

# Administración intraarterial de médula ósea autóloga en pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores. Fase I

Intra-arterial administration of autologous bone marrow in patients with critical lower limb ischemia. Phase I.

Vicario JH<sup>1,2</sup>, Campo CD<sup>1</sup>, Gerardo LE<sup>2</sup>, Ortega H<sup>3</sup>, Vicario D<sup>4</sup>, Berduc JP<sup>2</sup>, Vicario M<sup>5</sup>, Novero ER<sup>2</sup>, Zavalla J<sup>2</sup>, Iturraspe G<sup>2</sup>, Pierini A<sup>1</sup>

## Resumen

Ensayo clínico de administración intraarterial de médula ósea autóloga no fraccionada (MOANF), en pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores sin opción de revascularización convencional. Punto final primario: evaluar factibilidad, seguridad y tolerancia del procedimiento.

**Material y métodos.** En la arteria femoral del miembro inferior comprometido se administraron 120 ml de MOANF. Parámetros evaluados: *clínicos* (estadio de la clasificación Fontaine, dolor de reposo, lesiones tróficas); *índice tobillo/brazo* (IT/B) basal y seguimiento 1, 3, 6, 12 y 24 meses; *angiografía* basal y seguimiento 1, 12 y 24 meses; *biopsia* de piel basal y 30 días; *necesidad de amputación mayor*; *tolerancia y seguridad*.

**Resultados.** De 54 pacientes evaluados, 34 pacientes cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión. En 10/34 pacientes (29%) fue necesaria la amputación mayor, y no se observaron mejorías significativa en los parámetros clínicos, IT/B y angiografías. En 24/34 pacientes (70%), no se requirió amputación mayor, en el seguimiento de 18±13,5 meses, y se observaron mejorías significativas en los parámetros clínicos, IT/B y angiografías. En las biopsias de piel se observó incremento en microvasculatura, con neoformación vascular con células CD31+ en los estudios inmunohistoquímico. No se observaron efectos adversos en los parámetros de seguridad y tolerancia. En el seguimiento se registró mortalidad en 4 pacientes (11,7%), que se relacionó con eventos cardiovasculares.

**Conclusiones.** La administración de MOANF vía intraarterial es un procedimiento factible, tolerable y seguro en pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores sin opción de revascularización. Si bien el número de pacientes de este ensayo es reducido, se aprecia una eficacia terapéutica potencial que avala la realización de estudios futuros con un número mayor de pacientes.

**Palabras clave:** *isquemia crítica de miembros inferiores, angiogénesis, médula ósea autóloga no fraccionada.*

## 1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad arterial periférica es una manifestación tardía de arteriosclerosis y la prevalencia se incrementa ante la presencia de factores de riesgo cardiovasculares y con la edad.<sup>1</sup> El tratamiento de la enfermedad arterial periférica se basa en farmacoterapia con drogas vasoactivas, antiagregantes plaquetarios, anticoagulantes, programa de ejercicios, corrección de los factores de riesgo como la hipertensión, diabetes, consumo de tabaco, dislipidemia, angioplastia con balón/*stent* y la reconstrucción quirúrgica

con *bypass* periférico. En los últimos años, se han registrado avances importantes en el tratamiento endovascular que permiten tratar oclusiones y lesiones largas complejas con dispositivos y *stents*. El tratamiento quirúrgico también ha evolucionado, con mejoras en las técnicas quirúrgicas. A pesar de los avances, hay un grupo de pacientes no se benefician con el tratamiento convencional, a causa de obstrucciones en varios segmentos arteriales, a la presencia de oclusiones largas, a la ausencia de lecho distal adecuado o procedimientos previos de angioplastia y/o cirugía no exitosos. Por este motivo hay un interés creciente en la comunidad médica en la investigación de los posibles mecanismos necesarios para promover y estimular el desarrollo de nuevos vasos colaterales en tejidos con perfusión tisular inadecuada, proceso conocido como *angiogénesis*. Basados en nuestra experiencia preclínica<sup>2</sup> de angiogénesis con médula ósea autóloga no fraccionada (MOANF) y cumpliendo con los requisitos de seguridad necesarios para pasar de un estudio experimental a la clínica se diseñó, en pacientes con isque-

1. Hospital J. B. Iturraspe, Santa Fe.
2. Sanatorio Garay, Santa Fe.
3. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe.
4. Sanatorio San Carlos, Bariloche.
5. Instituto CEVYL, Mar del Plata.

mia crítica de miembros inferiores sin opción de revascularización convencional, un protocolo de administración intraarterial de MOANF. El objetivo del estudio fue estimular el desarrollo de circulación colateral por medio de la administración de células progenitoras de la médula ósea y mejorar la perfusión tisular en pacientes con isquemia crítica crónica. El punto final del estudio fue evaluar seguridad, tolerancia del procedimiento y factibilidad funcional determinada por la cicatrización de las lesiones tróficas y el control del dolor. El resultado clínico del estudio fue evaluado por la necesidad de amputación mayor en el seguimiento.

