



Universidad de Sevilla

Departamento de Fisiología Médica y Biofísica

**MEDICAMENTO CELULAR COMO ALTERNATIVA
TERAPÉUTICA EN LA ISQUEMIA CRÓNICA CRÍTICA DE
MIEMBROS INFERIORES EN PACIENTES DIABÉTICOS SIN
POSIBILIDADES DE REVASCULARIZACIÓN**

Memoria de Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor

Autora:

Natalia Escacena
Acosta

Tutor:

Dr. Antonio Castellano

Directores:

Dr. Bernat Soria Escoms
Dr. Abdelkrim Hmadcha

Sevilla, 2016



Dr. **Bernat Soria Escoms**, Director del Departamento de Células Troncales del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), y Dr. **Abdelkrim Hmadcha**, Investigador del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER),

CERTIFICAN QUE:

El trabajo de investigación presentado por Doña **Natalia Escacena Acosta** titulado *“Medicamento celular como alternativa terapéutica en la isquemia crónica crítica de miembros inferiores en pacientes diabéticos sin posibilidades de revascularización”* ha sido realizado bajo su supervisión y dirección en el Departamento de Células Troncales de CABIMER, y reúne los requisitos de originalidad y calidad científica necesarios para ser defendido ante un tribunal con el fin de optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste y a efectos oportunos, firman el presente informe en Sevilla a 30 de Septiembre de 2015.

VºBº de los directores del trabajo.

Dr. Bernat Soria Escoms

Dr. Abdelkrim Hmadcha

LISTADO DE PUBLICACIONES

- ❖ Escacena N, Quesada-Hernández E, Capilla-González V, Soria B, Hmadcha A. *Bottlenecks in the efficient use of advanced therapy medicinal products based on mesenchymal stromal cell*. Stem Cells Int. vol. 2015 p. 895714.

- ❖ Lachaud CC, Soria F, Escacena N, Quesada-Hernández E, Hmadcha A, Alió J, Soria B. *Mesothelial cells: a cellular surrogate for tissue engineering of corneal endothelium*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014 Aug; 55(9):5967-78.

- ❖ Acosta L, Hmadcha A, Escacena N, Pérez-Camacho I, de la Cuesta A, Ruiz-Salmeron R, Gauthier BR, Soria B. *Adipose mesenchymal stromal cells isolated from type 2 diabetic patients display reduced fibrinolytic activity*. Diabetes. 2013 Dec;62(12):4266-9.

FINANCIADO POR:

El trabajo de investigación que dio como resultado esta memoria de tesis ha sido en parte financiado por fondos de investigación captados en convocatorias competitivas:

- Proyecto de Excelencia de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía con referencia CTS-6505; Proyecto INNPACTO del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) con referencia INP-2011-1615-900000, ambos cofinanciados con Fondos FEDER de la Comisión Europea.
- Red de Terapia Celular (TerCel) con referencias RD06/0010/0025 y RD12/0019/0028 y proyectos FIS PI10/00964 y PI14/01015, ambos financiados por el Ministerio de Salud y Consumo y Fondos FEDER de la Comisión Europea.
- Financiación específica para Ensayos Clínicos dentro del programa de Terapias Avanzadas del Ministerio de Sanidad, Igualdad y Bienestar Social, Instituto de Salud Carlos III con referencia TRA 120.
- Proyecto BIOREG del Programa SUDOE de la Comisión Europea (Red de Medicina Regenerativa-SOE3/P1/E750) y ACTION COST de la Comisión Europea (Cooperación Europea en Ciencia y Tecnología-BM1305). El apoyo de la Fundación SED (FSED) y de la Fundación Andaluza de Investigación y Desarrollo (FAIS) permitió el acceso a los bancos de datos.
- El Centro de Investigación en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) es una iniciativa del Instituto de Salud Carlos III.

Las actividades investigadoras del grupo al cual está adscrita la doctoranda se encuentran gestionadas por la Fundación Progreso y Salud, Consejería de Salud, Junta de Andalucía.

A Bruno
A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Lo que comenzó siendo una posibilidad, ha acabado convirtiéndose en una realidad. Después de tantas horas, días y meses, es el momento de expresar mi gratitud a todas aquellas personas que han contribuido, de una manera u otra a que este proyecto se convierta en una tesis.

Mi primer reconocimiento es, sin duda, hacia los pacientes que se han prestado a este ensayo. Gracias por colaborar, por acudir a las citas programadas y sobre todo por depositar vuestras esperanzas en este proyecto.

Agradecer a mis directores de tesis la confianza que han depositado en mí y la oportunidad que me brindaron al dejarme formar parte de su equipo. Junto al Dr. Bernat Soria he aprendido “a saber qué es lo que quiero ser de mayor” y a pelear por ello. Para Karim tengo un “gracias” gigante por llevarme de la mano hasta el final, por apostar por mí y sobre todo, por ser mi amigo.

También quiero dar las gracias a mi tutor, el Dr. Antonio Castellano, por meterse en estos líos.

Gracias a la Unidad de Pie Diabético de San Lázaro; a la Dra. Pérez Camacho por facilitarme el acceso a la información y por su disponibilidad y al Dr. De la Cuesta por su implicación en el proyecto.

Mi primera etapa en CABIMER fue en la Unidad de Producción de Medicamentos celulares (sala GMP), donde aprendí casi todo lo que sé sobre terapia celular. He tenido la suerte de formar parte de la primera unidad GMP acreditada en Andalucía. Patricia, David, Nati, Maivi, Vicky, María B. y María G; éste trabajo es también el vuestro.

En el laboratorio CT5 he pasado muchas horas, y gracias a los grandes profesionales que lo forman, he conseguido disfrutar trabajando. Tengo mucho que agradecerles a Yolanda, Nuria, Christian, Lourdes, Ángela, Inés, Daniela, Javi, Inma, Virginia, Vivian y Esther. A unos por su paciencia, a otros por sus consejos y correcciones, a todos por las risas y el buen ambiente.

Gracias a los compañeros de CABIMER. A Arturo por solucionar todos los temas informáticos, a M^o José por esas horas de citómetro y por su cariño. A Mónica por preguntar todos los días por Bruno sin olvidar ninguno. A todos por el gran trabajo que hacéis día tras día.

Es increíble la capacidad que poseen ciertas personas para tolerar, atravesar o soportar una determinada situación sin experimentar nerviosismo ni perder la calma. Me refiero a “mis otros pacientes”, aquellos que me han demostrado tener una paciencia infinita soportando mis preguntas, mis dudas, mis días malos y mis agobios. Gracias a todas y todos los que me habéis aguantado en esta etapa. Sé que no ha sido fácil.

Siempre he procurado rodearme de buena gente, y he tenido la gran suerte de encontrarme en este camino con muchas personas que me han aportado grandes cosas. Han conseguido enseñarme algo nuevo cada día, me han arrancado una sonrisa hasta en los días más duros, y han logrado que todo lo que he hecho y sigo haciendo cobre sentido. No pondré nombres para no olvidarme de ninguno. A todos vosotros, mil gracias.

Y ahora toca hacer lo propio con los que me rodean. Gracias a la familia Navacerrada, a los de aquí y a los que están lejos. Gracias por hacerme sentir una más del clan. Gracias María por ser mi amiga y estar ahí siempre. Gracias Ali por tantos años de risas y por nuestra etapa de mamis que estamos disfrutando a la vez. Gracias Papá por estar ahí, por preocuparte por nosotros, por volcarte en tu nieto como lo estás haciendo. Mariano, muchas gracias por quererme tanto y apoyarme de esa forma tan incondicional. Gracias mami, tendría que escribir una tesis sólo para darte las gracias. Eres la mejor. Éder, gracias por tantos años y sobre todo por haberme dado lo mejor que tengo.

GRACIAS BRUNO, por esa sonrisa maravillosa, por hacerme ver qué es lo verdaderamente importante, por esas tardes agotadoras pero tan llenas de cosas bonitas. Gracias por todo lo que nos queda por disfrutar juntos.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. DIABETES MELLITUS	5
1.1.1. DEFINICIÓN, CLASIFICACIÓN Y DIAGNÓSTICO	6
1.1.2. COMPLICACIONES ASOCIADAS A LA DIABETES.....	9
1.1.3. COMPLICACIONES VASCULARES DE LA DIABETES.....	10
1.2. ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA E ISQUEMIA CRÓNICA CRÍTICA EN MIEMBROS INFERIORES.....	19
1.2.1. DEFINICIÓN Y CONCEPTO	19
1.2.2. ISQUEMIA CRÓNICA CRÍTICA EN PACIENTES DIABÉTICOS	20
1.2.3. PREVALENCIA, INCIDENCIA Y PRONÓSTICO.....	21
1.2.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	23
1.2.5. FACTORES DE RIESGO	24
1.2.6. DIAGNÓSTICO.....	26
1.2.7. POSIBILIDADES ACTUALES DE TRATAMIENTO	29
1.3. TERAPIA CELULAR COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA	31
1.3.1. TERAPIA CELULAR EN LA ISQUEMIA CRÓNICA CRÍTICA DEL MIEMBRO INFERIOR	36
1.3.2. USO DE LAS MSCs COMO MEDICAMENTO CELULAR.....	40
1.3.3. ANTECEDENTES PRECLÍNICOS	46
1.3.4. ANTECEDENTES CLÍNICOS	47
1.3.5. TERAPIA CELULAR EN LA ISQUEMIA CRÓNICA CRÍTICA: NUESTRA EXPERIENCIA	51
1.3.6. RIESGOS POTENCIALES EN EL USO CLÍNICO DE LAS MSCs.....	55
II. OBJETIVOS	61
III. PACIENTES Y METODOLOGÍA	65
3.1. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO	67
3.2. MEDICAMENTO EN INVESTIGACIÓN	72
3.3. EVALUACIÓN DE LA FACTIBILIDAD.....	84
3.4. EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD.....	84
3.5. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA	86
3.5.1. EVALUACIÓN DE LA NEOVASCULARIZACIÓN MEDIANTE CUANTIFICACIÓN ANGIOGRÁFICA ...	86
3.5.2. VARIABLES SECUNDARIAS.....	88
3.5.3. SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD	90
3.6. INVESTIGACIÓN DE LA REACCIÓN ADVERSA	92
3.6.1. ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	92
3.6.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR	92
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	93

IV. RESULTADOS.....	95
4.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA	97
4.2. PRODUCCIÓN DEL MEDICAMENTO CELULAR	100
4.3. FACTIBILIDAD DEL TRATAMIENTO CON AdMSCs AUTÓLOGAS	103
4.4. SEGURIDAD RELACIONADA CON EL TRATAMIENTO CON AdMSCs AUTÓLOGAS...	103
4.5. RESULTADOS DE EFICACIA.....	106
4.5.1. EVALUACIÓN DE NEOVASCULARIZACIÓN.....	106
4.5.2. VARIABLES SECUNDARIAS.....	112
4.5.3. SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD	117
4.6. INVESTIGACIÓN DE LA REACCIÓN ADVERSA	124
V. DISCUSIÓN.....	131
VI. PERSPECTIVAS FUTURAS	149
VII. CONCLUSIONES.....	153
VIII. BIBLIOGRAFÍA	157

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AA	Acontecimiento Adverso
AAG	Acontecimiento Adverso Grave
ADA	Asociación Americana de Diabetes (<i>American Diabetes Association</i>)
AdMSCs	Células troncales mesenquimales de tejido adiposo (<i>Adipose Mesenchymal stem cells</i>)
ADO	Antidiabéticos orales
AGEs	Productos finales de la glicosilación avanzada (<i>Advanced Glycation End Products</i>)
BM-MNCs	Células mononucleadas de la médula ósea (<i>Bone Marrow-mononuclear cells</i>)
BP	Puntos de ramificación (<i>branch points</i>)
CABIMER	Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa
CLI	Isquemia crítica de miembros inferiores (<i>Critical Limb ischemia</i>)
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DSA	Angiografía de sustracción digital (<i>Digital subtraction angiography</i>)
EAP	Enfermedad arterial periférica
ECs	Células endoteliales (<i>Endothelial cells</i>)
ECV	Enfermedad cerebrovascular
EPCs	Células progenitoras endoteliales (<i>Endothelial progenitor cells</i>)
ESCs	Células troncales embrionarias (<i>Embryonic Stem Cells</i>)
FBS	Suero fetal bovino (<i>Fetal bovine serum</i>)
FID	Federación Internacional de Diabetes
GNE	Glicación no enzimática de proteínas
HSCs	Células troncales hematopoyéticas
HTA	Hipertensión arterial
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (<i>high density lipoproteins</i>)
iPSCs	Células pluripotentes inducidas (<i>induced pluripotent stem cells</i>)
ITB	Índice tobillo-brazo
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (<i>low density lipoproteins</i>)
MO	Médula ósea
MSCs	Células troncales mesenquimales (<i>mesenchymal stem cells</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido Nítrico
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1 (<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>)
RI	Resistencia a la insulina
S	Segmentos (<i>segments</i>)
TNFα	Factor tumoral de necrosis alfa (<i>tumoral necrosis factor</i>)

tPA	Activador del plasminógeno tisular (<i>tissue plasminogen activator</i>)
TTA	Área total del vaso (<i>total tube area</i>)
TTL	Longitud total del vaso (<i>total tube length</i>)
tcpO₂	Presión transcutánea de oxígeno (<i>transcutaneous oxygen tension</i>)
UAPC	Unidad de Apoyo de Producción Celular
UCF-F	Unidades formadoras de colonias de fibroblastos
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (<i>vascular endothelial growth factor</i>)

I. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es la enfermedad metabólica más común, y comprende una variedad de síndromes con distintas causas que afectan colectivamente a un 8.3% de la población mundial (1). Lleva asociada una serie de complicaciones (ceguera, enfermedad renal, enfermedad cardiovascular, trastornos tróficos en el pie), y está considerada como el principal factor de riesgo para la isquemia crónica crítica del miembro inferior (CLI; del inglés *critical limb ischemia*), la cual es una de las manifestaciones más severas de aterosclerosis en nuestro organismo. La CLI se define como el cuadro caracterizado por dolor crónico en reposo, úlceras o gangrena atribuibles a enfermedad arterial oclusiva comprobada (2), suponiendo el final del proceso de aterosclerosis y que puede conllevar la amputación del miembro e incluso la muerte si no se consigue una rápida y eficaz revascularización.

En el paciente diabético, la isquemia de la pierna se desarrolla más precozmente y con mayor intensidad. Se estima que un 15% de los pacientes diabéticos desarrollarán CLI, y en la mayoría de los casos, conllevará la amputación. Las lesiones arteriales suelen afectar a los vasos más distales (3). Esta localización de las lesiones dificulta su revascularización, quirúrgica o endovascular. Por otro lado, también la presentación del cuadro en el paciente diabético es diferente, al conllevar un mayor componente de pérdida tisular y gangrena, y menor manifestación clínica de dolor debido a la neuropatía diabética frecuentemente asociada. Además, los pacientes diabéticos en concreto tienen disminuidos los mecanismos fisiológicos de angiogénesis y reendotelización, por lo que el curso de la enfermedad es más severo y acelerado.

