fontaine (Tabla II), así como la angiorresonancia previa y posterior al trasplante, la medición de oxígeno trascutáneo. El tratamiento se consideró exitoso cuando se documentó mejoría de un grado IV ó III a grados II (a ó b) y I, así como el desarrollo de nuevos vasos colaterales en la angiorresonancia comparativa posterior a las 12 semanas de observación, además de una lectura de oximetría trascutánea mayor de 40 mmHg.

Dentro de los criterios de fracaso se consideraron los siguientes: Sin mejoría clínica (clasificación funcional de Leriche y Fontaine), no existe desarrollo de nuevos vasos colaterales mediante angiografía comparativa, +0 sin desarrollo de vasos colaterales, +1 desarrollo leve y la evaluación de oximetría trascutánea menor de 40 mm. Hg.

En la comparación de los grupos, en el grupo I (control) a pesar de haberse observado una mejoría clínica en la clasificación de Leriche y Fontaine un 50% de los pacientes refirieron mejoría clínica, así mismo en este grupo en el análisis estadístico se comprueba a través de la prueba T de Student que la oximetría trascutánea pre y postrasplante fue a una $P = .005$ lo cual es estadísticamente significativo (Tabla IV), no así en el resto de los parámetros valorados, observado en la formación neovascular en la angiorresonancia, en donde en el 100% de ellos no se evidenció un cambio significativo (Tabla I). Cabe señalar que la sola estimulación de la médula ósea y la colocación del sustrato de las CPE (albúmina al 5%) en el grupo control propiciaron en forma ocasional la neoangiogénesis secundaria al proceso inflamatorio o a los elementos celulares del procedimiento.

En el grupo II se observa en el 100% de los casos una mejoría importante en todos los parámetros; desde el punto de vista clínico, los pacientes referían un cambio favorable en la claudicación intermitente y en la escala clínica de Leriche y Fontaine (Tabla I y II), así mismo la oxigenación trascutánea mejoró importantemente a partir de la novena o décima semana del

trasplante (Tabla V) y la angiorresonancia mostró en el 100% de los casos neoangiogénesis objetiva y aumento en la irrigación distal de la extremidad afectada (Figura 9). Cabe mencionar que uno de estos pacientes tenía una amputación transmetatarsiana (Figura 10), la cual a 1 mes de evolución no podía cicatrizar adecuadamente (Figura 11), posterior al trasplante se observó mejoría significativa en la cicatrización de la amputación a las 2 y 7 semanas (Figuras 12 y 13), hasta las 15 semanas postrasplante donde la herida se encontraba totalmente cicatrizada (Figuras 14). Un paciente fue eliminado del estudio ya que desarrolló insuficiencia renal, entrando al programa de diálisis.

CAPITULO 8

8. DISCUSIÓN

Las complicaciones que representan mayor morbimortalidad en el paciente con DM son: aumento en el riesgo de infarto al miocardio, ceguera, insuficiencia renal, neuropatía periférica y enfermedad vascular periférica. La enfermedad vascular periférica del paciente con DM2 predomina en las extremidades inferiores (90%), puede ser devastadora y dejar secuelas importantes, incapacidad permanente y/o dolor crónico de difícil tratamiento. En México es la principal causa de amputación en miembros inferiores⁵.

Se han estudiado modelos experimentales en animales en los que se provocó DM y se les transplantó médula ósea en los sitios donde existió lesión arterial, observándose un desarrollo rápido de la neovascularización, con

mejoría de la isquemia. Por lo anterior una de las líneas que ha tomado gran impulso en el tratamiento de la enfermedad isquémica periférica en el paciente diabético es la utilización de CPE para estimular la neoangiogénesis.

En los años 70 se realizaron los primeros trasplantes de médula ósea que lograron curar a pacientes con leucemia. Las CPE forman parte de esta población de células hematopoyéticas progenitoras, en un principio se creyó que solo se producían durante la vida embrionaria¹¹. En 1997 se rompió el paradigma clásico de que las células angioblásticas con capacidad para diferenciarse en células endoteliales para la neoformación de vasos sanguíneos sólo se producían durante el periodo embrionario.

Estas células pueden ser obtenidas de sangre periférica, médula ósea y sangre de cordón umbilical. También se observó que estas células endoteliales primitivas eran positivas para el marcador conocido como Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGFR2, por sus siglas en inglés) que había sido identificado en estudios previos durante procesos de revascularización en modelos animales¹⁴. Las CPE son por lo tanto células CD34 y VEGFR2 positivas, sin embargo la mayoría de los estudios para revascularización utilizando CPE se ha empleado el marcador CD34 por que éste ha sido mejor estudiado¹⁵. Es difícil definir a la CPE como un grupo único de células mononucleares provenientes del linaje de las células hematopoyéticas progenitoras y se requerirá de mayor experimentación inmunológica para que puedan caracterizarse en su totalidad²⁰. Múltiples estudios demostraron que cuando se estimulan células CD34 positivas con G-CSF se obtiene un cultivo

que puede dividirse en dos grandes líneas celulares, la primera formada por células mononucleares (grupo de las CPE), granulocitos y algunas células dendríticas; el segundo grupo se compone principalmente de células dendríticas^{13, 21}.