## 2. MATERIAL Y MÉTODO

El protocolo fue aprobado por el Comité de Docencia e Investigación de los centros participantes y de acuerdo a la declaración de Helsinki de 1975 (revisada en 1988) para la realización de estudios en humanos. El consentimiento informado fue obtenido en todos los pacientes involucrados en el estudio.

### 2. 1. Tipo de estudio

Estudio prospectivo, no aleatorizado, de corte longitudinal y de intervención.

### 2. 2. Criterios de inclusión y exclusión

Pacientes con isquemia crítica crónica, definida por la presencia de enfermedad arterial periférica con dolor de reposo y/o lesiones tróficas representadas por úlceras isquémicas y necrosis de tejidos y/o dedos de lenta o sin resolución con tratamiento convencional, fueron evaluados con angiografía periférica, índice tobillo/brazo (IT/B) e interconsulta con los Servicios de Cirugía Vascul y Hemodinamia. Fueron incluidos de acuerdo con los siguientes criterios: 1) pacientes sin opción de revascularización quirúrgica o endovascular determinada por los Servicios de Cirugía Vascul y Hemodinamia; 2) índice tobillo/brazo (IT/B) de reposo <0,60; 3) pacientes con indicación de amputación mayor por el Servicio de Cirugía Vascul. Los criterios de exclusión fueron: enfermedad hematológica linfoproliferativa, anemia, mielofibrosis, enfermedad sistémica en actividad, gangrena con compromiso sistémico.

### 2. 3. Procedimiento

**2. 3. 1 Obtención de la médula ósea.** En la sala de cateterismo, mediante aspiración bajo anestesia local de la cresta ilíaca posterosuperior, se obtuvo un volumen de 120 ml de médula ósea, que fue anticoagulada con heparina sódica (50 UI/ml) y filtrada con filtros de 800 $\mu$ , 500 $\mu$  y 200 $\mu$  (Bone Marrow Collection Kits de Baxter, IL, USA). La médula ósea obtenida fue morfológicamente evaluada con determinaciones de viabilidad y ausencia de coágulos o porciones óseas. Se determinó como adecuada una celularidad superior a 0,04 $\times 10^8$ /kg.

**2. 3. 2. Ruta de administración.** La arteria y la vena femoral del miembro inferior comprometido fueron cateterizadas con introductores 6F y 7F respectivamente. La médula ósea no fraccionada, filtrada y fresca fue administrada en bolo, inmediatamente después de obtenida, a través del introductor arterial a una dosis de 120 ml. Previo a su administración, y con el objetivo de disminuir el retorno venoso, la vena ilíaca externa fue ocluida por debajo del origen la vena iliaca interna durante 20 minutos. La oclusión venosa fue realizada con un catéter balón de 7-10/20 mm (**Figura 1**).

### 2. 4. Parámetros evaluados

**2. 4. 1. Parámetros clínicos.** La evaluación clínica se realizó previo al procedimiento –basal–, y se la repitió durante el seguimiento a 1, 3, 6, 12 y 24 meses. Se evaluaron los estadios clínicos de acuerdo con la clasificación de Fontaine: se consideró mejoría en el seguimiento al cambio en 1 estadio; el dolor de reposo y su respuesta al tratamiento se evaluó de acuerdo con el consumo de analgésicos; y las lesiones tróficas se consideraron como: *mejor con cicatrización, igual sin cambios o peor con mayor extensión*.

**2. 4. 2. IT/B de reposo.** Fue obtenido previo al procedimiento y repetido en el seguimiento a 1, 3, 6, 12 y 24 meses. En los pacientes con más de una determinación durante el seguimiento, se calculó el promedio, considerado como el valor de seguimiento y de comparación con el basal.

**2. 4. 3. Angiografía con substracción digital.** Se realizó angiografía basal del miembro inferior comprometido previo a la administración de medula ósea, se determinó una distancia tubo-intensificador que se mantuvo constante en las angiografías de seguimiento a 1, 12 y 24 meses. Los parámetros evaluados en la angiografía basal incluyeron: cantidad de oclusiones y obstrucciones de más del 75%, circulación colateral asignándola como pobre o importante, y se determinó un *score* angiográfico basado en publicaciones previas.<sup>3</sup> Así, el *score* se determinó asignando valores a la presencia de obstrucciones y oclusiones en los diferentes segmentos arteriales: ilíaco, femoral, poplíteo y tibial. Un valor de 0 correspondió a obstrucciones menores del 50%, 1 a obstrucciones del 50-75%, 2 a obstrucciones del 75-99% y 3 a las oclusiones. En el seguimiento, se evaluó el hallazgo de arterias no visualizadas previamente y la magnitud de la circulación colateral, que fueron los parámetros considerados para determinar si la angiografía estaba *mejor, igual o peor*.