El objetivo principal del tratamiento actual de CLI es la revascularización, bien quirúrgica o endovascular (4). Sin embargo, en una gran proporción de estos pacientes, la extensión anatómica y la distribución de la enfermedad oclusiva arterial hacen que sean candidatos poco aptos a la revascularización, y que la enfermedad siga su inexorable curso hacia la amputación y la muerte. El tratamiento farmacológico como única alternativa para estos pacientes sin posibilidades de revascularización, no ha demostrado que afecte favorablemente el curso de CLI (5,6). De hecho, en la actualidad se recomienda habitualmente para

estos pacientes la amputación como única opción, a pesar de su evidente implicación disfuncional, junto con su conocida morbi-mortalidad asociada (7,8). Por todo ello, es evidente que se necesitan nuevas alternativas eficaces para el tratamiento de una alta proporción de pacientes con CLI.

La angiogénesis terapéutica es una de las estrategias utilizadas últimamente para la proliferación de los vasos colaterales. Se han descrito numerosas moléculas angiogénicas, tanto en modelos animales como en humanos con enfermedades isquémicas (9–13). En este contexto, la posibilidad de terapia de regeneración celular, con sus demostradas propiedades de angiogénesis y cicatrización de úlceras cutáneas, puede tener un máximo interés. Es por ello que la utilización de las células troncales mesenquimales (MSCs; del inglés *mesenchymal stem cells*) está tomando gran importancia a la hora de utilizar terapia celular para la regeneración vascular en enfermedades isquémicas. Las MSCs de tejido adiposo (AdMSCs; del inglés *adipose mesenchymal stem cells*) secretan múltiples factores de crecimiento angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF; del inglés *vascular endothelial growth factor*), a niveles bioactivos (14,15). Por otra parte, el efecto antiinflamatorio, inmunomodulador y la capacidad de diferenciación de estas células ha demostrado resolver casos puntuales para los que hasta ahora no teníamos una oferta terapéutica mejor. Por este motivo, estas células pueden ser una alternativa factible a la hora de revascularizar una isquemia en miembros inferiores, por lo que es necesario llevar a cabo ensayos clínicos piloto muy bien controlados para evaluar su eficacia, seguridad y factibilidad además de seguir potenciando la investigación básica y traslacional de calidad en busca de opciones para estos pacientes.

1.1. DIABETES MELLITUS

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad sistémica, crónico-degenerativa y de carácter heterogéneo. Está considerada como uno de los principales problemas socio-sanitarios a nivel mundial debido a su alta prevalencia, su elevado coste sanitario y el número de muertes prematuras que provoca. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2012 había más de 347 millones de personas con diabetes en el mundo y será la séptima causa de mortalidad en el 2030. Está considerada una epidemia global, debido al actual estilo de vida y al envejecimiento de la población (*Figura 1*).

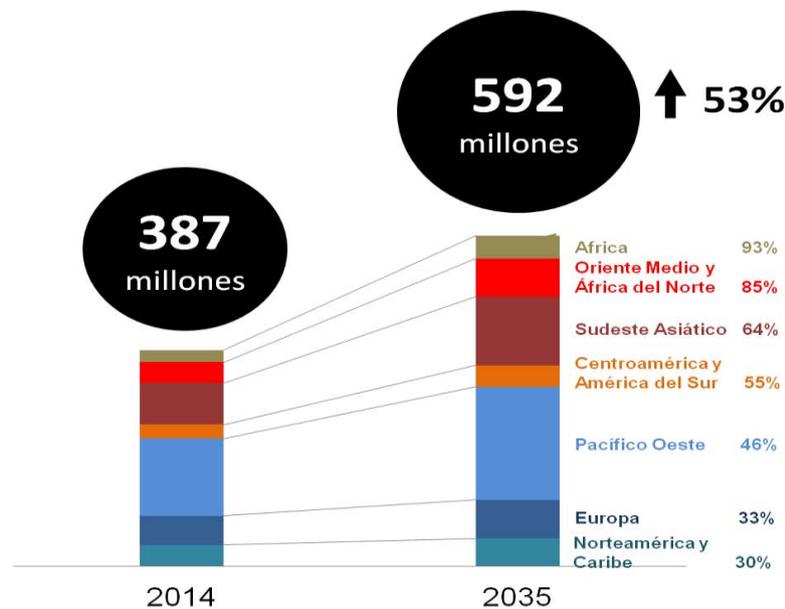


Figura 1: Estimación de la DM según la Federación Internacional de Diabetes (FID). Los porcentajes indican el aumento estimado que se producirá en las distintas áreas geográficas. Fuente: Atlas de Diabetes 5ª Ed (1).

En España, según el estudio di@bet.es realizado desde el centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas asociadas (CIBERDEM), el Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación), en colaboración con la Sociedad Española de Diabetes (SED) y la Federación Española de Diabetes (FED), la prevalencia total de DM tipo 2 (DM2) en la población de 18 a 75 años es del 13.8% (16), mientras que un porcentaje similar

tiene intolerancia a la glucosa. Es decir, aproximadamente 3,5 millones de personas padecen diabetes y otro tanto cursan con prediabetes.

1.1.1. DEFINICIÓN, CLASIFICACIÓN Y DIAGNÓSTICO

Desde el punto de vista clínico, la DM está considerada como un conjunto de trastornos metabólicos (17). La causa se debe a una disminución en la secreción de insulina endógena, un defecto en la acción de la misma en los tejidos que de ella dependen, o a ambos, lo que conduce a un síndrome caracterizado por hiperglucemia crónica y alteraciones del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos.

Etiológicamente, la DM se clasifica en 4 categorías principales: DM tipo 1, DM tipo 2, diabetes gestacional y otros tipos de diabetes (18):

1. Diabetes tipo 1 (DM1) (anteriormente insulino dependiente o juvenil): se caracteriza por una ausencia de síntesis de insulina. A su vez, podemos dividirla en dos subtipos:

a) autoinmune: causada por la destrucción autoinmune de las células β del páncreas mediada por linfocitos T activados (19). Representa la mayoría de los casos de DM1. Aunque los factores de riesgo no se encuentran bien definidos, se sabe que están implicados en su aparición factores de tipo ambiental, genético y autoinmune.

b) idiopática: de causa desconocida, aunque con gran asociación del factor hereditario. Con mayor afectación en personas de origen africano y asiático (20).

2. Diabetes tipo 2 (DM2) (anteriormente diabetes no insulino dependiente o del adulto). Es la forma más común de diabetes, representando entre el 80% y el 90% de todos los casos de DM y se caracteriza por la incapacidad del cuerpo para utilizar eficazmente la insulina, además de una producción deficitaria de dicha hormona. Suele manifestarse a partir de los 45 años. La obesidad está presente en el 80% de los pacientes.

3. *Diabetes gestacional*: Ocurre en el 2-5% de todos los embarazos. Comienza o se diagnostica por primera vez en el embarazo. Estas mujeres tienen a corto, medio o largo plazo, mayor riesgo de desarrollar DM2.

4. *Otros tipos específicos de diabetes*: Se compone de diferentes formas de diabetes e incluye:

- defectos genéticos en la función de la célula β (MODY, *maturity onset diabetes of the Young*, aunque actualmente se prefiere el término diabetes monogénicas) o en la acción de la insulina
- enfermedades del páncreas exocrino
- endocrinopatías
- inducida por tóxicos, agentes químicos o infecciones
- formas no comunes de diabetes inmunomediadas
- otros síndromes genéticos asociados ocasionalmente con diabetes
- diabetes post-trasplante debida a la acción tóxica de los inmunosupresores sobre la célula β pancreática.

En cuanto al diagnóstico (17), la FID, la OMS y la Asociación Americana de la Diabetes (ADA, del inglés *American Diabetes Association*) proponen una serie de criterios para diagnosticar la DM, los cuales se recogen en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Criterios diagnósticos de la DM según la FID, OMS y ADA

Prueba	Medición	Diagnóstico de diabetes
HbA1c	Vida media de glucosa en sangre durante los últimos 2-3 meses	$\geq 6.5\%$
Glucosa plasmática en ayunas	Nivel de glucosa en sangre en ayunas	≥ 126 mg/dl
Tolerancia oral a la glucosa	Nivel de glucosa en sangre antes y 2 horas después de beber compuesto azucarado.	≥ 200 mg/dl a las 2 horas
Glucosa plasmática al azar	Nivel de glucosa en cualquier momento	≥ 200 mg/dl

HbA1c: hemoglobina glicosilada

Asimismo, existen personas con una alteración en los niveles de glucosa que no son lo suficientemente altos como para ser diagnosticados como diabetes. Este trastorno se ha denominado “*prediabetes*” y ha sido definido según la OMS y la FID por:

- HbA1c entre 5.7% y 6.4%
- Glucosa en sangre en ayunas: entre 110-125mg/dl
- Glucosa en sangre a las 2 horas: entre 140-199 mg/dl

Estas personas comparten muchas de las características de la DM2, como son la obesidad, sedentarismo, edad avanzada y la incapacidad del cuerpo para utilizar la insulina que produce (lo que se conoce como resistencia a la insulina). Existen evidencias que apuntan que los cambios en el estilo de vida son eficaces para prevenir la progresión hacia la diabetes (21). Es por ello por lo que se recomienda practicar los tests diagnósticos en aquellas situaciones que supongan un riesgo de debutar con esta enfermedad (18). El objetivo es que de esta manera, los profesionales médicos puedan identificar tempranamente a los pacientes con diabetes, teniendo así mayor posibilidad de prevenir las complicaciones a largo plazo. Por tanto, los individuos de 45 años o más deben ser evaluados por si presentan algún síntoma característico de la diabetes. Si los resultados son normales, estos individuos deberían ser reevaluados a los 3 años. Sin embargo, la evaluación de la diabetes debe hacerse antes de los 45 años y con mayor frecuencia si el individuo presenta cualquiera de los factores de riesgo de la enfermedad como son: obesidad; antecedentes familiares de la enfermedad; forma parte de alguna de las poblaciones étnicas de alto riesgo (afro-americano, hispano, indio americano, asiático); si ha tenido bebés de más de 4 kilos y/o diabetes gestacional; niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) \leq 35 mg/dl o triglicéridos \geq 250 mg/dl e hipertensión arterial.

1.1.2. COMPLICACIONES ASOCIADAS A LA DIABETES

Las complicaciones que se presentan en el paciente diabético son de aparición variable, pudiendo preceder a los signos clínicos y conducir al diagnóstico, o sobrevenir después de muchos años de progresión de la diabetes. Evolutivamente, podemos clasificarlas en agudas o crónicas (*Figura 2*).

COMPLICACIONES				
AGUDAS	CRÓNICAS			
Estado hiperosmolar	VASCULARES		NO VASCULARES	MIXTAS
Cetoacidosis				
Hipoglucemia	MICRO VASCULARES	MACRO VASCULARES	Dermopatía	Pie diabético
	Retinopatía	ECV	Infecciones	
	Nefropatía	EVP		
	Neuropatía	Cardiopatía isquémica		

Figura 2. Complicaciones asociadas a la DM. ECV: Enfermedad cerebrovascular. EVP: Enfermedad vascular periférica.

Entre las complicaciones agudas se encuentran las descompensaciones metabólicas hiperglucémicas graves (cetoacidosis y el síndrome hiperosmolar no cetoacidótico), y las hipoglucemias. Mientras que las dos primeras son consecuencia de un déficit absoluto o relativo de insulina, las hipoglucemias se caracterizan por un exceso de ésta. Es preciso destacar que un déficit de acción de la insulina produce una serie de efectos metabólicos no sólo por su menor actividad biológica, sino que trae como consecuencia una desregulación de hormonas catabólicas, viéndose comprometido además del metabolismo de la glucosa, el metabolismo lipídico, proteico y el de las lipoproteínas.

Antes del descubrimiento de la insulina (22) y su uso clínico como parte primordial del tratamiento para la DM, los pacientes morían en poco tiempo por complicaciones agudas hiperglucémicas, antes de poder llegar a desarrollar complicaciones crónicas. Con la utilización de la insulina y el desarrollo de los antidiabéticos orales (ADO), la muerte por descompensaciones hiperglucémicas disminuyó drásticamente, prolongándose por tanto la supervivencia de los

pacientes. Este aumento en el periodo de vida de los pacientes ha traído como consecuencia la aparición de complicaciones crónicas desconocidas en el pasado, que continúan en la actualidad siendo un desafío y convirtiéndose en el principal problema para la supervivencia del diabético.

A pesar de que la DM es considerada una enfermedad endocrina, las complicaciones crónicas se manifiestan a nivel vascular, pudiendo ser clasificadas en microvasculares (cuando predomina la afectación de los vasos pequeños como ocurre en la retina, riñones o sistema nervioso) o macrovasculares (cuando las alteraciones se producen en vasos de mediano y gran calibre, como en el caso de las enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y en las arterias periféricas).

El pie diabético engloba un conjunto de síndromes en los que la presencia de neuropatía, isquemia e infección producen lesiones tisulares o úlceras debido a pequeños traumatismos, produciendo una importante morbilidad que puede llegar incluso a amputaciones.

Así mismo, podemos considerar un grupo de afecciones no vasculares dentro de las complicaciones crónicas que incluyen las afectaciones al cristalino y la progresión acelerada de cataratas, las alteraciones inmunológicas clásicas evidenciadas en la mayoría de los casos por infecciones urogenitales y mucocutáneas recurrentes, así como algunos cambios en la piel característicos de estos pacientes.

1.1.3. COMPLICACIONES VASCULARES DE LA DIABETES

Si bien las complicaciones microvasculares y del pie diabético afectan a la calidad de vida del paciente además de elevar considerablemente los costes del sistema sanitario, las complicaciones macrovasculares constituyen la causa principal de morbilidad y mortalidad en los pacientes con DM en todo el mundo (23).

Las lesiones microvasculares (retina, sistema nervioso y riñón) suelen preceder a las de los vasos de mediano y gran calibre, siendo diferentes en cierta medida según qué zona se encuentre afectada. En la microangiopatía predomina la lesión

en el endotelio, la íntima y la capa muscular media, mientras que en la macroangiopatía la lesión principal se sitúa preferentemente en la capa muscular media. Existe cierta dificultad a la hora de distinguir ambos procesos con respecto a las modificaciones estructurales y funcionales derivadas de la arteriosclerosis o el envejecimiento natural que sufre el sistema arterial. Igualmente, existen diferencias en la evolución de ambos procesos, consiguiéndose una disminución de las complicaciones microvasculares mediante un control glucémico estricto (24), mientras que la macroangiopatía diabética sigue su avance en términos de cronicidad, progresión e irreversibilidad a pesar de tratamientos farmacológicos establecidos. Realmente, ambos procesos son consecuencia de la hiperglucemia crónica, asumiéndose por tanto, que son equivalentes en cuanto a su fisiopatología (Figura 3).