Los avances en la tecnología, la genética y la biología celular podrían proveer nuevas opciones de tratamiento en los pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores que no son candidatos a los procedimientos usuales de revascularización. Este estudio, como otros que se encuentran en la literatura, muestra el importante avance que tiene este tipo de tratamiento con células madre hematopoyéticas en pacientes que actualmente no tienen otra alternativa para mejorar su calidad de vida, sobre todo en las enfermedades crónicas degenerativas como en el caso de la Diabetes Mellitus, la aterosclerosis y otras enfermedades vasculares, en las que la única opción de tratamiento en la actualidad es la amputación de la extremidad.

Nuestro estudio proporciona evidencia del beneficio del tratamiento con trasplante autólogo de células hematopoyéticas para la neoformación vascular en las extremidades inferiores isquémicas, y viene a despejar las dudas en relación a que la sola proliferación de células madre sistémica y la inflamación local pudiesen propiciar la neoangiogénesis. Este estudio apoya la nueva experimentación en el campo del trasplante de células hematopoyéticas, ya que en los pacientes en que fueron inyectadas las células se encontró una mejoría clínica local, reflejada en una mejoría en la oxigenación transcutánea y

neoangiogénesis demostrada por angiorresonancia, lo que tal vez obedeció a factores humorales liberados localmente después del trasplante.

CAPITULO 9

9. CONCLUSIONES

Mediante la comparación de los parámetros valorados entre los dos grupos estudiados, se concluye que en el grupo I (control) hubo una mejoría clínica del 50 % la cual fue valorada con la escala de Leriche y Fontaine (tabla II), a diferencia del grupo II (trasplante) donde la mejoría se presentó en el 100% de los pacientes; posterior al análisis estadístico se evidenció un aumento significativo en la prueba T de Student en la oximetría trascutánea de ambos grupos y se observó la formación de nuevos vasos en la angiorresonancia postrasplante (tabla I) en la totalidad de los pacientes trasplantados y solo en un caso del grupo I (control). Esto demuestra que el transplante autólogo es

efectivo en la estenosis crítica de la insuficiencia arterial periférica del paciente diabético.

Cabe señalar que la sola estimulación de la médula ósea y la colocación del sustrato de las CPE (albúmina al 5%) en el grupo control propiciaron en forma ocasional la neoangiogénesis secundaria al proceso inflamatorio o a los elementos celulares del procedimiento.

Podemos afirmar que el solo hecho de realizar la punción en la extremidad afecta no es suficiente para que factores locales propicien la migración de las células madre para neoangiogénesis.

Se obtuvieron resultados favorables observando de forma objetiva que el trasplante autólogo de células hematopoyéticas de médula ósea CD34 indujo neovascularización en la extremidad inferior afecta y mejoró significativamente la circulación evitando en muchos casos el tratamiento quirúrgico y/o la amputación.

Se valoró el costo - beneficio del procedimiento determinando que la mejoría obtenida en este tratamiento es un beneficio a corto y largo plazo en los pacientes diabéticos.

Se comparó el procedimiento con otros tratamientos médicos convencionales concluyendo que el trasplante autólogo de células

hematopoyéticas ofrece grandes beneficios en estos pacientes, corroborando que éste es una opción terapéutica más, que puede ser utilizada tanto sola como en conjunto con otros tratamientos médicos para la mejora en la circulación.

Se determinó la eficiencia del trasplante autólogo de células progenitoras de médula ósea contenidas en la médula ósea como parte del tratamiento de la enfermedad arterial isquémica periférica grave en pacientes con DM y/o aterosclerosis.

BIBLIOGRAFIA

1. The Expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1999;22:5-19.
2. Farhat DW. Disorders of glucose. *Endocrinol Emerg* 2001;23:27-43.
3. Secretaría de Salud. Sistema epidemiológico y estadístico de defunciones (CIE-10) 2001. 1 Jul. 2006 <<http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/DM-2.htm>>
4. Arredondo A., Zúñiga A. Economic consequences of epidemiological changes in diabetes in middle-income countries: the mexican case. *Diabetes Care* 2004;27:104-9.
5. Zachary T. American Diabetes Association 60th scientific sessions, 2000. *Diabetes Care* 2001;24:946-51.
6. Bauer E. Foot Ulcers. *N Engl J Med* 2000; 343: 787-793.
7. Zimmy S. Early Detection of Microcirculatory Impairment in *Diabetic* Patients With *Foot* at Risk. *Diabetes Care* 2001; 24: 1810-1814.
8. Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ et al. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes* 2004;53:195-99.
9. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 2002;106:2781-86.
10. Huang P, Li S, Han M, Xiao Z, Yang R, Han ZC. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia. *Diabetes Care* 2005;28:2155-60.