**2. 4. 4. Biopsia de piel.** Se llevó a cabo en el miembro inferior comprometido, en los primeros 10 pacientes. Las biopsias fueron obtenidas antes de la administración de la médula ósea y se repitieron a los 30 días del tratamiento. Se realizaron estudios histomorfológicos e inmunohistoquímicos. Para la determinación del CD31, los cortes histológicos de biopsias fueron montados en portaobjetos pretratados con 3-aminopropiltriétoxissilano (No A-3648 Sigma). Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti CD31 de Laboratorios DAKO (Cat. NO. N1596). Se reveló su lo-

calización a través de un anticuerpo secundario biotinilado y el complejo estreptoavidina-peroxidasa [Histostain®-SP (Peroxidase) Bulk Kits (Mouse)-Zymed CAT. NO. 85-6643B], utilizando 3,3' diaminobencidina (Liquid DAB-Plus Substrate Kit. Zymed CAT. NO. 00-2020) como cromógeno.

**2. 4. 5. Necesidad de amputación.** Se tuvo en cuenta la necesidad de amputación durante el seguimiento, considerándose como amputación menor cuando el nivel fue de falanges, metatarso o mitad del pie y amputación mayor a nivel suprapatelar.

## 2. 5. Tolerancia y seguridad

Los parámetros de tolerancia hemodinámica y clínica fueron evaluados durante el procedimiento de obtención y administración de médula ósea. Se tuvo en cuenta la presencia de nuevos síntomas o signos durante el procedimiento y la internación. Se realizó una angiografía previa a la administración de médula ósea y se repitió al finalizar el procedimiento, con el objetivo de evaluar la circulación arterial descartando embolismo o deterioro de la circulación. Se realizó análisis de laboratorio de rutina previo y 24 horas posterior a la administración de médula ósea. En el seguimiento se determinó la mortalidad y su causa.

## 2. 6. Análisis estadístico

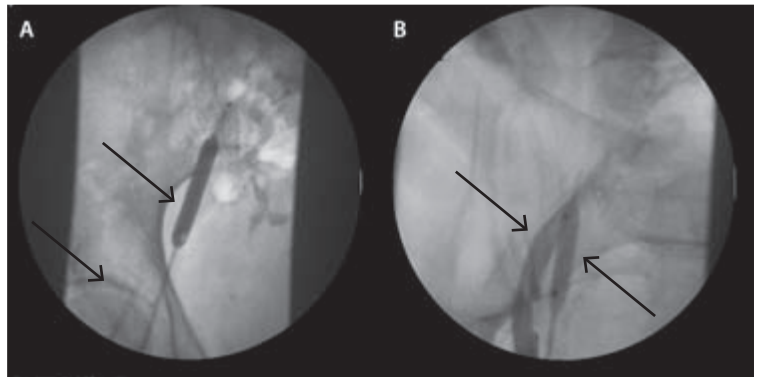
Se determinó media ( $\pm$  DE) y promedio. Se realizó la prueba de la  $t$  para muestras apareadas y ANOVA seguido por el test de Duncan para determinar diferencias en el porcentaje de mejoría entre los grupos. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativo.

## 3. RESULTADOS

De 54 pacientes evaluados, 34 pacientes cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión. La población tratada, los datos demográficos y características clínicas se presentan en **Tabla 1**. De acuerdo con los criterios clínicos de inclusión, los 34 pacientes fueron divididos en 2 grupos:

- **Grupo A:** 14 pacientes con isquemia crítica sin indicación de amputación mayor.
- **Grupo B:** 20 pacientes con isquemia crítica e indicación de amputación mayor.

Los datos demográficos y características clínicas por grupos se presentan en la **Tabla 2**.



**Figura 1. A.** Cateterización de la arteria y vena femorales con oclusión de la vena iliaca externa. **B.** Inyección de sustancia de contraste en la arteria iliaca y oclusión de la vena iliaca.