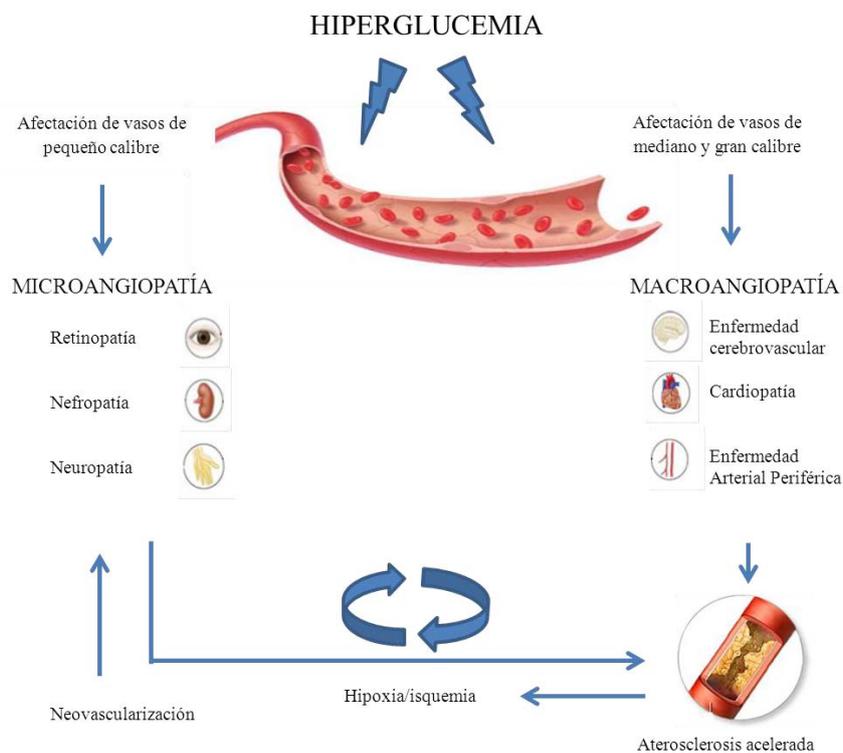


Figura 3. Hiperglucemia como factor común fisiopatológico en las complicaciones macrovasculares y microvasculares de la DM.

Numerosos estudios han relacionado las complicaciones de la diabetes con la intensidad y duración de la hiperglucemia (25). Los resultados de dos trabajos multicéntricos, el DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial*) para la DM tipo

1 en 1993 y el UKPDS (*United Kingdom Prospective Diabetes Study*) para la DM tipo 2 en 1998, donde se comparaban los efectos de pacientes con un control glucémico estricto con los de pacientes con un control estándar, establecieron que la reducción de los niveles de glucosa en sangre (en términos de reducción de hbA1c) disminuían la incidencia de complicaciones microvasculares, sobre todo en retina y riñón. Sin embargo, estos estudios no arrojaron resultados concluyentes en relación a las complicaciones macrovasculares que siguen representando el 80% de las causas de mortalidad asociada a la diabetes (24,26–28). En este sentido, la mayoría de los diabéticos tipo 2 fallece como consecuencia de la aterosclerosis, fenómeno fisiopatológico inicial de la macroangiopatía diabética.

La aterosclerosis es una enfermedad sistémica referida al engrosamiento y endurecimiento de las arterias. Actualmente, se considera un proceso inflamatorio crónico, que afecta a las arterias de mediano y gran calibre de diferentes lechos vasculares y que se caracteriza por el engrosamiento de la capa íntima y media con pérdida de la elasticidad (29). Aparece por el concurso de tres factores principales: disfunción endotelial, inflamación y trombosis. Su lesión básica es la placa de ateroma compuesta fundamentalmente de lípidos, tejido fibroso y células inflamatorias, y pasa por diferentes fases (30). Generalmente se complica mediante la fisura, la erosión o la rotura de la placa y la formación de un trombo en su superficie, lo que facilita su crecimiento y la aparición de isquemia o necrosis (*Figura 4*).

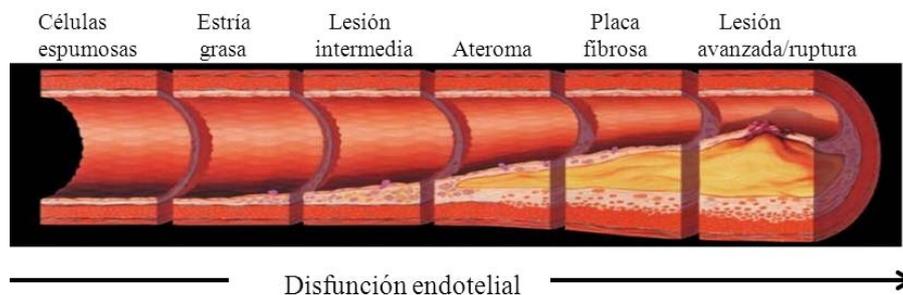


Figura 4. Progresión de la aterosclerosis. La placa, compuesta por grasa, colesterol, calcio y otras sustancias se va depositando en las arterias endureciéndose con el tiempo y estrechando el vaso, con lo cual se limita el flujo de sangre rica en oxígeno a las distintas partes del cuerpo. Fuente: Imagen modificada de Pepine CJ. y colaboradores (31).

La DM es un reconocido factor de riesgo para el desarrollo de la aterosclerosis y por tanto, de enfermedades cardiovasculares. Los pacientes diabéticos tienen de 2 a 4 veces mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular. Así mismo, los diabéticos tipo 2 tienen el mismo riesgo de sufrir un ataque cardíaco que aquellos individuos sin diabetes que ya han tenido un ataque cardíaco previo (32). La DM favorece a la aterosclerosis por distintos mecanismos: un perfil lipídico desfavorable (elevación de los triglicéridos, descenso del HDL, partículas de baja densidad pequeñas y densas (LDL)), presencia de LDL modificadas, hiperinsulinismo, hipercoagulabilidad y aumento de marcadores inflamatorios.

Podemos por tanto considerar a la DM como una enfermedad vascular con riesgo trombótico elevado.

Para llegar a comprender la fisiopatología subyacente del daño vascular en el paciente diabético y por qué la aterosclerosis se da de manera más temprana y acelerada en ellos, es necesario tener en cuenta varios aspectos fundamentales como son: los mecanismos inductores que causan la disfunción endotelial; las alteraciones en la coagulación y la inflamación asociada al proceso.

A) Disfunción endotelial: mecanismos inductores

El endotelio está actualmente considerado como un órgano endocrino, autocrino y paracrino que controla la homeostasis del tono muscular, permeabilidad, coagulación, fibrinólisis, proliferación celular y la respuesta inflamatoria. En presencia de factores de riesgo cardiovascular, como la DM, hiperlipemia, estrés oxidativo o hipertensión, las células endoteliales sufren un cambio fenotípico hacia un perfil inflamatorio generándose lo que se conoce como disfunción endotelial (33). Como consecuencia, se genera un desequilibrio entre la síntesis, liberación o efecto de los factores endoteliales capaces de relajar el músculo liso vascular, entre ellos el óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂), o factor hiperpolarizante, y las sustancias vasoconstrictoras como la angiotensina-II y la endotelina-1 que pueden sintetizarse en las células de este tejido. Este desajuste se manifiesta con una reducción en la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio, o con una mayor respuesta vasoconstrictora. Además, el deterioro endotelial puede facilitar

la interacción de las plaquetas y leucocitos con la pared vascular, así como el crecimiento y migración de las células musculares lisas.

Como hemos mencionado anteriormente, el proceso se inicia por un estado mantenido de hiperglucemia debido a un defecto en la producción de insulina por las células pancreáticas β ; una deficiente acción insulínica o por ambas causas. Bioquímicamente, el exceso de glucosa intracelular puede generar disfunción endotelial por varios mecanismos:

- Glicación no enzimática de proteínas (GNE), con formación de productos finales de la glicosilación avanzada (AGEs)(34). La GNE ocurre de manera fisiológica, pero en el caso de la DM se encuentra patológicamente acelerada. Los AGE intervienen en el desarrollo de las complicaciones asociadas a la diabetes provocando modificaciones fisicoquímicas en diversas biomoléculas, y por tanto, alterando funcional y estructuralmente las moléculas glicosiladas. Además, alteran varios procesos biológicos debido a la unión de moléculas modificadas al receptor de los AGEs e incrementan la producción de radicales libres aumentando por tanto el estrés oxidativo (35).
- Vía del polirol-sorbitol-aldosa-reductasa (36): una vía alternativa de metabolización de la glucosa es la de la aldosa reductasa, que genera sorbitol. Éste es metabolizado posteriormente a fructosa aumentándose al mismo tiempo la oxidación de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), reduciéndose la disponibilidad de NO. Tiene lugar un desequilibrio que cursa con hipoxia celular y alteración de la funcionalidad de la célula endotelial.
- Diacilglicerol-proteínquinasa C (37): la activación de la proteínquinasa C (PKC) conduce a una alteración de las funciones endoteliales y de sustancias vasoactivas, potenciándose, por el contrario, la secreción de sustancias vasoconstrictoras como la endotelina y la angiotensina II.
- Auto-oxidación (38): el metabolismo de la glucosa puede inducir modificaciones oxidativas de los lípidos y proteínas, entre ellas las LDL. Las LDL oxidadas se acumulan formando células espumosas, atrayendo

monocitos circulantes y provocando citotoxicidad en las células endoteliales.

Investigaciones recientes refieren una posible relación entre estas vías y la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que conducen a un estrés oxidativo (EO) crónico en pacientes diabéticos (39). El término “estrés oxidativo” hace referencia al desequilibrio a corto o largo plazo de moléculas antioxidantes y pro-oxidantes, lo que provoca una disrupción de los mecanismos de señalización y control celular, favoreciéndose los procesos de pro-oxidación y obstaculizándose los mecanismos antioxidantes (40). Se ha considerado que, en respuesta a la hiperglucemia crónica, las mitocondrias de las células endoteliales generan un exceso de ERO, en concreto de aniones superóxido ($\cdot O_2^-$), contribuyendo así a la formación de las complicaciones en la DM. Este aumento en la generación de $\cdot O_2^-$ se considera un proceso clave en la activación de las vías anteriormente descritas (Figura 5).

Diversos estudios han demostrado que los pacientes con DM2 tienen aumentado el daño oxidativo inducido por mayor producción de ERO en la circulación y a su vez tienen reducidos los mecanismos de defensa antioxidantes (41,42).

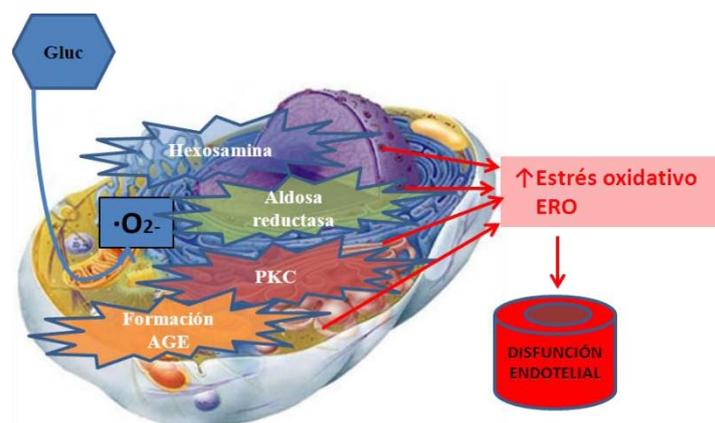


Figura 5: El estrés oxidativo como causa común del daño vascular. Se ha sugerido que la diversidad de eventos asociados a las complicaciones micro y macroangiopáticas puede tener su origen en la superproducción mitocondrial de aniones superóxido ($\cdot O_2^-$), debido a la hiperglucemia, hecho que relacionaría las 4 vías anteriormente descritas. Gluc: Glucosa. PKC: proteinquinasa C. AGE: productos finales de la glicosilación avanzada. ERO: especies reactivas de oxígeno.

Al igual que la hiperglucemia, la hiperinsulinemia y/o la resistencia a la insulina (RI) inducen disfunción endotelial y aterosclerosis (43).

La hiperinsulinemia compensatoria que secunda a la RI estimula diversos fenómenos proliferativos y proaterogénicos en las células endoteliales y del músculo liso vascular. Estos efectos incluyen un aumento de la producción del inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1), endotelina, citocinas proinflamatorias y un aumento de la expresión de las moléculas de adhesión (44).

B) Alteraciones de la coagulación

Se han encontrado múltiples alteraciones de la homeostasia en pacientes con DM, las cuales favorecen el estado protrombótico que presentan estos enfermos. Los trastornos en la función de las plaquetas conllevan una hiperreactividad de éstas así como un aumento en su actividad procoagulante. Dichos factores se encuentran asociados con complicaciones micro y macrovasculares. Así mismo, existen alteraciones en el mecanismo de la coagulación que permiten el establecimiento de un estado de hipercoagulabilidad, el cual contribuye al desarrollo de manifestaciones trombóticas. A este respecto, existen investigaciones que documentan un aumento en el fibrinógeno, de los factores de coagulación VII y VIII, así como de los marcadores de activación de este sistema. De igual forma, los trastornos en la fibrinólisis detectados en los pacientes diabéticos no solo predisponen al desarrollo de eventos trombóticos, sino que también favorecen la formación y progresión de las lesiones aterotrombóticas. Ha sido documentado la existencia de un desequilibrio entre activadores del plasminógeno (tisular) e inhibidores como el PAI-1. La excesiva inhibición de la fibrinólisis aumenta el riesgo de coagulación anormal y trombosis.

Como consecuencia, en la DM tiene lugar un aumento del fibrinógeno, de PAI-1, de la molécula de adhesión de células vasculares (VCAM-1), de las glicoproteínas adhesivas IIb/IIIa de la superficie plaquetaria y de la producción de tromboxano A-2. Igualmente, existe un incremento de la agregabilidad y adhesión plaquetaria, y de la glicosilación de proteínas de las plaquetas; y, simultáneamente, una disminución de los niveles de antitrombina III, de las proteínas C y S, de la

prostaciclina y de la disponibilidad de NO plaquetario, creándose un estado procoagulante en el paciente diabético.

C) Inflamación

Actualmente, la aterosclerosis es considerada una enfermedad dinámica y progresiva, resultado de la combinación entre inflamación y disfunción endotelial (45–47). El tejido adiposo juega un papel central en el mantenimiento de un estado inflamatorio crónico, puesto que es el responsable de la secreción de una variedad de biomoléculas biológicamente activas como la Interleukina-6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la leptina y la adiponectina, que son determinantes en la regulación del proceso aterogénico y la RI (48–50).