11. Edward A. Hematopoietic stem cell transplantation. *N Engl J Med* 2006; 354: 1813-26.
12. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964–67.
13. Hill JM, Zalos G, Halcox JP et. al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003;348:593-600.
14. Zentilin L. Bone marrow mononuclear cells are recruited to the sites of VEGF- induced neovascularization but are not incorporated into the newly formed vessels. *Blood* 2006;107:3546-54.
15. Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000;95:3106–12.
16. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP, et al. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 2000;105:71–7.
17. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002;109:337–46.
18. Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001;107:1395–402.
19. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114:763–76.
20. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. *Circ Res* 2004;95:343-53.
21. Curti A, Fogli M, Ratta M, Biasco G, Tura S, Lemoli RM. Dendritic cell differentiation from hematopoietic CD34+ progenitor cells. *Biol Regul Homeost Agents* 2001;15:49-52.
22. Iorio AC. Rol del Tratamiento Endovascular en los Pacientes con Pie Diabético. *FAC* 2005. Jul 1 2006. <http://www.fac.org.ar/ccvc/llave/c017/alvareio.php>
23. World Health Organization. The cost of diabetes. WHO Fact Sheet No. 236. 2002. Jun 1 2006. <<http://www.who.int>>

24. Escobedo J. Incidencia y letalidad de las complicaciones agudas y crónicas de la diabetes mellitus en México. *Salud Pública Mex* 1996;38:236-42.
25. Brown BJ. The progressive cost of complications in type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 1999;159:1873-80.
26. James M. Sharing the pain. *Diabetes Care* 2003;26:1606-07.
27. Boyko J, Ahroni J, Kohen V, Nelson K, Heagerty P. Prediction of diabetic foot ulcer occurrence using commonly available clinical information. *Diabetes Care* 2006;29:1202-07.
28. Katsilambros N, Tentolouris N, Tsapogas P, Dounis E. Atlas of diabetic foot. Wiley and sons Ltd. UK 2003.
29. Boyko J, Ahroni J, Stensel V, Forsberg R, Davignon D, Smith D. A Prospective Study of Risk Factors for Diabetic Foot Ulcer. *Diabetes Care* 1999;22:1036-99.
30. Kalani M. Transcutaneous oxygen pressure and toe and toe blood pressure as predictors for outcome of diabetic ulcers. *Diabetes Care* 1999;22:127-31.
31. Sheffield PJ. Clinical applications of TcpO₂ in hyperbaric oxygen threatment. *Blood Gas News* 1998;72:10-3.
32. Elio M. Gas transcutaneous determination in diabetic critical limb ischemia. *Diabetes Care* 2005;28:2081-84.
33. Guilmot JL, Diot E. The role of drug therapy in the treatment of critical ischemia of the lower limbs. *Presse Med.* 1999;28:647-50.
34. Faries PL , Arora S, Pomposelli FB Jr et al. The use of arm vein in lower – extremity revascularization: results of 520 procedures performed in eight years. *J Vasc Surg* 2000;31:50-9.
35. Levy BI. Diabetes and ischemia of lower extremities: potential strategies of therapeutic angiogenesis. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu* 2005;;27-32
36. Silvestre JS. Diabetes and peripheral arterial occlusive disease: therapeutic potential and pro-angiogenic strategies. *Ann Cardiol Angeiol* 2006;55:100-3.
37. Panés J, Kurose I, Rodriguez-Vaca D, et al. Diabetes exacerbates inflammatory responses to ischemia-reperfusion. *Circulation* 1996;93:161-7.

38. Bastard JP, Magachi M, Lagathu C, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 2006;17:4-12.
39. Opie SR, Dib N. Local endovascular delivery, gene therapy, and cell transplantation for peripheral arterial disease. *J Endovasc Therapy* 2004;11:111-151.
40. Smetana GW. Preoperative pulmonary risk stratification for noncardiothoracic surgery: systematic review for the American College of Physicians. *Ann Intern Med* 2006;18:144-48.
41. Nicoloff AD, Taylor LM, McLafferty RB, Moneta GL, Porter JM. Patient recovery after infrainguinal bypass grafting for limb salvage. *J Vasc Surg* 1998;27:256-66.
42. Abou – Zamzam AAM, Lee RW. Functional outcome after infrainguinal bypass for limb salvage. *J Vasc Surg* 1997;25:287-97.
43. Goshima KRMD. A new look at outcomes after infrainguinal bypass surgery; traditionally reporting standards systematically underestimate the expenditure of effort required to Attain Limb salvage. *J Vasc Surg* 2004;39:350-55.
44. Barsilay JR. Coronary artery disease in diabetic patients with lower-extremity arterial disease: disease characteristics and survival. A report from the Coronary Artery Surgery Study (CASS) registry. *Diabetes Care* 1997;20:1381-87.
45. Rice TW. Optimal medical management of peripheral arterial disease. *Vasc Endovasc Surg* 2006;40:312-27.
46. Veith FJ, Hobson RW, Williams RA. *Vascular surgery. Principles and practice.* McGraw Hill. 1994:77.