**TABLA 1.** Datos demográficos y características clínicas de la población general (34 pacientes).

Características	N (%)
Edad	64 $\pm$ 10
Sexo masculino	24 (70)
Diabetes	25 (73)
Insulina	6 (24)
HGO	19 (76)
Hipertensión arterial	30 (88)
Tabaquismo	19 (55)
Dislipidemia	27 (79)
Estadio Fontaine	
III	1 (3)
IV	33 (97)
Lesiones tróficas	34 (100)
Dolor de reposo	31 (91)
Índice tobillo/brazo reposo	0,44 $\pm$ 0,09
<b>Angiografía</b>	
Score angiográfico	10,5 $\pm$ 2,7
Cantidad de oclusiones	72
Cantidad de OS	35
Circulación colateral deficitaria	20 (58)
Tratamiento previo	
Bypass y/o ATP	11 (32)

**Bypass y/o ATP:** cirugía y/o angioplastia periférica con o sin stent. **HGO:** hipoglucemiantes orales. **OS:** obstrucciones significativas.

La población total tuvo un seguimiento medio 18 $\pm$ 13,5 meses. En 10/34 pacientes (29%) se realizó amputación mayor; la distribución por grupo fue de 1/14 pacientes del Grupo A y 9/20 pacientes del Grupo B. Los 24/34 pacientes restantes (70%) estuvieron libres de amputación mayor; la distribución por grupo fue de 13/14 pacientes del Grupo A y 11/20 pacientes del Grupo B.

### 3. 1. Pacientes con amputación mayor

Entre los 10 pacientes que la requirieron, la amputación mayor más temprana se realizó a los 23 días posteriores al procedimiento y la más tardía a los 6 meses. Los 10 pacientes pertenecían al estadio IV de la clasificación de Fontaine y solamente 1 paciente del grupo A mejoró a estadio III, pero fue amputado a los 6 meses del tratamiento por empeoramiento de las lesiones tróficas. De los 10 pacientes, 9 padecían dolor de reposo con mejoría solamente en 1 y los 10 tenían lesiones tróficas con mejoría en 2, persistiendo igual en 8 pacientes. El IT/B basal de 0,26 $\pm$ 0,10 mostró en el seguimiento un incremento no significativo a 0,28 $\pm$ 0,13 observándose un porcentaje de mejoría del 8%.

TABLA 2. Datos por grupo.		
	Grupo A - 14 pacientes N (%)	Grupo B - 20 pacientes N (%)
Edad	68±10	60±10
Sexo masculino	10 (71)	12 (60)
Diabetes	10 (71)	19 (95)
Insulina	2 (80)	6 (31)
HGO	8 (80)	13 (65)
Hipertensión arterial	11 (78)	18 (90)
Tabaquismo	9 (64)	8 (40)
Dislipidemia	9 (64)	17 (85)
Fontaine		
III	1 (7)	0
IV	13 (92)	18 (100)
Lesiones tróficas	14 (100)	18 (100)
Dolor de reposo	12 (85)	19 (95)
IT/B de reposo	0,50 ±0,10	0,42±0,18
<b>Angiografía</b>		
Score angiográfico	10±2,4	11±3
Oclusiones	42	52
OS	19	20
Déficit de CC	8 (57)	13 (65)

HGO: hipoglucemiantes orales. OS: obstrucciones significativas. CC: circulación colateral.

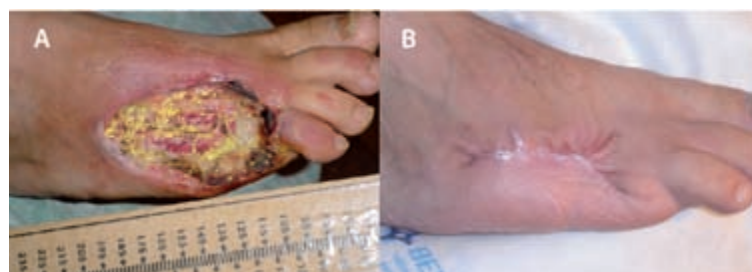


Figura 2. Paciente del grupo B. A. Úlcera isquémica en el dorso del pie basal. B. 12 meses de seguimiento, con cicatrización y amputación menor del 4to dedo.



Figura 3. Paciente del grupo B. A. Lesión de pie basal. B. 24 meses de seguimiento.

### 3. 2. Pacientes sin amputación mayor

**3. 2. 1. Estadios clasificación de Fontaine:** 12/13 pacientes del grupo A pertenecían a estadio basal IV, 1/13 pacientes a estadio basal III, y se

observó mejoría en 1 estadio en el 90% de los pacientes; en el grupo B los 11 pacientes pertenecían a estadio basal IV y se observó mejoría en 1 estadio en el 90% de los pacientes.