La sobrecarga celular y la activación de la señalización celular mitógena (factor c-Jun NH(2)-terminal quinasa (JNK) y factor nuclear kappa (NF- κ B)) tienen lugar cuando aumenta el tejido adiposo como consecuencia de la obesidad. Dichas vías de inflamación aumentan la producción de citoquinas proinflamatorias por el adipocito, que pueden activar las células musculares lisas y endoteliales vasculares con disfunción vascular. De esta manera, los productos del adipocito pueden promover directamente la disfunción vascular y la aterogenia.

Todas estas acciones proaterogénicas y protrombóticas explican la alta prevalencia de la aterosclerosis y sus consecuencias en los pacientes diabéticos.

Bajo este contexto, las manifestaciones clínicas de la aterosclerosis dependerán del lecho vascular afectado, siendo las más representativas la cardiopatía isquémica, la enfermedad cerebrovascular (ECV) o la enfermedad arterial periférica (EAP). La presencia de aterosclerosis en un territorio vascular se asocia con frecuencia con la afectación de otros territorios por lo que es común que varias manifestaciones se presenten de manera simultánea, como han dejado patente varios estudios poblacionales tales como el Edimburgh Artery Study, el CAPRIE (51), el REACH o Malmö entre otros. Igualmente, los factores de riesgo son los mismos para los distintos territorios vasculares. Los pacientes diabéticos manifiestan la aterosclerosis de manera más temprana y acelerada que los pacientes no

diabéticos (52), con un mayor nivel de afectación en los territorios involucrados y con una mayor incidencia (*Tabla 2*).

Tabla 2: Características diferenciales entre la enfermedad aterosclerótica del diabético y no diabético

DIABÉTICOS	NO DIABÉTICOS
Características generales	
Mayor frecuencia	Menos frecuente
Evolución más rápida y precoz	Pacientes mayores
Incidencia alta en mujeres	Predomina varones
Arteriopatía periférica (EAP)	
Afectación multisegmentaria, colaterales afectadas	Afectación de un solo segmento, colaterales no afectadas
Mayor incidencia en vasos tibiales, peroneos	Mayor incidencia en aorta y vasos iliofemorales
Cardiopatía isquémica	
Síntomas atípicos (isquemia silente)	Síntomas típicos
Mayor mortalidad	Menor mortalidad
Lesiones más distales	Lesiones más proximales
Mayor incidencia	Menor incidencia
Enfermedad cerebrovascular (ECV)	
2-3 veces mayor incidencia que no diabético	Menor incidencia

Fuente: Adaptado de Levin, 1991

La aterosclerosis está considerada un proceso sistémico, el cual afecta a los vasos de todo el organismo en mayor o menor medida, incluyendo los coronarios, cerebrales, viscerales y de las extremidades. A pesar de que la EAP engloba todos los territorios no coronarios, frecuentemente se utiliza este término para referirse a la arteriopatía de los miembros inferiores. En la presente tesis nos referiremos únicamente a la enfermedad arterial de los miembros inferiores.

1.2. ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA E ISQUEMIA CRÓNICA CRÍTICA EN MIEMBROS INFERIORES

1.2.1. DEFINICIÓN Y CONCEPTO

Según Meijer y colaboradores (53), la EAP es la manifestación más prevalente de la aterosclerosis. A nivel de los miembros inferiores, el estrechamiento arterial causa un desequilibrio entre el suministro y la demanda de oxígeno produciendo cambios en la micro y macrocirculación. Abarca un espectro clínico que comprende desde pacientes asintomáticos hasta la forma más severa como es la isquemia crítica (CLI, del inglés *critical limb ischemia*), que podría resultar en amputación y pérdida del miembro. Por lo tanto, la CLI se considera la “etapa final” de la EAP. La CLI implica cronicidad, considerándose un problema persistente e incesante que perjudica gravemente el estado funcional del paciente y su calidad de vida, y se asocia con un aumento de la mortalidad y morbilidad cardiovascular.

El concepto de CLI surgió de manera tardía en la historia de la EAP. En la década de los 50s, con la cirugía vascular emergente, la inicial clasificación de la EAP realizada por Fontaine, donde los estados III y IV se corresponden con la CLI, fue basada únicamente en síntomas clínicos. Posteriormente, se publicó en 1986 la clasificación de Rutherford la cual incluía criterios hemodinámicos (54). Desde entonces, diversos autores han propuesto diferentes definiciones, teniendo en cuenta una variedad de medidas hemodinámicas en combinación con hallazgos clínicos, ya que el diagnóstico basado en las manifestaciones clínicas habituales de la CLI (es decir, heridas crónicas que no cicatrizan, dolor en reposo, gangrena) también podrían ser causados por otras enfermedades no vasculares. La *Trans Atlantic Inter-Society Consensus* (TASC II) ha definido la CLI como el cuadro caracterizado por dolor crónico en reposo, úlceras o gangrena atribuible a enfermedad arterial oclusiva comprobada (2,55).

Para el diagnóstico del síndrome de isquemia crónica crítica del miembro inferior, el grupo de trabajo europeo de isquemia crítica de la pierna definió la necesidad de concurrir criterios clínicos y objetivos para precisar el cuadro, describiéndola como la presencia de dolor en reposo de origen isquémico persistente que requiere analgesia durante más de 2 semanas, o ulceración o gangrena del pie o

dedos del pie con una presión sistólica en el tobillo ≤ 50 mmHg y/o una presión sistólica en el dedo del pie ≤ 30 mmHg (56).

1.2.2. ISQUEMIA CRÓNICA CRÍTICA EN PACIENTES DIABÉTICOS

Los pacientes diabéticos manifiestan de manera más temprana y acelerada la aterosclerosis que los pacientes no diabéticos (52), presentando de 4 a 10 veces mayor riesgo de padecer EAP y de 10 a 20 veces más probabilidad de amputación que los individuos sin diabetes. Es estimado que un 15% de los diabéticos sufrirán CLI. Por tanto, los pacientes diabéticos son expuestos a formas más avanzadas de la enfermedad, siendo la diabetes la causa que ocupa el primer lugar en amputaciones no traumáticas (57,58).

Presentan una combinación de macro y microangiopatía, neuropatía con pérdida de sensibilidad, mayor daño tisular traumático, riesgo de infección elevado, aumento de viscosidad en la sangre, trombosis y una respuesta inflamatoria mayor, lo que conduce a una enfermedad más distal, difusa y severa. Las lesiones arteriales suelen afectar a los vasos más distales (localización infrapoplítea, especialmente la arteria peronea, tibial posterior y plantares) (59), mientras que otros factores de riesgo de la enfermedad como el tabaco y la hipertensión son asociados con lesiones próximas a los vasos aorto-iliofemorales. Esta diferencia en la localización de las lesiones, junto con las calcificaciones vasculares que presentan con frecuencia los diabéticos limita la posibilidad del desarrollo de circulación colateral y reduce las opciones de revascularización.

Además de todas estas complicaciones, la diabetes predispone al paciente a sufrir el denominado pie diabético, el cual ha sido definido como las distintas lesiones y/o ulceraciones de las extremidades inferiores que sufren los pacientes con DM relacionadas con alteraciones neurológicas y distintos grados de EAP. Es importante no confundir “pie diabético” con el pie de una persona diabética, puesto que no todos los pacientes diabéticos desarrollan esta complicación.

Así pues, en el pie diabético concurren varios condicionantes fisiopatológicos:

- **Complicaciones neuropáticas:** la presencia de neuropatía en pacientes diabéticos juega un importante papel en la patogénesis de la CLI (60), puesto que inhibe la sensación de dolor antes y después del trauma, así como la falta de reconocimiento de heridas que requieren atención temprana.
- **Complicaciones vasculares:** es frecuente que los diabéticos sufran isquemia o daño tisular derivado de la insuficiencia arterial. El pie es una zona de riesgo comprometido, produciéndose trastornos tróficos.
- **Complicaciones de las úlceras:** La falta del flujo sanguíneo predispone a los tejidos isquémicos de los pacientes diabéticos a tener extensas heridas con escaso potencial de curación, incluso después de un trauma menor. La diabetes predispone a la formación de gangrena húmeda con infecciones polimicrobianas que son difíciles de tratar debido al suministro limitado de sangre, lo que predispone a la formación de infecciones profundas de la herida y osteomielitis. Estas lesiones tienden a agravarse, lo que obliga a ejecutar amputaciones parciales o incluso totales de las zonas afectadas.

1.2.3. PREVALENCIA, INCIDENCIA Y PRONÓSTICO

La EAP se trata de una enfermedad infraestimada e infradiagnosticada, puesto que es de presentación mayormente asintomática. Es difícil establecer una estimación de la prevalencia e incidencia, debido entre otros factores a las diferencias encontradas al definir la CLI en los distintos estudios. Además, los estudios realizados sobre su prevalencia dependen de las características que presenten la población estudiada, siendo sólo válidos para ese grupo de sujetos. De esta forma, según diversos estudios epidemiológicos, la prevalencia de EAP se sitúa entre el 3% y el 18%. Más de 27 millones de personas estadounidenses y europeas presentan esta enfermedad.

La prevalencia de EAP en pacientes diabéticos es mayor que en la población de no diabéticos, aproximadamente un 27% más (55,61). En España, la prevalencia de la

DM se sitúa en un 10,83%, por lo que se considera entre los países europeos con el mayor número de personas con diabetes junto con Alemania, Italia, Francia y Reino Unido (1,16).

Aunque no existen estudios epidemiológicos de población precisos, se estima que la incidencia de CLI podría estar entre 500-1000 de nuevos casos por millón y año, y se espera que este número crezca en países desarrollados así como con la edad de la población con una prevalencia creciente de factores de riesgo tales como la diabetes, tabaco, hipercolesterolemia, hipertensión arterial y predisposición familiar. Entre el 15-30% de los pacientes con claudicación intermitente desarrollarán isquemia crítica de la pierna a lo largo del curso de la enfermedad. Aproximadamente el 1% de los adultos mayores de 50 años presenta esta patología, lo que supone que en Europa y Estados Unidos entre 1,5 y 2 millones de personas sufren CLI (62).

En cuanto al pronóstico de los pacientes con CLI, este cuadro ocasiona aproximadamente 150.000 amputaciones en Europa y Estados Unidos cada año. Un año después de la aparición del cuadro de isquemia crítica en la pierna, solamente el 25% de los pacientes estarán vivos y libres de amputación. El 20-25% habrá muerto, el 25% habrá requerido una amputación mayor y el 20% restante se encontrará aún en los estadios de CLI (2,55). En concreto, las cifras de mortalidad de este cuadro son dramáticas: 25% en el primer año, 31,6% a los dos años y más del 60% a los 3 años. La tasa de mortalidad a los 5 años para las poblaciones con CLI superan a aquellos con cáncer de próstata (< 1%), cáncer de mama (11%), infarto agudo de miocardio (20%), cáncer colorectal (36%) y ataque cerebrovascular (41%) (63) (*Figura 6*).

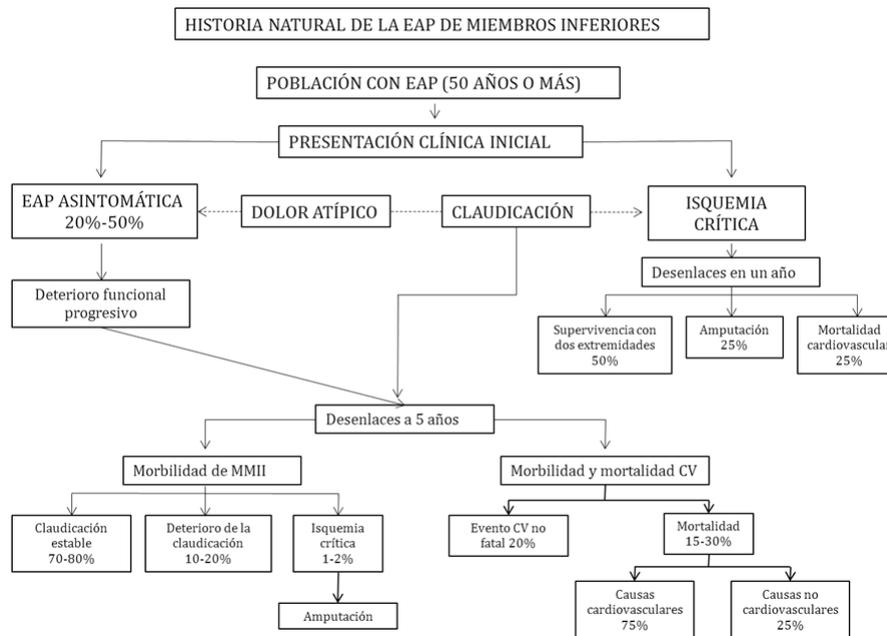


Figura 6. Historia natural de la enfermedad arterial periférica (EAP) de los miembros inferiores. Fuente: Hirsch y colaboradores (64).

1.2.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

En la gran mayoría de los casos, la CLI está relacionada con una aterosclerosis avanzada como hemos comentado anteriormente. Normalmente, la aterosclerosis no produce síntomas hasta que no estrecha gravemente la arteria o causa una obstrucción súbita. Los síntomas aparecen cuando la estenosis arterial alcanza un punto crítico en el que el flujo de la sangre suministrada a la extremidad distal es insuficiente para proporcionar la demanda basal de oxígeno del tejido. Esto tiene lugar a pesar de dos mecanismos compensatorios: la vasodilatación arteriolar post-estenótica y el desarrollo de una circulación colateral.

El principal síntoma es la claudicación intermitente, que se describe como dolor en uno o varios grupos musculares desencadenado por el movimiento o deambulación debido a la falta de aporte sanguíneo. Estos síntomas suelen desaparecer a los pocos minutos de reposo (65,66). El 21% de los pacientes diabéticos con claudicación evoluciona hacia la CLI, frente al 3% de los pacientes no diabéticos.

De este modo, cuando la demanda basal de oxígeno del tejido no puede ser satisfecha por el sistema vascular periférico, se produce una lesión isquémica y

necrosis que conducen a la destrucción de los tejidos, la aparición de úlceras, gangrena y dolor en reposo. La isquemia, las áreas de pérdida de tejido, la neuropatía isquémica o la combinación de todos estos factores producen dolor en el paciente, en la mayoría de los casos importante e intolerable, que responde sólo a analgesia mayor. Este dolor intenso puede preceder a la formación de una úlcera isquémica o gangrena. De esta forma, el dolor aumenta más y luego disminuye o incluso desaparece cuando ésta se ha desarrollado definitivamente en la parte isquémica, afectando por completo los nervios sensitivos periféricos.

1.2.5. FACTORES DE RIESGO

La aterosclerosis es la principal causa de la EAP y por tanto de la CLI, en la inmensa mayoría de los pacientes que la padecen (95%). Si bien la causa exacta de la aterosclerosis es desconocida, ciertos factores, condiciones y hábitos que la favorecen serán los que facilitarán la aparición de isquemia arterial crónica. Todos los factores de riesgo se interrelacionan y se potencian en la patogenia de la aterosclerosis. Consecuentemente, los pacientes con CLI comparten los mismos factores de riesgo que aquellos pacientes con patologías en otros lechos vasculares.