APENDICES

APÉNDICE A

HISTORIA CLÍNICA

APÉNDICE A

HISTORIA CLÍNICA

Evaluación del Trasplante Autólogo de Células Hematopoyéticas de Médula Ósea para el Tratamiento de la Isquemia Crítica en la Insuficiencia Arterial Periférica en el Paciente Diabético

NOMBRE:

EDAD:

- Antecedentes Heredofamiliares:

- Antecedentes Personales Patológicos:

A. Evol.
DM. Años de evolución?
Tratada?
Dieta?

Retinopatía?
Nefropatía?
Cardiopatía?

Sí

- Medicamentos:

- Antecedentes Personales No Patológicos:

- PEEA:

EXPLORACIÓN VASCULAR

INSPECCIÓN:

PULSOS

| | Derecha | Izquierda |
|------------------|---------|-----------|
| Femoral | | |
| Poplíteo | | |
| Tibial Posterior | | |
| Pedio | | |

FLUJO: DOPPLER

| | Derecha | Izquierda |
|------------------|---------|-----------|
| Femoral | | |
| Poplíteo | | |
| Tibial Posterior | | |
| Pedio | | |

LERICHE Y FONTAINE

| GRADOS | CLÍNICA |
|-----------|--|
| Grado I | Lesiones asintomáticas |
| Grado II | Claudicación intermitente |
| IIa | Tras 150 m de marcha en llano |
| IIb | Tras menos de 150 m de marcha en llano |
| Grado III | Dolor en reposo |
| Grado IV | Lesiones de necrosis y gangrena |

APÉNDICE B

MEDICIÓN DE OXIMETRÍA TRANSCUTÁNEA

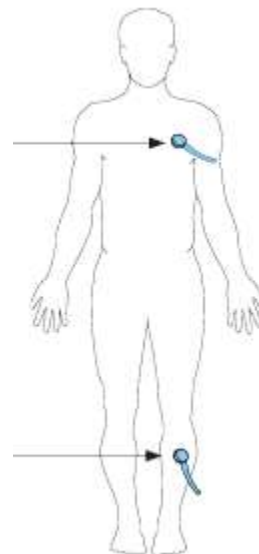
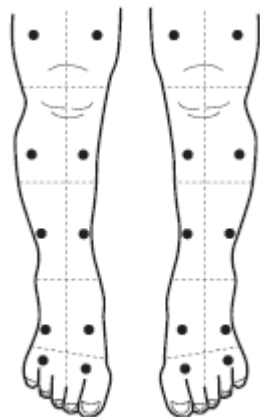
APÉNDICE B

MEDICIÓN DE OXIMETRÍA TRANSCUTÁNEA Laboratorio Vascular Procedimiento de Medición de Oximetría Trascutánea

Nombre del Paciente:

Edad:

Registro:



| Punto de Referencia | 0 grados | 45 grados | Oxígeno | Sentado |
|---------------------|----------|-----------|---------|---------|
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

Comentarios:

Realizó el procedimiento:

Fecha y hora:

APÉNDICE C

CONSENTIMIENTO INFORMADO

APÉNDICE C

CONSENTIMIENTO INFORMADO

INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE

¿En qué consiste este estudio? ¿Cuáles son sus objetivos?

El Servicio de Cirugía General de este Hospital está llevando a cabo un estudio de investigación clínica. El objetivo de este estudio es evitar la amputación de las extremidades en pacientes con enfermedad arterial periférica, mediante la inyección de células sanguíneas extraídas de la médula ósea, para que éstas formen nuevos vasos sanguíneos. Como antecedentes se ha realizado este proceso en otras partes del mundo demostrando muy buenos resultados sin efectos adversos importantes. Esta opción se ofrece a las personas que no son candidatas a realizar un by pass para mejorar su circulación distal.

¿Cómo se realizará este estudio?

En quirófano se realizará la extracción de médula ósea mediante una punción en el hueso de la cadera, la muestra se procesa y se inyecta cada 2cm en el área de la pantorrilla. Todo esto bajo una sedación ligera y el procedimiento no requiere internamiento todo es ambulatorio es decir podrá ir a su casa posterior al mismo.

¿Cuáles son los beneficios esperables y los riesgos potenciales de este estudio?

No se le puede garantizar que el tratamiento de este estudio vaya a ser eficaz en su caso, aunque es posible que si lo recibe mejore su calidad de vida y disminuya las posibilidades de ser amputado. En cualquier caso, su participación en el estudio puede ayudar a establecer la eficacia de un nuevo tratamiento del que se podrán beneficiar en el futuro otros pacientes en su misma situación.

Se pueden presentar acontecimientos adversos aunque todos los materiales son cuidadosamente estudiados antes de su uso en seres humanos. Los acontecimientos adversos más frecuentes que pueden presentarse son los derivados de cualquier intervención quirúrgica como fiebre o infección de la herida. También debe tenerse en consideración que este tratamiento puede originar otros acontecimientos adversos actualmente desconocidos.

¿Se dispone de otros tratamientos?

Actualmente se disponen de medicamentos para los pacientes que no son candidatas a la revascularización, los cuales no han tenido buenos resultados.