**3. 2. 2 Lesiones tróficas:** 13/13 pacientes del Grupo A y 11/11 pacientes del Grupo B presentaban úlceras isquémicas y/o necrosis de tejidos o dedos. En el seguimiento se observó mejoría de las lesiones con cicatrización en 11/13 pacientes del Grupo A (84%) y en 10/11 pacientes del Grupo B (90%). No se observó empeoramiento de las lesiones en ninguno de los pacientes. En todos los pacientes se indicó tratamiento con vasodilatadores, antiagregación plaquetaria, control estricto de la diabetes, curaciones locales de las lesiones y antibioticoterapia. En 6/24 pacientes se realizó debridación quirúrgica del tejido necrótico y amputación menor. En las Figuras 2, 3 y 4 se pueden observar ejemplos de la terapéutica utilizada.

**3. 2. 3. Dolor de reposo:** 12/13 pacientes del grupo A y 10/11 del grupo B presentaban dolor de reposo. En todos los pacientes se observaron mejorías con menor requerimiento de analgésicos y ausencia de dolor nocturno.

**3. 2. 4. IT/B de reposo.** En los 2 grupos se observó incremento significativo en el IT/B de seguimiento: en el Grupo A, de basal  $0,50 \pm 0,10$  a  $0,63 \pm 0,14$  ( $p < 0,05$ ), con un porcentaje de mejoría del 21%; y en el Grupo B, de basal  $0,57 \pm 0,07$  a  $0,71 \pm 0,13$  ( $p < 0,05$ ), con un porcentaje de mejoría del 20% (Figura 5).

**3. 2. 5. Angiografía con substracción digital.** La angiografía de seguimiento mostró mayor circulación colateral, nuevas arterias no visualizadas previamente e incremento de vasos pequeños (nube arterial) en 16/24 pacientes (66%); permaneció igual en 7/24 pacientes (29%), y en 1 paciente se observó empeoramiento de la circulación (4%) (Figuras 6 y 7).

**3. 2. 6. Biopsia de piel:** en las biopsias de piel obtenidas antes del procedimiento se observaron hallazgos histomorfológicos característicos de isquemia crónica con ausencia de vasculatura arterial. En las biopsias de seguimiento, a los 30 días, se observó un incremento en la microvasculatura (neoformación vascular) y células CD31+, indicativo de la presencia de células progenitoras endoteliales en los vasos neoformados (Figura 8).

### 3. 3. Seguridad y tolerancia

No se observaron cambios hemodinámicos significativos durante el procedimiento, y tampoco se presentaron nuevos síntomas o signos isquémicos. En la angiografía posterior a la ad-

ministración de médula ósea, no se observó deterioro de la circulación, trombosis o embolismo periférico. Los análisis de laboratorio posteriores a la administración de médula ósea no mostraron cambios con respecto al basal. El tiempo de internación fue de  $24 \pm 3$  horas. En el seguimiento se registró mortalidad en 4 pacientes (11%), relacionada con:

- Infarto agudo de miocardio en posoperatorio inmediato de amputación mayor.
- Paciente en diálisis crónica e infarto agudo de miocardio a los 6 meses del procedimiento.
- Insuficiencia cardíaca refractaria a 1 año y 6 meses del procedimiento.
- Shock séptico en posoperatorio inmediato de cirugía de revascularización coronaria a los 7 meses del procedimiento.

#### 4. DISCUSIÓN

Estudios preclínicos en animales pequeños han demostrado que la administración de factores de crecimiento vascular como aFGF, bFGF, VEGF y terapia con genes estimulan el crecimiento de vasos sanguíneos en el tejido isquémico.<sup>4</sup> Debido a la complejidad del proceso natural del desarrollo de vasos colaterales, la administración de un solo factor de crecimiento puede constituir un estímulo subóptimo para el desarrollo de vasos colaterales. Una estrategia basada en la administración de células adultas de la médula ósea parecería ser más lógica, ya que sus células progenitoras segregan múltiples factores de crecimiento vascular en tiempo y concentración adecuada. Basados en nuestra experiencia preclínica y clínica<sup>2,5,6</sup> de angiogénesis con MOANF, nos motivó para su uso como agente biológico en este ensayo clínico. MOANF significa que no se separan células y se administran todos los elementos celulares sin manipulación; el concepto subyacente es que, de esta forma, las células no pierden su potencia biológica.

Con respecto a la ruta de administración, publicaciones en pacientes con enfermedad arterial periférica sin opción de revascularización han demostrado seguridad y eficacia terapéutica con la administración intramuscular de células mononucleares CD34+.<sup>7-10</sup> A diferencia de la administración intramuscular, la ruta intraarterial directa aplicada en este ensayo clínico nos permitió administrar un volumen importante de médula ósea (120 ml). Su aplicación ha demostrado ser una ruta de adminis-



Figura 4. Paciente del grupo B. A. Úlcera y necrosis. B. 12 meses de seguimiento.