Los pacientes diabéticos tienen mayor probabilidad de cursar con otros factores de riesgo adicionales para el desarrollo de esta enfermedad.

La mayoría de los estudios llevados a cabo sobre factores de riesgo en la EAP en series de grandes poblaciones provienen de estudios realizados en enfermedad coronaria (Framingham, ARIC, Honolulu y SHS).

Entre los factores de riesgo tradicionales encontramos:

- Edad: en diversos estudios de base poblacional, se observa un notable incremento tanto de la incidencia como de la prevalencia de la EAP a medida que la edad avanza, viéndose un avance más rápido a partir de los 65 años.
- Tabaquismo: el consumo de tabaco, junto con la DM, es el factor más fuertemente asociado a la aparición de isquemia de las extremidades. Es

uno de los factores predictivos más importantes y, al mismo tiempo, agrava el resto de los factores de riesgo. Promueve un estrés oxidativo que, directa o indirectamente, participa en las vías inflamatorias. Además, el grado de exposición a tabaco correlaciona con la gravedad de la EAP, las tasas de amputación de miembros inferiores así como con la mortalidad (55,67).

- Diabetes: la presencia de diabetes Mellitus (DM) incrementa de 2 a 4 veces la probabilidad de desarrollar EAP. La probabilidad de presentar EAP aumenta hasta un 26% por cada 1% de aumento en la HbA1c (68). Así mismo, la RI también está considerada como un factor de riesgo de EAP incluso en pacientes sin diabetes, aumentando el riesgo entre un 40% y 50% (69). En pacientes diabéticos, la EAP se comporta de manera más agresiva en comparación con pacientes no diabéticos, con afectación precoz de grandes vasos. La necesidad de una amputación mayor es de 5 a 10 veces superior en los diabéticos que en los no diabéticos.
- Hipertensión arterial (HTA): se encuentra relacionada con todas las manifestaciones de enfermedades cardiovasculares, incluida la EAP. El mecanismo por el que actúa la HTA no está bien definido, pero parece hemodinámico, por alteración en la actividad plaquetaria, disfunción endotelial y concentración anormal de factores homeostáticos que pudieran favorecer el estrés oxidativo y el desarrollo de la respuesta inflamatoria que lleva a la formación de la placa de ateroma (lesión básica de la aterosclerosis).
- Dislipemia: los pacientes con EAP tienen claramente un aumento en los valores de triglicéridos, colesterol total así como en las proteínas de baja densidad y una disminución en los valores de las proteínas de alta densidad (70).

Además de los tradicionales factores de riesgo de la EAP, están surgiendo una serie de trabajos relacionando nuevos factores de riesgo con el desarrollo de la enfermedad, como son:

- Hiperhomocisteinemia: Existen datos que indican una asociación entre las concentraciones elevadas de homocisteína y la enfermedad aterosclerótica.

La homocisteína induce efectos vasculares adversos tales como daño endotelial, proliferación de las células musculares lisas y oxidación de las LDL. Existe además una correlación positiva entre la concentración de homocisteína y las de LDL. Esta situación podría contribuir a la amplificación del daño vascular en los pacientes diabéticos hiperhomocisteinémicos. Sin embargo, su asociación con EAP también se ha definido como inconsistente.

- Insuficiencia renal crónica: los pacientes con insuficiencia renal crónica presentan mayor prevalencia de EAP. Actualmente, ya se reconoce como un factor de riesgo de la EAP.
- Marcadores inflamatorios: se han publicado numerosos estudios que demuestran la relación entre la inflamación y la EAP. Por ejemplo, en hombres aparentemente sanos de la cohorte del estudio PHS (Physician's Health Study), se demostró que el riesgo relativo de desarrollar EAP aumentaba de forma significativa con la elevación de la proteína C reactiva (71).
- Hiperviscosidad sanguínea y estados de hipercoagulabilidad e hiperfibrinogenemia: en pacientes con EAP se ha descrito un hematocrito elevado, posiblemente relacionado con el tabaquismo. Además, algunos estudios han demostrado que las concentraciones elevadas de fibrinógeno condicionan una alteración de la microcirculación que se asocia con la clínica más importante de EAP.

1.2.6. DIAGNÓSTICO

Debido a que la EAP presenta una elevada prevalencia, y con frecuencia cursa como asintomática, las principales guías de práctica clínica recomiendan realizar un cribado diagnóstico a pacientes de alto riesgo (55,64), que la ACC/AHA (*American College of Cardiology/American Heart Association*) y la TASC II considera a: aquellos pacientes mayores de 70 años; aquellos entre 50 y 69 años con historia de tabaquismo o DM; edad entre 40 y 49 años con DM y al menos otro factor de riesgo de arteriosclerosis; síntomas compatibles con claudicación al esfuerzo o

dolor isquémico en reposo; pulsos anormales en las extremidades inferiores; enfermedad arteriosclerótica en otros territorios (p. ej., enfermedad arterial coronaria, carotídea o renal), y/o pacientes con un *score* de Framingham entre el 10% y el 20%.

Para establecer el diagnóstico de la EAP disponemos fundamentalmente de la anamnesis y la exploración física, el índice tobillo-brazo (ITB), otros métodos diagnósticos no invasivos (determinaciones de la presión segmentarias, registros del volumen del pulso, estudios de ecografía-Doppler y pruebas de esfuerzo) y la angiografía vascular mediante tomografía computarizada (TC), resonancia magnética (RM) o arteriografía convencional.

La exploración física es una herramienta útil en el diagnóstico de la EAP. Los síntomas clásicos de EAP son bien conocidos y cuando se presentan son casi patognomónicos. Sin embargo, aunque su especificidad y su valor predictivo positivo son muy altos, su sensibilidad es baja.

Los tres criterios de la exploración física, que conducen al diagnóstico, son:

- Inspección: la observación del aspecto de la extremidad puede dar información de la existencia de isquemia y de la gravedad. La inspección permite apreciar trayectos arteriales hiperpulsátiles, se puede apreciar palidez o aspecto sonrosado de la piel, atrofia muscular, ausencia de vello. En estadios muy avanzados pueden aparecer lesiones ulcerosas, necróticas o incluso gangrena.
- Palpación: siempre debe incluirse en la exploración vascular de la EAP. Se deben palpar la arteria femoral común, la poplítea, la tibial posterior y la pedia. Además, con el dorso de la mano se debe valorar la temperatura cutánea.
- Auscultación: La auscultación en busca de soplos es posible en todas las arterias palpables de mediano y gran calibre. Fundamentalmente se realiza en las arterias aorta abdominal, femoral y poplítea. Permite localizar la lesión y diferenciar entre estenosis y oclusión.

En el programa PARTNERS (72) se demostró que, si para el diagnóstico de la enfermedad nos basamos exclusivamente en la presencia de signos de claudicación intermitente, únicamente detectaríamos a un 10-15% de los pacientes con EAP, mientras que explorando también los pulsos arteriales se detectaría a alrededor del 50% de los pacientes. Por tanto, esto significa que con la anamnesis y la exploración física queda sin diagnosticar cerca de la mitad de los pacientes. Por ello se recomienda realizar algún test no invasivo adicional a los pacientes considerados de riesgo aterotrombótico.

Existen varios métodos no invasivos para valorar la presencia y severidad de la EAP, como:

- Índice tobillo-brazo (ITB): es un procedimiento preciso, simple, barato, cuya sensibilidad y especificidad han sido ampliamente demostradas. (Se explicará con más detalle en la sección Pacientes y Metodología). Sin embargo, en arteriopatía diabética o causas que produzcan calcificación importante de la pared arterial pueden obtenerse índices por encima de 1.2, no considerándose diagnóstico en estos casos.
- Ecografía Doppler: aporta información sobre la localización de la obstrucción, la morfología de las lesiones e información hemodinámica sobre la presencia o ausencia de flujo, así como las características del mismo.

Entre los métodos invasivos encontramos:

- Arteriografía (angiografía por sustracción digital, DSA del inglés *digital subtraction angiography*) es el *gold estándar* para el diagnóstico anatómico final de la afección. Permite conocer la extensión, topografía de las lesiones, y desarrollo de vasos colaterales en la oclusión arterial.
- Angiorresonancia magnética (angio-RM): aplica las técnicas de tomografía por RM de alto campo y alta resolución. Las imágenes que se obtienen son parecidas a las de la arteriografía.

- Angiotomografía axial computarizada (angio-TAC): Se opacifican las arterias con una inyección intravenosa de contraste iodado. La imagen puede ser rotada tridimensionalmente.

1.2.7. POSIBILIDADES ACTUALES DE TRATAMIENTO

Como ya hemos comentado anteriormente, la CLI es la suma de una serie de síntomas que se presentan cuando se produce una disminución progresiva del flujo sanguíneo en la extremidad, la cual puede afectar a su función y a su supervivencia. Cuando dichos síntomas tienen lugar en reposo, o se presentan alteraciones funcionales y/o tróficas, la isquemia se transforma en crítica.

En este contexto, el restablecimiento del flujo distal es el único tratamiento posible para aliviar los síntomas.

Actualmente, el tratamiento que recibe un paciente con la patología descrita dependerá de la severidad del cuadro que presente. De esta forma, podemos dividirlo en dos grandes bloques: tratamiento médico y tratamiento quirúrgico.

A) Tratamiento médico

Debido a que los pacientes con esta patología tienen un pronóstico a largo plazo muy negativo, con un aumento de la mortalidad al cabo de 10 años 15 veces superior al de los pacientes sin EAP (73), la primera indicación es minimizar al máximo los factores de riesgo insistiendo en cambiar los hábitos de vida (abandono del hábito tabáquico, dieta saludable, ejercicio físico).

Así mismo, la prescripción de un tratamiento farmacológico persigue la prevención de eventos cardiovasculares secundarios (antiagregantes como el ácido acetilsalicílico, fármacos tienopiridínicos como el Clopidogrel; estatinas; inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA)), así como mejorar la distancia en el perímetro de marcha (pentoxifilina, estatinas, Cilostazol).

Sin embargo, como ya hemos comentado anteriormente, no hay evidencias que un tratamiento farmacológico tenga efecto sobre la patología descrita (5).

B) Tratamiento quirúrgico o endovascular

La revascularización quirúrgica y/o endovascular es a menudo el tratamiento de elección para estos pacientes, aun tratándose de un procedimiento invasivo y que conlleva una alta tasa de complicaciones (heridas quirúrgicas, infecciones, hematomas, trombosis). Dependiendo de la localización y extensión del segmento arterial afectado, hay que llevar a cabo una reconstrucción por angioplastia, stents, by-pass con injerto y otros dispositivos.

De hecho, no siempre el problema isquémico queda resuelto definitivamente. Las recurrencias ateroscleróticas, las hiperplasias de la íntima y media vascular, o las trombosis postquirúrgicas obligan a una reintervención arterial a corto o largo plazo en el 30-50% de los pacientes operados (74).

A pesar del dramático impacto social, las opciones de tratamiento para este tipo de pacientes son limitadas. No todos los pacientes con esta patología son candidatos para este tipo de intervenciones debido fundamentalmente a la localización distal de las obstrucciones o debido a la presencia de comorbilidades que los sitúa en mayor riesgo de muerte.

No existe tratamiento etiológico de la aterosclerosis. Los objetivos terapéuticos tanto en la EAP como en la CLI son aliviar la sintomatología, particularmente el dolor, la mejora de la reología de la sangre y la microcirculación, la curación de las úlceras isquémicas, aumentar la actividad del paciente, mejorar su calidad de vida y evitar la pérdida del miembro afectado.

Las diversas opciones del tratamiento farmacológico tienen su indicación de forma aislada en los estadios iniciales de la enfermedad, o bien asociadas a la cirugía revascularizadora en la fase de isquemia crítica. La terapia médica es limitada a una terapia antitrombótica (75). No existe suficiente nivel de evidencia que demuestre que tales fármacos afecten favorablemente el curso de la CLI (5).

Por tanto, nuevas alternativas de revascularización son necesarias para estos pacientes sin opciones, para reducir el número de amputaciones y el impacto que éstas tienen en su calidad y esperanza de vida.

1.3. TERAPIA CELULAR COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA

En la actualidad, el tratamiento de las enfermedades está basado en el uso de medicamentos de formulación química tales como antibióticos, agentes químicos, drogas, fármacos y terapias sustitutivas. De acuerdo con la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos, *un medicamento de uso humano es toda sustancia o combinación de sustancias con propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos mediante una acción farmacológica, inmunológica o metabólica*. ¿Qué ocurre si dicha acción la ejercen células de nuestro propio organismo? Recientes investigaciones han demostrado que el sistema más efectivo de reparación del cuerpo humano está representado por células troncales. Por definición, las células madre o troncales son capaces de dividirse y hacer copias de sí mismas indefinidamente (autorrenovación). A su vez, bajo ciertas condiciones fisiológicas dan lugar a distintos tipos celulares (diferenciación) (76,77). Estas características las hacen imprescindibles tanto para sustituir a las células del cuerpo que han envejecido y se han perdido así como para la construcción del cuerpo en sí mismo durante el desarrollo (*Figura 7*).

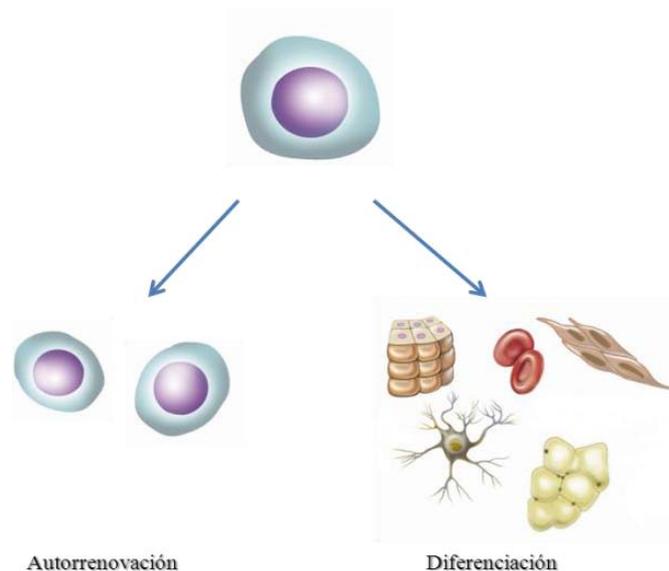


Figura 7: Características de las células troncales. La capacidad de auto-renovarse y de diferenciarse hacia células especializadas son las dos características principales de una célula troncal.