Su participación es voluntaria:

Si desea participar en este estudio debe comunicárselo a su médico del estudio. Su participación es voluntaria. Si interviene en este estudio debe saber que en cualquier momento puede decidir no seguir participando sin tener que manifestar razón alguna para ello. Si decide no continuar por favor contacte con su médico del estudio. Él/Ella le indicará la

mejor manera para retirarse del mismo. En este caso se le preguntará si su decisión está relacionada con algún acontecimiento adverso. Tanto si no quiere participar como si abandona el estudio, se le tratará de la forma habitual. Su médico del estudio también podrá retirarle de este estudio si así lo creyera conveniente; igualmente, podrá retirarle por no acudir a las visitas previstas, por no tomar la medicación como se le ha indicado o porque considere que es mejor para su salud y bienestar.

Revisión de Documentos Originales, Confidencialidad y Protección de Datos de Carácter Personal:

Ante cualquier eventualidad que pudiera surgir mientras que participe en este estudio o para cualquier pregunta sobre el mismo que desee realizar tras leer este documento, por favor diríjase a:

| | |
|--------------------------------|---|
| Nombre del Médicos del estudio | Dr.Gerardo E. Muñoz Maldonado Dr. Rogelio Salinas Domínguez Dr. Alfredo B. Cuéllar Barboza Dra. Mariajesús Treviño Garza |
| Dirección | Servicio de Cirugía General del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González de la UANL |
| Teléfono | 83 48 33 03 |

O al Comité de Ética del Hospital Universitario “Dr José Eleuterio González” con su representante Dr José Gerardo Garza Leal.

Si Ud. así lo desea, su médico de cabecera será informado de su participación en este estudio, para lo cual se le entregará una carta informativa para que se la haga llegar.

Se le entregará copia de esta información y del consentimiento firmado y fechado.

Se le notificará cualquier nueva información acerca del tratamiento de estudio y que pueda afectar a su decisión de seguir en el mismo.

CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

Número del paciente:

TITULO DEL ENSAYO: Evaluación del Trasplante Autólogo de Células Hematopoyéticas de Médula Ósea para el Tratamiento de la Isquemia Crítica en la Insuficiencia Arterial Periférica.

Yo, _____ y/o familiar

He leído la hoja de información que se me ha entregado.
He podido hacer preguntas sobre el estudio.
He recibido suficiente información sobre el estudio.
He hablado con: el Dr. Gerardo E. Muñoz Maldonado
He tenido tiempo suficiente para considerar de manera adecuada mi participación en el estudio.
Comprendo que mi participación es voluntaria.
Comprendo que puedo retirarme del estudio:
1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicaciones
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firma del participante:

Firma del investigador:

.....
.....

.....
.....

Testigo
Fecha: / /
(Manuscrita del participante)

Testigo
Fecha: / /

APÉNDICE D

HOJA DE CAPTURA DE DATOS. GRUPO I.

APÉNDICE D

HOJA DE CAPTURA DE DATOS. GRUPO I..

| NOMBRE | PRESTIMULACIÓN | | TCPO2 inicial | POSESTIMULACIÓN | | TCPO2 (último valor) |
|------------|----------------|-------|------------------|-----------------|-------|-------------------------|
| | ESCALA LF | ANGIO | | ESCALA LF | ANGIO | |
| PACIENTE 1 | | | | | | |
| PACIENTE 2 | | | | | | |
| PACIENTE 3 | | | | | | |
| PACIENTE 4 | | | | | | |
| PACIENTE 5 | | | | | | |

APÉNDICE E.

HOJA DE CAPTURA DE DATOS. GRUPO II.

APÉNDICE E.

HOJA DE CAPTURA DE DATOS. GRUPO II.

Hoja de Captura de datos para pacientes trasplantados

| | PRESTIMULACIÓN | | | POSESTIMULACIÓN | | | |
|------------|----------------|-------|----------------|-----------------|-------|-----------------------|-------------------------|
| Nombre | ESCALA LF | ANGIO | TCP O2 inicial | ESCALA LF | ANGIO | TCP O2 (último valor) | CUENTA ABSOLUTA de CD34 |
| PACIENTE 1 | | | | | | | |
| PACIENTE 2 | | | | | | | |
| PACIENTE 3 | | | | | | | |
| PACIENTE 4 | | | | | | | |
| PACIENTE 5 | | | | | | | |

TABLA I.