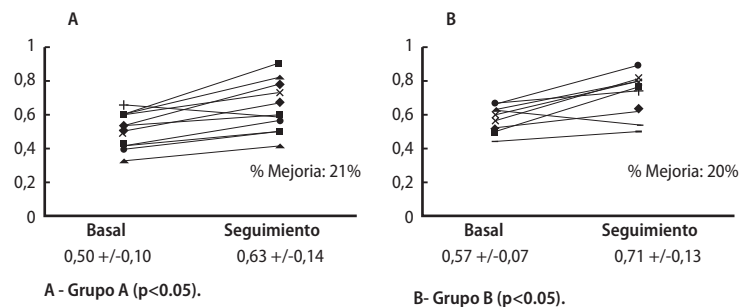


Figura 5. IT/B basal y seguimiento. A. Grupo A ( $p < 0,05$ ). B. Grupo B ( $p < 0,05$ ).

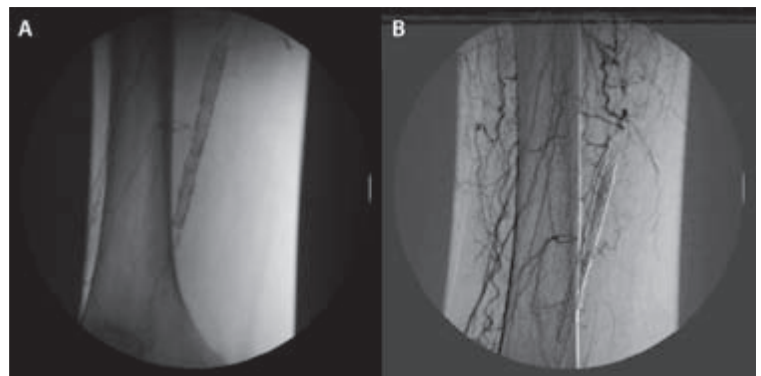


Figura 6. A. Angiografía basal. B. Angiografía a los 3 meses seguimiento, que muestra incremento de la circulación colateral y nuevos vasos.

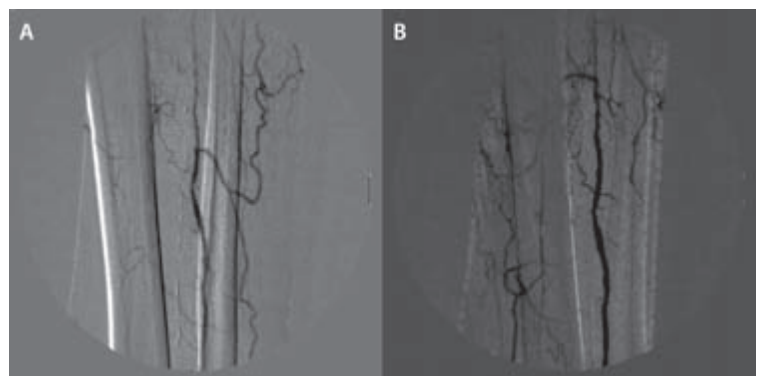
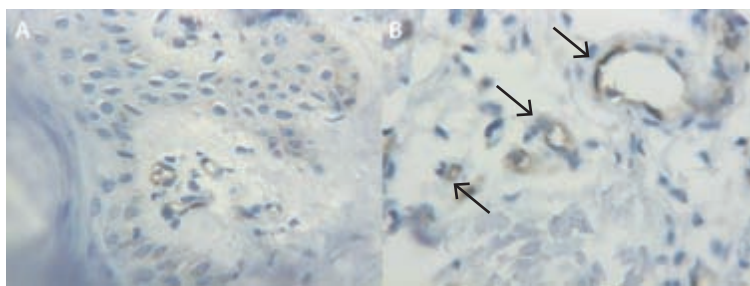


Figura 7. A. Angiografía basal. B. Angiografía a los 12 meses seguimiento, que muestra incremento de la circulación colateral.



**Figura 8.** Biopsia de piel: histomorfología y estudio inmunohistoquímico. **A.** Previo al tratamiento, muestra ausencia de capilares. **B.** 30 días después de la administración de médula ósea, muestra neoformación vascular y células CD31+ (flechas, color marrón) (40X).

tración tolerable y sin efectos colaterales sobre la circulación arterial. La oclusión transitoria del retorno venoso se realizó con el objetivo de evitar un pasaje y lavado rápido de las células de la médula, para que permanezcan más tiempo en contacto con la circulación periférica y que lleguen al territorio isquémico, sabiendo que la población tratada presenta múltiples obstrucciones y oclusiones arteriales. La oclusión de la vena ilíaca externa fue realizada teniendo en cuenta que el 70% del retorno venoso ocurre a través del sistema venoso profundo.