Utilizar las reservas endógenas de células troncales como agentes terapéuticos es lo que propone la Terapia Celular actual. De este modo, la aplicación de células como una sustancia activa farmacológica busca restaurar el funcionamiento de los tejidos u órganos dañados a través de la protección de la integridad celular o por la reposición de las células dañadas. Esto puede realizarse bien por diferenciación celular (las células precursoras se diferencian a células más maduras, con la forma celular definitiva del tejido a regenerar) o bien mediante cultivo o expansión celular de la población celular de interés en el laboratorio. Las células troncales constituyen una importante fuente para ser utilizadas en Terapia Celular, pudiendo ser trasplantadas directamente en el sitio de la lesión o reclutadas mediante la estimulación de la síntesis de moléculas quimiotácticas. Enfermedades cardiovasculares (78), enfermedades inmunológicas (79), la diabetes y sus complicaciones (80–83), desórdenes neurodegenerativos (84), enfermedades inflamatorias como la enfermedad de Crohn (85), cáncer (86), etc...pueden verse beneficiadas por la Terapia Celular.

Debido a la novedad, complejidad y especificidad técnica de las terapias basadas en el uso de células somáticas vivas, así como las que usan material genético recombinante e ingeniería de tejidos, el concepto de medicamento ha experimentado una importante modificación, al ser incluidos en lo que globalmente se denomina Terapias Avanzadas. Esta nueva clase de medicamentos ha supuesto igualmente una revolución en las agencias reguladoras, dándose casos de ensayos clínicos con células troncales que comenzaron aplicándose como procedimiento quirúrgico. Actualmente, los AMPs (*Advanced Medicinal Products* en inglés) se encuentran bajo una regulación específica, la cual se encuentra dirigida por el Comité de Terapias Avanzadas (CAT) de la Agencia Europea del medicamento (EMA, del inglés *European Medicines Agency*).

De este modo, según las normativas implantadas por las agencias y autoridades sanitarias como la AEMPS (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios) y la EMA, el uso de células somáticas para terapia celular se consideran medicamentos de Terapias Avanzadas (Reglamento (CE) No. 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de noviembre de 2007 sobre

medicamentos de terapia avanzada y la Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo) (87).

Un medicamento de terapia celular presenta características que lo diferencian claramente de los fármacos convencionales obtenidos por síntesis química y que abarca desde el momento en que comienza su investigación hasta su utilización clínica y aspectos regulatorios. Estas diferencias hacen que muchos de los conceptos que tenemos sobre los fármacos de síntesis química no sean extrapolables a los medicamentos de terapias avanzadas y exige que sean considerados, a todos los niveles, como una clase muy diferente de medicamentos.

Los medicamentos de terapia celular son los únicos en los que el componente activo son células vivas, y por lo tanto, las células son el producto, y no lo que éstas producen. Es complicado definir sus características farmacológicas dado que producen una cantidad variable y a menudo desconocida de moléculas bioactivas. Por tanto, la definición de la composición de un producto celular, sus mecanismos de acción, farmacocinética, toxicidad y eficacia representan desafíos nunca antes previstos en la farmacología convencional (87).

En cualquier caso, los medicamentos de terapia celular tienen que seguir el mismo desarrollo que cualquier otro medicamento, que consta de varias fases (88)(Figura 8).

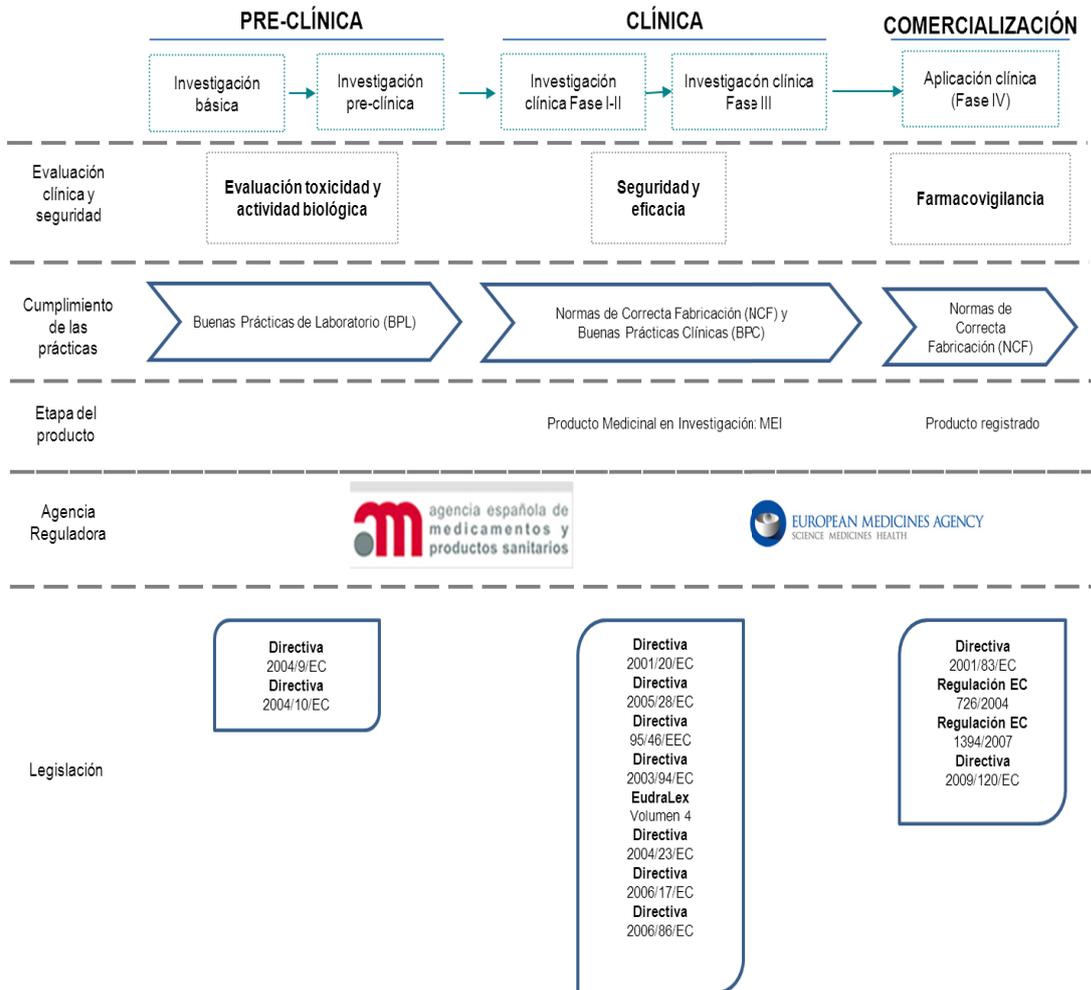


Figura 8: Esquema del desarrollo de un medicamento celular. Se muestran las principales fases del proceso (pre-clínica, clínica y comercialización), el tipo de evaluación clínica y de seguridad que se lleva a cabo en cada etapa, las normas y/o prácticas que deben cumplirse en cada fase, las agencias reguladoras y sus autorizaciones en cada parte del proceso así como la legislación asociada en las distintas etapas por la que pasa un medicamento celular.

Así pues, las células troncales representan una nueva alternativa para la reparación y regeneración de tejidos, y una fuente prometedora para nuevas terapias. Sin embargo, aparte del trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCs; del inglés *hematopoietic stem cells*), todos los demás tratamientos con células troncales están actualmente considerados como experimentales.

Existen varios tipos de células troncales que están siendo usadas en investigación y en medicina regenerativa hoy día (83,89). El descubrimiento de las células troncales embrionarias (ESCs) hace unas décadas (90–92), hizo que se crearan esperanzas por considerarlas una fuente potencial de células inestimable. Las ESCs son células pluripotentes que derivan de la masa celular interna del blastocisto

durante la gastrulación y, aunque todavía existe cierto desconocimiento sobre los mecanismos que regulan su diferenciación hacia otro tipo de células y su estabilidad a lo largo del tiempo, investigadores y científicos están explorando formas de diferenciar ESCs en estirpes de gran interés médico y biológico (sistema nervioso, páncreas, corazón) puesto que todos ellos se regeneran pobremente en un intento de repararse después de un grave daño o de una enfermedad degenerativa.

Otra alternativa que ha levantado mucha expectación y se baraja como una de las posibles vías de terapia celular es la reprogramación de células troncales adultas mediante las células pluripotentes inducidas (iPSCs, del inglés *induced pluripotent stem cells*). Ésta consiste en manipular una célula adulta y reprogramarla para que pierda su identidad y entre en un estado pluripotente, similar al de las células embrionarias sin necesidad de recurrir a óvulos ni embriones. Yamanaka y colaboradores (93) en el 2006 lo demostró mediante la introducción de cuatro genes en el ADN celular (*Figura 9*). Desde entonces, diversas investigaciones han obtenido los mismos resultados con la utilización de dos o tres genes o introduciendo en las células solamente las proteínas codificadas por los genes elegidos.

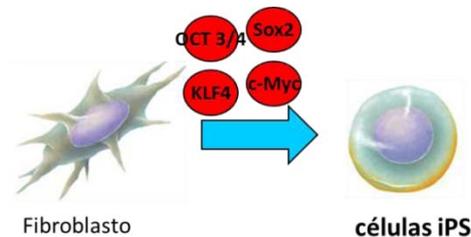


Figura 9: Diagrama simplificado de la reprogramación de una célula adulta (fibroblasto) a célula pluripotente inducida (iPS).

Sin embargo, los científicos se encuentran con una serie de adversidades que limitan, por ahora, la aplicación clínica de las ESCs y las iPS. La formación de tumores en los modelos animales utilizados; los problemas de histocompatibilidad; el uso de oocitos y embriones deben ser investigadas en profundidad antes de poder ser usadas para generar células troncales de interés en Terapia Celular y Medicina Regenerativa.

Es por ello que la obtención de células troncales del tejido adulto parece, a día de hoy, la opción más aceptada éticamente, sencilla y segura para su uso en Terapia Celular, representando una oportunidad de curar un amplio rango de enfermedades humanas significativas como el Parkinson, distrofia muscular, esclerosis múltiple, diabetes, infarto de miocardio, para las cuales existen únicamente terapias que sólo alivian los síntomas o retrasan la progresión de la enfermedad.

1.3.1. TERAPIA CELULAR EN LA ISQUEMIA CRÓNICA CRÍTICA DEL MIEMBRO INFERIOR

La isquemia tisular provoca la falta de oxígeno y nutrientes, limitando la viabilidad y función del tejido donde se produce. La respuesta natural del organismo frente a este fenómeno tiene lugar mediante un perfecto equilibrio entre la producción y liberación de diversos factores proangiogénicos y antiangiogénicos, los cuales varían en función de las necesidades del tipo de tejido junto con la movilización y reclutamiento de células circulantes que facilitan el desarrollo de nueva vasculatura.

En condiciones fisiológicas normales, la neovascularización abarca tres procesos distintos conocidos como vasculogénesis, angiogénesis y arteriogénesis (*Figura 10*).



Figura 10: Mecanismos fisiológicos de formación de nuevos vasos. Fuente: Imagen modificada de LLevadot et al 2002 (94)

La vasculogénesis hace referencia a la generación de nuevos vasos *de novo* a partir de células progenitoras vasculares (hemangioblastos), transformándose en células endoteliales (ECs), células del músculo liso y pericitos durante el desarrollo embrionario (95). Recientemente se ha observado que la vasculogénesis no ocurre

exclusivamente durante el estado prenatal de desarrollo, sino que el proceso también se encuentra activo durante la etapa adulta (96).

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos a partir de vasos preexistentes por proliferación y migración de EC diferenciadas. A menudo suelen usarse incorrectamente como sinónimos los términos de vasculogénesis y angiogénesis, siendo realmente dos procesos distintos.

Cuando tiene lugar la obstrucción de un gran vaso, las conexiones colaterales arteriolas preexistentes incrementan su tamaño y calibre, teniendo lugar lo que se ha definido como arteriogénesis.

En pacientes con CLI, la respuesta fisiológica no es capaz de suministrar la cantidad de flujo sanguíneo y oxígeno al miembro afectado, causando que las arteriolas de estos pacientes se dilaten al máximo y se vuelvan insensibles a los estímulos provasodilatadores (97). Este fenómeno, referido como parálisis vasomotora, se considera el resultado de la exposición crónica a factores vasorelajantes en pacientes con enfermedades vasculares (97). Así mismo, los vasos sanguíneos de los pacientes con CLI presentan una disminución en el grosor de la pared, en el área de sección transversal y en el ratio pared-luz del vaso entre otros (97) (Tabla 3).

Tabla 3: Patofisiología de la CLI

Cambios macrovasculares	Cambios microvasculares
Aterosclerosis	↓ Producción de ON
Estenosis arterial	↑ EROS
Angiogénesis	↑ producción de peroxinitritos
Arteriogénesis	↑ activación plaquetaria
↑ VEGF	↑ adhesión leucocitaria
↑ SDF-1	Trombosis microvascular
↑ expresión CXCR4	Colapso precapilar de las arteriolas
↑ perfusión de la piel	Intercambio de oxígeno
Parálisis vasomotora	deteriorado
Remodelación arterial	
↓ grosor pared del vaso	
↓ área de sección transversal	
↓ ratio pared-lumen	
Edema	

CXCR4: Receptor 4 de quimiocina CXC; SDF-1: Factor derivado de célula estromal 1; VEGF: factor vascular de célula endotelial; ON: Óxido Nítrico.
 Fuente: Adaptado de Varu et. al 2010.

El uso de las células troncales en el tratamiento de la CLI tiene como fin la estimulación de la neovascularización en el área de la isquemia severa (98). El procedimiento consiste en la administración de células en los tejidos isquémicos con el fin de que se diferencien para formar nuevas estructuras vasculares y/o segreguen diversos factores angiogénicos que regulen el proceso y favorezcan el reclutamiento de nuevas células. Al promover la formación de vasos sanguíneos colaterales se busca la mejoría del flujo sanguíneo en el tejido isquémico, así como aliviar los síntomas de la enfermedad y en la mayoría de los casos, prevenir la amputación del miembro afectado en pacientes que no responden a los tratamientos convencionales.

El objetivo principal de este proceso es sobre todo regenerativo, reparador e inmunomodulador.

En los últimos años, las investigaciones que se han llevado a cabo han demostrado que es posible mejorar la perfusión tisular mediante un procedimiento denominado angiogénesis terapéutica. Este término fue introducido por Hockel y colaboradores (99) para describir la inducción o estimulación de neovascularización orientada al tratamiento o prevención de situaciones patológicas caracterizadas por hipoperfusión o hipovascularización local o regional. Actualmente, es una de las estrategias utilizadas para la proliferación de los vasos colaterales.

La angiogénesis terapéutica puede ser inducida mediante el uso de células troncales vivas, por lo que el trasplante de éstas ha sido propuesto como una posible alternativa terapéutica para la regeneración vascular en patologías isquémicas. A este respecto, una variedad de células han sido propuestas (100).

Una de las poblaciones celulares más usadas son las células troncales derivadas de la médula ósea (BM-MNCs, del inglés *bone marrow mononuclear cells*), las cuales incluyen a todas las células de la MO que tienen un núcleo unilobulado o redondo sin gránulos en su citoplasma (101). Esta definición excluye a los precursores mieloides y de células rojas, pero incluye progenitores hematopoyéticos con distintos niveles de maduración y multipotencialidad, así como a un grupo heterogéneo de células troncales como HSCs, MSCs, hemangioblastos y EPCs

(102)(Figura 11). Pueden ser usadas en crudo, sin fraccionar o bien separando la población mononuclear mediante un gradiente de densidad (103).