TABLA COMPARATIVA GENERAL

| | Estadio Clínico. Escala Leriche y Fontaine. | | Oximetría. | | Conteo de CD 34. | Angioresonancia. | Criterio de Éxito |
|-------------------|---|------------------|---------------|---------------|------------------|------------------|-------------------|
| | Pretrasplante | Postrasplante | Pretrasplante | Postrasplante | | Postrasplante | |
| Gpo. 1. Control | | | | | | | |
| 1 | IV | I a | 49 mmHg | 59 mmHg | NA | 1 cruz | Mejoría Parcial |
| 2 | IV | II b | 42 mmHg | 51 mmHg | NA | 2 cruces | Mejoría Completa |
| 3 | II b | II a | 44 mmHg | 47 mmHg | NA | 1 cruz | Mejoría Parcial |
| 4 | II b | II b | 27 mmHg | 32 mmHg | NA | Sin cambio | Sin Mejoría |
| 5 | III | II b | 30 mmHg | 34 mmHg | NA | Sin cambio | Sin Mejoría |
| Gpo. 2 Trasplante | | | | | | | |
| 1 | IV | Sin claudicación | 46 mmHg | 52 mmHg | 3.1 x 10 a la 6 | 3 cruces | Mejoría Completa |
| 2 | IV | Sin claudicación | 52 mmHg | 60 mmHg | 4.4 x 10 a la 6 | 3 cruces | Mejoría Completa |
| 3 | II b | Eliminación | 38 mmHg | Eliminación | 2.2 x 10 a la 6 | Eliminación | Eliminado |
| 4 | IV | II b | 48 mmHg | 60 mmHg | 20.6 x 10 a la 6 | 3 cruces | Mejoría Completa |
| 5 | IV | II b | 42 mmHg | 48 mmHg | 3.7 x 10 a la 6 | 1 cruz | Mejoría Completa |
| 6 | III | II b | 35 mmHg | 45 mmHg | 18.4 x 10 a la 6 | 3 cruces | Mejoría Completa |
| 7 | III | II a | 45 mmHg | 49 mmHg | 5.9 x 10 a la 6 | 2 cruces | Mejoría Completa |
| 8 | II a | Sin claudicación | 36 mmHg | 46 mmHg | 22.4 x 10 a la 6 | 3 cruces | Mejoría Completa |
| 9 | II b | I a | 30 mmHg | 34 mmHg | 9.8 x 10 a la 6 | 2 cruces | Mejoría Parcial |
| 10 | IV | III | 34 mmHg | 42 mmHg | 13.5 x 10 a la 6 | 2 cruces | Mejoría Completa |
| 11 | II | I a | 36 mmHg | 49 mmHg | 5.8 x 10 a la 6 | 3 cruces | Mejoría Completa |
| 12 | III | I a | 16 mmHg | 23 mmHg | 6.8 x 10 a la 6 | 1 cruz | Mejoría Parcial |
| 13 | IV | III | 22mmHg | 24 mmHg | 9.6 x 10 a la 6 | 1 cruz | Mejoría Parcial |
| 14 | II a | Sin claudicación | 35 mmHg | 41 mmHg | 11.9 x 10 a la 6 | 3 cruces | Mejoría Completa |
| 15 | II a | Sin claudicación | 31 mmHg | 44 mmHg | 11 x 10 a la 6 | 3 cruces | Mejoría Completa |

TABLA II.
CLASIFICACIÓN FUNCIONAL DE
LERICHE Y FONTAINE

| Leriche y Fontaine | |
|--------------------|--|
| Grados | Manifestaciones Clínicas |
| Grado I | Lesiones asintomáticas |
| Grado II | Claudicación intermitente |
| Grado IIa | Dolor posterior a caminar mas de 150 m. en plano |
| Grado IIb | Dolor posterior a caminar menos de 150 m. en plano |
| Grado III | Dolor en reposo |
| Grado IV | Lesiones de necrosis y gangrena |

TABLA III.

CLASIFICACIÓN DE LA NEOFORMACIÓN VASCULAR EN LA ANGIORRESONANCIA PRE Y POSTRASPLANTE.

| Angiorresonancia | |
|------------------|--|
| | Desarrollo de nuevos vasos colaterales |
| +0 | Sin desarrollo de vasos colaterales |
| +1 | Desarrollo leve |
| +2 | Desarrollo moderado |
| +3 | Desarrollo abundante |

TABLA IV.

TABLA COMPARATIVA DE OXIMETRÍA TRASCUTÁNEA. GRUPO I

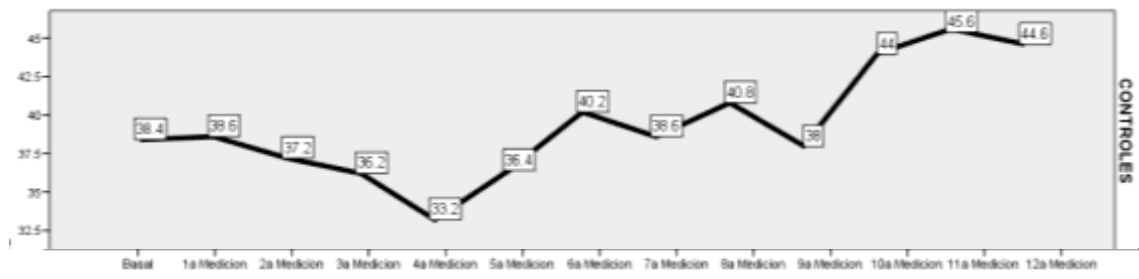


TABLA V.