Las opciones terapéuticas en isquemia crítica crónica incluyen la revascularización quirúrgica, la terapia endovascular y la amputación primaria. La población con isquemia crítica tratada no tenía opción de revascularización, y 20/34 pacientes tenían indicación de amputación mayor primaria por el Servicio de Cirugía Vascular. En pacientes con isquemia crítica la no opción de revascularización convencional incrementa aún más el riesgo de amputación mayor. Por lo tanto, la población tratada fue de alto riesgo de amputación mayor; ésta se realizó solamente en 10 pacientes (29%) y casi exclusivamente en aquellos del grupo B (9/20 pacientes), grupo que tenía, además, indicación de amputación mayor por el Servicio de Cirugía Vascular previo al tratamiento propuesto. Se destaca que la amputación mayor fue evitada en el resto los pacientes del grupo B: 11/20 (57%). Solamente 1 paciente del grupo A (sin indicación de amputación) fue amputado a los 6 meses del tratamiento por empeoramiento de las lesiones tróficas.

Del análisis de los datos demográficos y características clínicas de los pacientes incluidos, el 32% tenía procedimientos previos de angioplastia y/o cirugía no exitosos, IT/B de reposo de  $0,44 \pm 0,09$  y angiografía con alta incidencia de obstrucciones y oclusiones, con un *score* de angiográfico de  $10,5 \pm 2$ . La mayoría de los pacientes pertenecían al estadio IV de la clasificación de Fontaine (97%), dolor de reposo (91%) y lesiones tróficas (100%). Dada la alta incidencia de pacientes diabéticos (73%), se reconoce que el riesgo de amputación mayor en pacientes no diabéticos con claudicación es del 2% y se incrementa 3 veces en pacientes diabéticos con cuadro clínico de isquemia crítica.<sup>11</sup>

Del análisis de los pacientes sin amputación, 24/34 pacientes con seguimiento de  $18 \pm 13$  meses, se observó una respuesta positiva en los parámetros clínicos con mejoría en el estadio de clasificación de Fontaine y del dolor de reposo. También se incrementó con diferencias estadísticas significativas en el índice T/B, hallazgos que pueden ser interpretados como un incremento de la circulación arterial a nivel distal.

En relación con las lesiones tróficas, es reconocido que la evolución de las úlceras isquémicas y la regeneración de tejido depende del aporte de oxígeno, nutrientes y mediadores solubles que son necesarios para una cicatrización adecuada.<sup>12</sup> También hay que tener en cuenta que

el flujo necesario para mantener la integridad de los tejidos es menor que para obtener una cicatrización. En respuesta a las lesiones tróficas al procedimiento, se evidenció cicatrización en 11/13 pacientes del Grupo A (84%) y en 10/11 pacientes del Grupo B (90%). Se postula que el procedimiento propuesto mejoraría la perfusión tisular y la circulación arterial a través del desarrollo de vasos colaterales, permitiendo una cicatrización óptima de las lesiones.

La angiografía con substracción digital presenta algunas limitaciones, no se realizó una evaluación de los angiogramas por un laboratorio de excelencia independiente y si bien se mantuvo una distancia tubo/intensificador constante, la fuerza de inyección del contraste puede variar de estudio a estudio con hallazgos diferentes en los vasos observados o en la circulación colateral. Teniendo en cuenta estas limitaciones, se evidenció un incremento en la circulación colateral y nuevos vasos colaterales fueron observados en 16/24 pacientes (66%).

En la biopsia de piel a los 30 días se observó un incremento en la microvasculatura, neoformación vascular (angiogénesis) e inmunohistoquímica de CD31+ indicativo de la presencia de células progenitoras endoteliales. Estos hallazgos pueden ser considerados como un efecto biológico positivo de las células de la médula ósea administrada.

No se observaron cambios significativos en los parámetros de tolerancia y seguridad durante la obtención y administración de la medula ósea, siendo un procedimiento de bajo riesgo y corta internación.

En el seguimiento se observó un 11% ( $n=4$ ) de mortalidad, todas estas relacionadas a eventos cardiovasculares. Es reconocido que la enfermedad cardiovascular es la causa mayor de mortalidad en pacientes con enfermedad arterial periférica. La frecuencia anual de eventos cardiovasculares como infarto de miocardio, accidente cerebro vascular o muerte es del 5-7% (13) y se incrementa aun más en pacientes diabéticos (14) y con cuadro clínico de isquemia crítica presentando una mortalidad del 25% en el primer año (15).

La importancia de poder haber evitado una amputación mayor en el 57% de los pacientes que tenían indicación de amputación, surge del hecho que menos del 50% de los amputados tienen movilidad, menos del 25% logran movilidad con prótesis y menos del 50% están vivos a los 2-3 años.