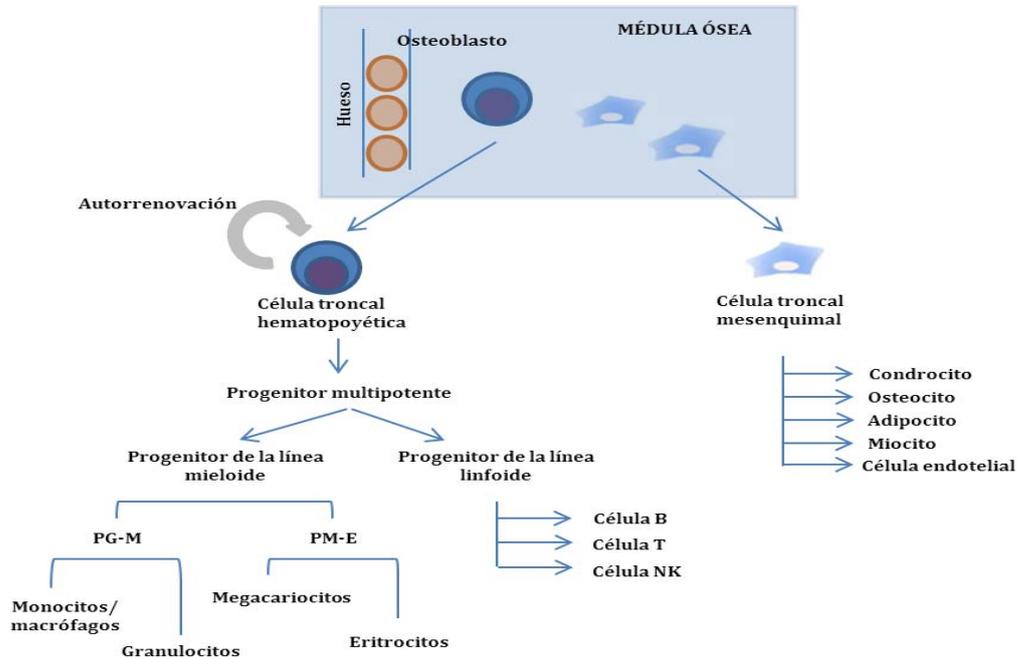


Figura 11: Células mononucleadas de la médula ósea. Las HSCs residen en la MO tanto en el nicho endosteal cerca de los osteoblastos o adyacentes a células estromales derivadas de MSCs, las cuales también residen en la cavidad medular. PG-M: progenitor de granulocitos/macrófagos. PM-E: progenitor de megacariocitos/eritrocitos. Adaptado de Yin Li J et al 2006 (104).

Asahara y colaboradores fueron los primeros en demostrar que la vasculogénesis post-natal era posible mediante las EPCs (105). En modelos animales isquémicos de miembros inferiores, el trasplante de EPCs ha mostrado ciertos beneficios en relación a la neovascularización (106,107). Debido al bajo número de EPCs circulantes, algunos estudios han intentado estimular su liberación desde la MO usando el factor estimulante de monocitos y granulocitos o GM-CSF por sus siglas en inglés (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) (108) o utilizando la fracción de EPCs enriquecida en receptores CD34 y CD133 (109,110). Aunque la caracterización de las EPCs no está claramente definida, las BM-MNCs están siendo usadas en ensayos clínicos para estudiar la neovascularización terapéutica para CLI como reservorio de células vasculogénicas (111).

1.3.2. USO DE LAS MSCs COMO MEDICAMENTO CELULAR

Entre las células troncales adultas, las MSCs son las células más utilizadas en medicina regenerativa constituyendo un área de investigación en expansión en la última década, debido a sus propiedades biológicas únicas.

En 1968, Friedenstein y colaboradores (112) aislaron del estroma de la MO unas células fusiformes clonogénicas y adherentes, a las que llamaron unidades formadoras de colonias de fibroblastos (UCF-F). Dichas células mostraban la habilidad de autorenovarse y tenían la capacidad de diferenciarse en células del linaje mesodérmico, como adipocitos, osteoblastos, condrocitos y células estromales conectivas. Recientemente, varios estudios han demostrado que células precursoras estromales multipotenciales también pueden diferenciarse en otras líneas como la ectodérmica (células epiteliales, células gliales) (113,114) o endodérmica (células musculares, hepatocitos etc) (115). Chen y colaboradores fueron los primeros en reportar la habilidad de estas células para diferenciarse en células de islotes pancreáticos (116), mientras que Chao y su equipo consiguieron transdiferenciar MSCs que expresaban insulina y glucagón (117). Es por ello que fueron las primeras en ser consideradas células troncales o “*stem cells*” por Caplan (118) y llamadas “células madre mesenquimales (MSCs)” debido a su potencial de diferenciación multipotente. Posteriormente han sido nombradas de diversas formas, debido a la falta de una definición concreta de estas células (*Tabla 4*).

Tabla 4: Nomenclatura de las MSCs

MSC nomenclatura	Año	Autores	Referencias
CFU-F and osteogenic stem cells	1970	Friedenstein et al.	(117)
Stromal stem cells	1988	Maureen Owen et al.	(118)
Mesenchymal stem cells	1991	A. Caplan	(116)
Mesenchymal Progenitor cells (MPCs)	1999	James Dennis et al.	(119)
Skeletal stem cells	2000	Paolo Bianco and Pamela Gehron Robey	(120)
Multipotent Adult Progenitor cells (MAPCs) and mesodermal progenitor cells	2002	Yuehua Jiang et al.	(121)
Multipotent mesenchymal stromal cells	2006	International Society for Cellular Therapy (ISCT)	(122)
Medicinal signaling cells	2010	A. Caplan	(123)

En cualquier caso, actualmente es ampliamente aceptado que los cultivos de MSCs representan una población heterogénea de células progenitoras no hematopoyéticas multipotentes con distintos grados de “stemness”, derivadas de la capa germinal mesodérmica, clásicamente expandidas *in vitro* aprovechando su adherencia al plástico y las cuales no expresan una serie de marcadores de superficie.

Debido a diferencias en su definición y en los protocolos para cultivarlas *in vitro*, en 2006 la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) estableció unos criterios mínimos para definir las (119) (Figura 12).

- Adherencia al plástico en cultivos *ex vivo*
- Morfología fibroblástica
- Expresión de marcadores de superficie (positivas para CD105, CD73, CD90; ausencia de los marcadores hematopoyéticos CD34, CD45, CD14, HLA-DR)
- Capacidad de diferenciación *in vitro* a linaje mesodérmico, es decir, adipocítico, osteocítico y condrogénico entre otros.

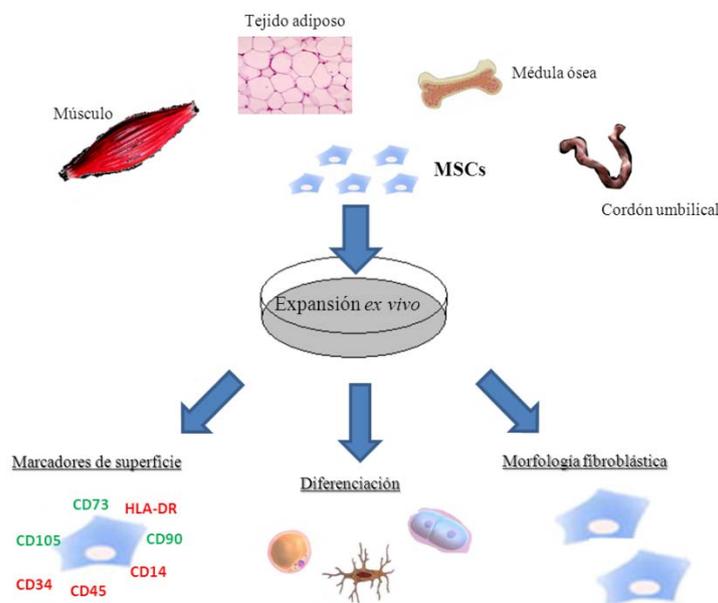


Figura 12. Características de las MSCs. Las MSCs pueden ser aisladas de diferentes fuentes y expandidas *ex vivo*. Presentan una serie de marcadores de superficie (CD73, CD90 y CD105) y ausencia de los marcadores hematopoyéticos (CD14, CD34, CD45, HLA-DR). Poseen capacidad de diferenciación, así como una morfología fibroblástica cuando se adhieren al plástico.

Sin embargo, la mayoría de los marcadores enumerados se encuentran igualmente en células fibroblásticas de cualquier tejido (120) y aunque moléculas como CD146 (121), STRO-1 y CD271 (122) han sido utilizadas para marcar estas células, hoy día sigue sin existir un consenso universal en el perfil de marcadores de expresión en superficie para las MSCs.

Los efectos terapéuticos de las MSCs parecen basarse en sus propiedades paracrinas, inmunomoduladoras y en su capacidad de diferenciación (*Figura 13*).

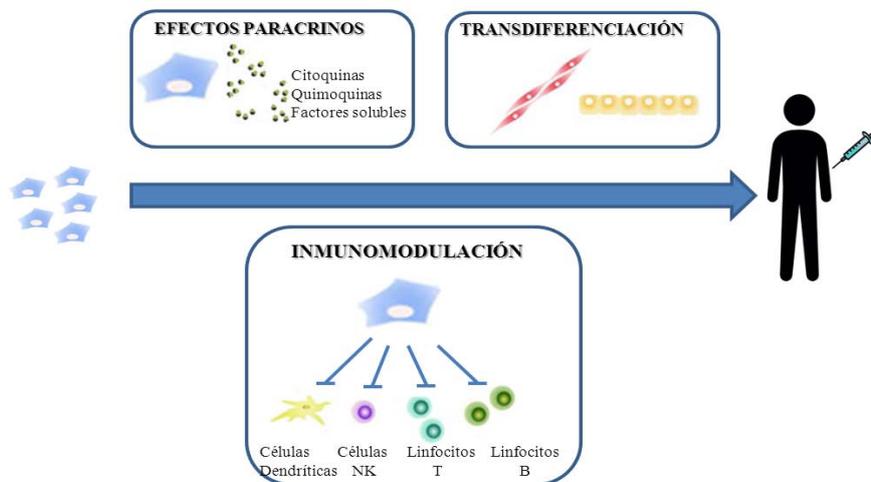


Figura 13. Propiedades de las MSCs. Las MSCs se caracterizan por secretar diversas moléculas bioactivas, poseen capacidad inmunorreguladora y han demostrado su capacidad de diferenciación a distintos tipos celulares.

Aunque inicialmente se pensaba que la supervivencia de las MSCs, su injerto permanente y su diferenciación en células residentes del tejido dañado era necesario para obtener los efectos beneficiosos de dichas células, varias investigaciones y la experiencia clínica muestran que una de las principales funciones de las MSCs, si no la más importante, es secretar diversas moléculas bioactivas relacionadas con el microambiente en el que se encuentran inmersas. Las MSCs secretan una amplia variedad de citoquinas pro y anti-inflamatorias, quimoquinas, factores de crecimiento y prostaglandinas bajo condiciones de “descanso” e inflamatorias (123). Estas moléculas se encuentran asociadas con las diversas propiedades de las MSCs, como la inmunomodulación, antiapoptosis,

angiogénesis, soporte del crecimiento y diferenciación de células madre y progenitoras, antifibrosis y quimioatracción.

Otra característica de las MSCs es que poseen capacidad inmunorreguladora, y provocan efectos inmunosupresores en cierto número de ocasiones. Se les considera inmunoprivilegiadas por tener una baja expresión de MHC-HLA clase I, mientras que son constitutivamente negativas para HLA-clase II; así mismo, no expresan moléculas co-estimuladoras como CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD40 y CD40L (124). Sin embargo, las MSCs comparten con el epitelio del timo marcadores de expresión de superficie como VCAM-1, ICAM-2, LFA-3, que son cruciales para la interacción con células T (124,125). Además, interfieren en diferentes vías de la respuesta inmune por medio de interacciones directa célula-célula y por la secreción de factores como indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO), TNF α , IL-6, IL-10, prostaglandina-E2, HGF, HLA-G5.

Las MSCs permanecen en un estado quiescente mostrando propiedades antiapoptóticas y contribuyendo a la homeostasis. Sin embargo, en un ambiente inflamatorio como el creado por las citoquinas IFN- γ , TNF α , IL-1 α e IL-1 β , comienzan a ejercer sus habilidades de inmunomodulación a través de la polarización, inhibiendo la proliferación de células efectoras y su producción de citoquinas. *In vitro*, se ha observado que las MSCs inhiben la proliferación de células T, células B, células NK (natural killer) y células dendríticas (DC), produciendo lo que se conoce como bloqueo de la división celular. Por otra parte, las MSCs pueden detener una variedad de funciones celulares inmunes, como la secreción de citoquinas y la citotoxicidad de las células T y NK; la maduración de las células B y la secreción de anticuerpos; la maduración y activación de las células DC; así como la presentación de antígenos.

Asimismo, las MSCs muestran otro papel en el contexto inmune/inflamatorio: cuando un tejido sufre una lesión o daño, las MSCs entran en la circulación sanguínea atraídas por citoquinas proinflamatorias de las áreas dañadas. Por esta razón, es por la que llaman a las MSCs "*guardianas de la inflamación*" (126). En este proceso interviene el citoesqueleto, moléculas de la matriz extracelular, contactos intercelulares, ligandos de adhesión y receptores entre otros (127). Aunque los mecanismos precisos por los que las MSCs migran a los sitios específicos y cruzan

la barrera celular endotelial son prácticamente desconocidos, es lógico pensar que quimoquinas y sus receptores estén implicados.

MSCs derivadas de distintos tejidos han demostrado su capacidad de diferenciación endotelial (128). Dicha diferenciación puede ser estimulada por factores de crecimiento como el VEGF y fuerza de rozamiento. Además, existe una compleja interacción “*cross-talk*” entre las MSCs y las células endoteliales (ECs). Las MSCs aumentan la proliferación y migración de las ECs, promoviendo los eventos tempranos de la angiogénesis y disminuyendo la permeabilidad de la monocapa de ECs. En co-cultivos directos de MSCs y ECs, las MSCs incrementaron la persistencia de vasos sanguíneos preexistentes en una manera dosis-tiempo dependientes. Dichos vasos permanecieron estables durante 10 días (129). Así mismo, se ha demostrado que el medio condicionado de MSCs también estimula la proliferación de ECs locales (130). Igualmente, además del contacto directo que manifiestan estas células, se ha especulado con una posible transferencia de mitocondrias o componentes vesiculares que contienen mRNA, microRNA y proteínas (131).

Debido a las diversas propiedades y características de las que disponen estas células, las MSCs se presentan como potenciales candidatas para su utilización en terapia celular.