**TABLA COMPARATIVA DE OXIMETRÍA
TRASCUTÁNEA. GRUPO II**

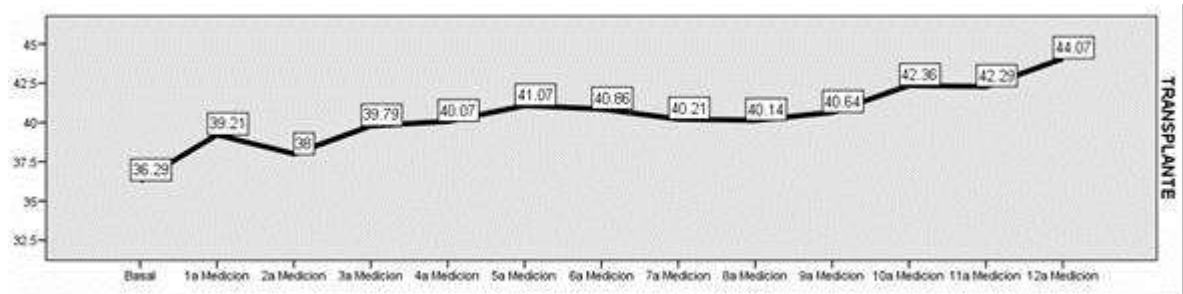




Figura 1. Procedimiento Quirúrgico Trasplante de CPE.



Figura 2: Medición de Oximetría Trascutánea.



Figura 3 .- Medidor de Oxígeno Trascutáneo Multicanal
Modelo TCM-400 Marca Radiometer



Figura 4: Material para Punción y Recolección de Médula Ósea.



Figura 5: Punción Sacra y Recolección de Médula Ósea.



Figura 6. Procedimiento de Centrifugación.
Centrifuga Sigma EK15®



Figura 7: Material para la Extracción de la Capa de Células Madre Posterior a la Centrifugación.

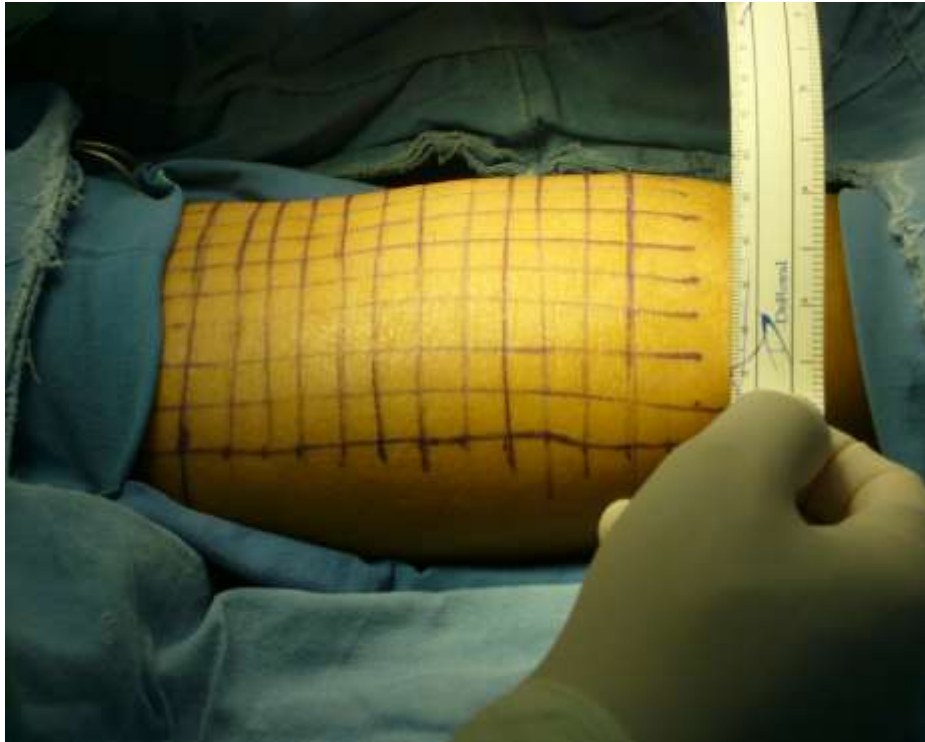


Figura 8: Delimitación de Área en Pantorrilla para la Inyección de Células Madre.