## 5. CONCLUSIÓN

Los pacientes con isquemia crítica de los miembros inferiores sin opción de revascularización, la administración de MOANF vía intra-arterial directa con oclusión transitoria del retorno venoso, es procedimiento seguro y tolerable. El tratamiento propuesto muestra una eficacia terapéutica potencial determinada por la cicatrización de lesiones tróficas y control de dolor de reposo y un resultado clínico positivo con reducción en la necesidad de amputación mayor.

## ABSTRACT

### Intra-arterial administration of autologous bone marrow in patients with critical lower limb ischemia. Phase I

Clinical trial tested intra-arterial administration of Unfractionated Autologous Bone Marrow (UABM) in patients suffering from critical limb ischemia without option of revascularization. The end point was: to assess feasibility, safety and tolerance of the procedure.

**Material and methods.** 120 ml of ABUM was intra-arterially administered in the inferior compromised limb. Clinical parameters (Fontaine stage, rest pain, trophic lesions) and ankle-brachial index (A/BI) were evaluated baseline and follow-up (1, 3, 6, 12 and 24 months). Angio-

graphy was performed baseline and follow-up (1, 12 and 24 months). Skin biopsy was carried out baseline and 30 days after.

**Results.** 34/54 patients fulfilled the inclusion/exclusion criteria. 10/34 patients (29%) needed major amputation, no significant improvement was observed in the clinical parameters, A/BI and angiography. 24/34 patients (47%) not major amputation was necessary, with a follow-up of 18±13,5 months. Significant improvement was observed in the clinical parameters, A/BI and angiography. Skin biopsy disclosed vascular neof ormation with CD31+ cells. No side effects were observed in safety and tolerance parameters. Mortality related to cardiovascular events was recorded in 4 patients (9%).

**Conclusions.** Intra-arterial administration of UABM might constitute a feasible, well-tolerated and safe procedure in patients suffering from critical limb ischemia without option of revascularization. Although the number of patients is low, the procedure shows potential therapeutic efficacy, which warrants further studies with a larger number of patients.

**Key words:** critical limb ischemia, angiogenesis, unfractionated autologous bone marrow.

**Conflictos de intereses:** no existen.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Sigvant B, Wiberg-Hedman K, Bergqvist D. A population-based study of peripheral arterial disease prevalence with special focus on critical limb ischemia and sex differences. *J Vasc Surg* 2007; 45(6):1185-1191.
2. Vicario J, Piva J, Pierini A. Transcoronary sinus delivery of autologous bone marrow and angiogenesis in pig models with myocardial injury. *Cardiovasc Radiat Med* 2002;3(2):91-94.
3. Faglia E, Favales F, Quarantiello A. Angiographic evaluation of peripheral arterial occlusive disease and its role as a prognostic determinant for major amputation in diabetic subjects with foot ulcers. *Diabetes Care* 1998;21(4):625-630.
4. Isner M, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for neovascularization. *J Clin Invest* 1999;103:1231-1236.
5. Vicario J, Campo C, Piva J. One-year follow-up of transcoronary sinus administration of autologous bone marrow in patients with chronic refractory angina. *Cardiovasc Revasc Med* 2005;6(3):99-107.
6. Vicario J, Campos C, Piva J. Transcoronary sinus administration of autologous bone marrow in patients with chronic refractory stable angina Phase I. *Cardiovasc Radiat Med* 2004;5(2):71-76.
7. Kawamura A, Horie T, Tsuda I. Prevention of limb amputation in patients with limbs ulcers by autologous peripheral blood mononuclear cell implantation. *Ther Apher Dial* 2005;9(1):59-63.
8. Gu Y, Zhang J, Qi L. A clinical study on implantation of autologous bone marrow mononuclear cells after bone marrow stimulation for treatment of lower limb ischemia. *Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Zhi* 2006;20(10):1017-1020.
9. Lazarous DF, Unger EF, Epstein SE. Basic fibroblast growth factor in patients with intermittent claudication: results of a phase I trial. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36:1239-1244.
10. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *The Lancet* 2002;360(9331):427-435.
11. Kannel WB, Skinner JJ Jr, Schwartz MJ, Shurtleff D. Intermittent claudication: incidence in the Framingham Study. *Circulation* 1970;41:875-883.
12. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999;341:738-746.
13. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzler NR, et al. ACC/AHA 2005 guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): executive summary a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients with Peripheral Arterial Disease) endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:1239-1312.
14. Kapelrud H. Lower-limb amputations and diabetes. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2006;126(17):2261-2263.
15. Weitz JJ, Byrne J, et al. Diagnosis and treatment of chronic arterial insufficiency of the lower extremities: a critical review. *Circulation* 1996;94:3026-3049.