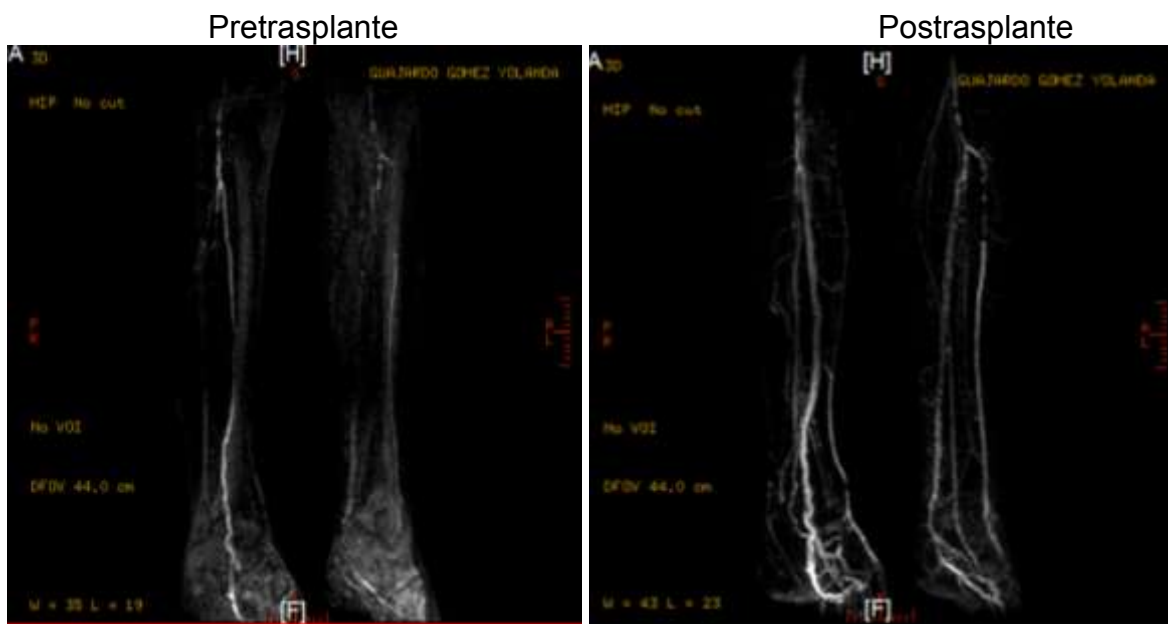


Figura 9. Angiorresonancia Magnética Pretrasplante y Postrasplante.



Figura 10. Amputación Transmetatarsiana.



Figura 11. Evolución de la Herida Posterior a un Mes de la Amputación.



Figura 12. Evolución de Herida Posterior a 2 Semanas del Transplante.



Figura 13. Evolución de Herida Posterior a 7 Semanas del Trasplante.



Figura 14. Evolución de la Herida Posterior a 15 Semanas del Trasplante.

RESUMEN

Gerardo Enrique Muñoz Maldonado Fecha de Graduación: Marzo, 2008

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del estudio: TRASPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS DE MÉDULA ÓSEA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ISQUEMIA CRÍTICA EN LA INSUFICIENCIA ARTERIAL PERIFÉRICA EN EL PACIENTE DIABÉTICO.

Número de páginas: 83 Como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Medicina

Área de Estudio: Ciencias de la Salud

El Propósito y Método del Estudio: Comprobar que el trasplante autólogo de células hematopoyéticas proporciona una medida terapéutica para aliviar la isquemia crítica en la insuficiencia arterial periférica en pacientes con DM y brinda una aportación útil hacia el tratamiento no quirúrgico, con la finalidad principal de aliviar los síntomas clínicos y evitar la amputación de las extremidades. Se llevó a cabo una selección de sujetos para este estudio con base a los criterios de inclusión y exclusión anteriormente descritos, se evaluó su estado de salud y posterior a su consentimiento se les fue designado un grupo (Grupo I control y Grupo II tratamiento) para realizar el procedimiento según fuera el caso.

Contribuciones y Conclusiones: La aportación de este trabajo fue la utilización de un grupo control a quienes se les trató con el sustrato (plasma autólogo) en el que se encuentran las células madre y al otro con las células hematopoyéticas y se observó si realmente son las células las que ocasionan la neoangiogénesis, o si solo es el proceso inflamatorio local inducido el que lo provoca. Se determinó la eficiencia del trasplante autólogo de células progenitoras de médula ósea como parte del tratamiento de la enfermedad arterial isquémica periférica grave en pacientes con DM y/o aterosclerosis.

FIRMA DEL ASESOR: _____

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Gerardo Enrique Muñoz Maldonado

Candidato para el Grado de

Doctor en Medicina

Tesis: TRASPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS DE MÉDULA ÓSEA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ISQUEMIA CRÍTICA EN LA INSUFICIENCIA ARTERIAL PERIFÉRICA EN EL PACIENTE DIABÉTICO

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Nacido en Monterrey Nuevo León el 8 de Junio de 1962. Hijo de Juan Muñoz Ortega y Bertha Maldonado Lozano.

Educación:

Inició sus estudios en el Colegio La Salle, para continuar en la Secundaria General Vicente Guerrero, el nivel medio superior lo realiza en la Preparatoria Número 7, su vocación lo lleva a titularse como Médico Cirujano y Partero en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, para luego realizar sus estudios de Posgrado en el Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González en el Servicio de Cirugía General, su constante búsqueda del conocimiento lo lleva a realizar un Fellowship en Cirugía Oncológica en Roswell Park Memorial Institute en Buffalo N.Y.

Experiencia profesional

Profesor Titular de Tiempo Completo de Pre y Posgrado en el Servicio de Cirugía General del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González.

Maestro adscrito al Centro Regional de Cirugía Laparoscópica con sede en el Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González.

Cirujano Adscrito al Servicio de Urgencias de la Clínica Cuauhtémoc y Famosa. Práctica privada como Cirujano General y Laparoscopia Quirúrgica. Director del Curso Advanced Trauma Life Support del American Collage of Surgeons

Jefe del Servicio de Cirugía General del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González.

Secretario Académico de la Licenciatura de Médico Cirujano y Partero en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León

Gerardo Enrique Muñoz Maldonado

Marzo de 2008