En cuanto a las fuentes de obtención de MSCs, éstas han sido aisladas de una gran variedad de tejidos como MO, sangre periférica, cordón umbilical, tejido adiposo, placenta, pulmones, pulpa dental, membrana amniótica, tejido fetal entre otros. Posiblemente se encuentren en todos los órganos y tejidos post-natales (132), colaborando en la reparación y soporte de los tejidos, contribuyendo de esta forma a la homeostasis tisular. Aunque se desconoce su origen exacto, existen numerosas evidencias que apuntan a que las células progenitoras mesenquimales se encuentran localizadas en una zona perivascular (133) en un estado quiescente, asegurando así el mantenimiento de la homeostasis.

Como hemos comentado anteriormente, la biología de las MSCs ha creado confusiones y controversias en torno a su nomenclatura, definición, aislamiento y criterios de caracterización, así como su relevancia *in vivo* y en cuanto a su

regulación ética e institucional de su uso clínico. En un intento por estandarizar estos estudios, la ISCT en 2006 estableció unos criterios mínimos. Estos estándares sin embargo, no han sido ampliamente aceptados y los criterios de aislamiento e identificación continúan variando, haciendo difícil la comparación entre estudios. MSCs de distintos orígenes, aunque disponen de un fenotipo similar, exhiben un alto grado de variabilidad relacionado con sus propiedades biológicas de diferenciación, autorenovación y secreción de factores entre otros (87).

Diversas investigaciones reportan que éstas varían en cuanto a número según el método de aislamiento y obtención; se encuentran diferencias en sus capacidades proliferativas; diferente potencial de diferenciación; fenotipo alterado. Así mismo, existen suficientes evidencias para creer que las MSCs derivadas de pacientes con edad avanzada tienen limitada su eficacia terapéutica y algunos estudios sugieren que la diferencia entre los resultados preclínicos y clínicos se deben a la edad del donante.

En la *Tabla 5* se resumen las características biológicas de las MSCs y las diferencias encontradas en varios estudios que corroboran la diversidad existente en este tipo celular según su fuente de origen.

Tabla 5: Diferencias principales entre las MSCs derivadas de médula ósea, tejido adiposo y cordón umbilical.

<i>Características biológicas</i>	BM-MSCs	AD-MSCs	UCB-MSCs
Método de obtención	Invasivo (poco accesible, dentro de hueso)	Menos invasivo (accesible: subcutáneo)	No invasivo
Método de aislamiento	Separación mediante Ficoll	Disgregación mecánica y enzimática del tejido	Disgregación mecánica y enzimática del tejido
Senescencia	Temprana	Temprana	Tardía
Nº de células en cada tejido	Bajo	Alto	Bajo
Proliferación	++	+++	+++
Seguridad (teratomas)	No tumorogénica	No tumorogénica	No tumorogénica
Origen	Adulto	Adulto	Fetal
Inmunomodulación	++	+++	+++
Antiinflamatorias	++	+++	+++
Propiedades tróficas	++	+++	+++

BM-MSCs: Células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea; AD-MSCs: células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo; UCB-MSCs: células troncales mesenquimales derivadas de sangre de cordón umbilical.

1.3.3. ANTECEDENTES PRECLÍNICOS

La administración de MSCs autólogas, alogénicas y xenogénicas derivadas de diversas fuentes tales como MO, sangre de cordón umbilical, membrana fetal y tejido adiposo han demostrado ser beneficiosas en modelos de ratón y rata con isquemia en sus miembros inferiores (14).

A este respecto, existen estudios que apoyan que las MSCs ejercen propiedades angiogénicas debido a efectos autocrinos y paracrinos, y cuya intensidad parece depender de la fuente de obtención de dichas células. En un estudio comparativo de MSCs procedentes de la MO y MSCs derivadas de tejido adiposo, éstas últimas secretaron mayor cantidad de VEGF, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y TGF- β (14). Así mismo, el medio condicionado de MSCs derivadas de tejido adiposo contiene niveles más altos de metaloproteasas (MMP3 y MMP9) y mostraron un aumento de la formación de tubos *in vitro* que las MSCs derivadas de MO (134).

Además del trasplante de MSCs no modificadas, el efecto de MSCs expuestas a distintas condiciones y estímulos también ha sido investigado (135–139). Por ejemplo, bajo condiciones de hipoxia, como la generada en la isquemia, las MSCs producen más VEGF que en condiciones de normoxia, y el trasplante de estas células en el miembro isquémico de ratón conduce a un aumento de la densidad capilar.

Un factor crítico es la dosis celular empleada así como la ruta de administración. En los estudios preclínicos consultados predomina el millón de MSCs como la dosis más utilizada, siendo la ruta intramuscular la más común (140).

Así mismo, el momento de la administración celular en relación a la inducción de la isquemia y el número de zona/s de infusión también varía en los diferentes estudios publicados. Cabe destacar el trabajo realizado por Moon y colaboradores (140) donde la infusión celular se realiza a los 7 días después de la inducción de la isquemia, aspecto que lo diferencia de otras investigaciones donde la infusión celular se llevó a cabo antes de las 24 horas de la inducción de la patología.

Prácticamente todos los estudios preclínicos han usado imágenes obtenidas mediante láser Doppler para evaluar la perfusión del miembro tratado, así como

ensayos funcionales e histológicos para evidenciar la capacidad angiogénica de las MSCs.

Aun así, no hay que olvidar que, aunque en modelos animales los resultados son prometedores, hay que ser cuidadoso en la interpretación de los resultados ya que los modelos no siempre reproducen con suficiente fidelidad la etiopatogenia y mecanismos de la enfermedad humana.

1.3.4. ANTECEDENTES CLÍNICOS

La eficacia y los datos toxicológicos obtenidos de los ensayos e investigaciones preclínicas proporcionan una plataforma para el inicio de ensayos clínicos en seres humanos con células troncales, y por consiguiente, con MSCs.

En el año 2002 se publicaron los resultados del estudio TACT (*Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation*), por Tateishi-Yuyama y colaboradores (111). Dicho estudio demostró que la inyección intramuscular de la fracción mononucleada de células de MO (BM-MNCs) autólogas en las áreas afectadas en pacientes con isquemia unilateral de la pierna (25 pacientes) y 22 pacientes en los que se randomizó el tratamiento aplicado a cada pierna, mejoró significativamente el ITB, la $ptcO_2$ y el dolor en reposo en todos los miembros que recibieron terapia celular derivada de MO. Los pacientes con una diabetes no controlada fueron excluidos. Desde entonces, se han llevado a cabo diversos estudios en los que la utilización de células procedentes de la MO han demostrado su eficacia con respecto a la mejora de la función endotelial de arterias en los territorios en los que se administran (141) y mejorías en la clínica del dolor isquémico así como en la cicatrización de úlceras por isquemia (142) (*Tabla 6*).

Tabla 6: Ensayos clínicos controlados y randomizados con células troncales para CLI

Referencia	Tipo celular	N	Ruta administración	Observaciones
Tateishi-Yuyama et al. (2002)(110)	BM-MNCs	22	IM	Mejora en el ITB, tcpO ₂ , dolor en reposo
Huang P. et al. (2005)(142)	PB-MNC movilizada con G-CSF	28	IM	Mejora en el ratio de amputación, cicatrización de úlceras
Ruiz-Salmerón R et al. (2008)(83)	BM-MNC	20	IA	Mejora en ITB, tcpO ₂ aumento vascularización, cicatrización úlceras
Prochazka V. et al. (2010)(143)	BM-MNCs	96	IM	Disminución en el ratio de amputación
Perin EC. Et al. (2011)(144)	ALDH+BM-MNCs	21	IM	No relación entre la dosis y la reducción del ratio de amputación
Walter DH et al. (2011)(145)	BM-MNCs	40	IA	Mejora en la escala de dolor, cicatrización de úlceras
Benoit E et al. (2011)(146)	BM-MNCs	48	IM	No cambios en ITB o supervivencia libre de amputación
Lu D et al. (2011)(147)	BM-MSC, BM-MNCs	41	IM	Cicatrización de úlceras más rápida con BM-MSCs
Ozturk A et al. (2012)(148)	PB-MNC movilizada con G-CSF	40	IM	Mejora en ITB, escala de dolor
Losordo DW et al. (2012)(149)	CD34+ PB-MNC	28	IM	Dosis relacionada con disminución de amputación
Gupta PK et al. (2013)(150)	BM-MSC alogénicas	20	IM	Mejora en ITB

BM-MNCs: células mononucleadas de médula ósea; IM: intramuscular; ITB: índice tobillo-brazo; tcpO₂: presión transcutánea de oxígeno; PB-MNC: células mononucleadas de sangre periférica; G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos; IA: intraarterial; ALDH: aldehído deshidrogenasa. N: número de pacientes.

En 2006, Kim y colaboradores (143) utilizaron MSCs derivadas de cordón umbilical (UC-MSCs) alogénicas en 4 pacientes con enfermedad de Buerger. Tras su administración intramuscular, estas células mejoraron el tiempo de

recuperación de las úlceras, aumentaron la perfusión en el miembro y aliviaron los síntomas del dolor en reposo.

Lu y colaboradores (144) en 2011 compararon el efecto terapéutico de la administración intramuscular autóloga de BM-MSCs con BM-MNCs en 20 pacientes diabéticos con EAP severa. Los autores concluyeron que la tasa de curación de las úlceras fue significativamente superior en el grupo que fue tratado con BM-MSCs. Igualmente, las úlceras del grupo tratado con BM-MSCs sanaron 4 semanas antes que las tratadas con BM-MNCs. No se experimentó ningún tipo de reacción adversa en ninguno de los tipos celulares utilizados en este estudio.

En 2012, Lee y colaboradores demostraron la factibilidad y seguridad del trasplante de AD-MSCs autólogas en pacientes con enfermedad de Buerger y pie diabético(145).

En ese mismo año, Lasala y colaboradores publicaron los resultados de un ensayo clínico en fase II (#NCT00721006, www.clinicaltrials.gov), en el que se evaluaba la eficacia y seguridad de la administración intramuscular autóloga de una combinación de células troncales (MSCs y EPCs) en 26 pacientes con CLI bilateral.

Actualmente, y según la búsqueda realizada en los registros de los Institutos Nacionales de Salud (NIH del inglés *National Institutes of Health*) en la base de datos de los ensayos clínicos registrados en ClinicalTrials.gov (www.clinicaltrials.gov) existen más de 500 ensayos clínicos relacionados con MSCs. En 2012, Wang y colaboradores reportaron 206, doblándose este número en la actualidad (146). Este abrumador crecimiento por parte de la comunidad científica apoya el remarcable potencial que acreditan estas células en el tratamiento de diversas enfermedades, posibilitando así su traslación de la investigación básica a la clínica. La mayoría de estos ensayos se encuentran todavía en sus fases iniciales (fase I, I/II, o II), los cuales incluyen estudios de seguridad y/o efectividad en un número limitado de pacientes. Esto nos demuestra que el uso terapéutico de las MSCs se encuentra cada vez más cerca, aunque aún hay esperar los resultados de dichos ensayos clínicos.

En cuanto al uso de las MSCs como terapia celular en la CLI, se encuentran registrados 17 ensayos clínicos en todo el mundo, siendo Europa actualmente el

continente que se encuentra a la cabeza con 6 de ellos. De esos 17, sólo 6 se encuentran dirigidos a la población diabética, ya sea DM1, DM2 o ambas (Figura 14.A), tal y como muestran los criterios de inclusión de dichos ensayos. En relación al tejido fuente de obtención de las células para la terapia, 8 de los ensayos utilizan MSCs derivadas de la MO, 6 AdMSCs, 1 MSCs endometriales y 1 UCMSCs (Figura 14.B).

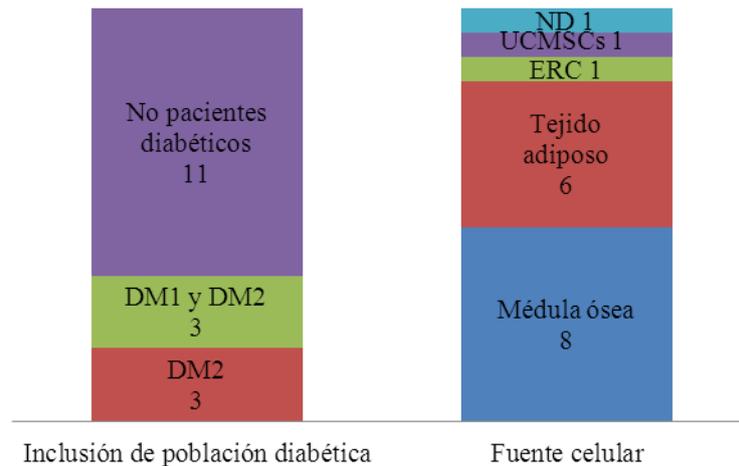


Figura 14. A) Inclusión de población diabética en los ensayos registrados para la patología de CLI. B) Tejido fuente para la obtención de MSCs en los ensayos registrados para la CLI. (n=17). ND: No datos. UCMSCs: células mesenquimales procedentes de cordón umbilical. ERC: células endometriales. Fuente: www.clinicaltrials.gov.

Aunque el uso de las MSCs para el tratamiento de CLI es un concepto terapéutico relativamente nuevo, existen numerosos datos disponibles de estudios preclínicos y recientes ensayos clínicos que avalan los efectos terapéuticos de las MSCs, así como su uso seguro y factibilidad. Por esta razón, la utilización de MSCs está tomando gran importancia a la hora de utilizar terapia celular para la regeneración vascular en patologías isquémicas. Por otra parte, el efecto antiinflamatorio, inmunomodulador y el carácter multipotencial de estas células han demostrado ser capaces de resolver casos puntuales para los que hasta ahora no se tenía una oferta terapéutica mejor.

1.3.5 TERAPIA CELULAR EN LA ISQUEMIA CRÓNICA CRÍTICA: NUESTRA EXPERIENCIA

Numerosos estudios han demostrado ampliamente que tanto la DM1 como la DM2 se asocian con una función dañada así como una reducción en el número de células progenitoras derivadas de la MO (147,148). Diversas investigaciones han concluido que factores de estrés metabólico, diferentes de la hiperglucemia, son también relevantes a este respecto. Las LDL oxidadas, las ERO y la incrementada concentración de ácidos grasos que tiene lugar en el paciente diabético afectan a la migración, proliferación y senescencia de las células progenitoras derivadas de la MO (147,149–151). Así mismo, se ha establecido que un aumento en la HbA1c se encuentra inversamente correlacionado con la proliferación, adhesión e incorporación en estructuras vasculares de las EPCs (148,152).

En el año 2007, momento del diseño del ensayo en el que se basa esta memoria, existían muy pocos estudios realizados en población diabética con la patología que describimos en esta tesis. Debido a que la prevalencia de la EAP y por tanto de la CLI se encuentra incrementada en pacientes con DM, es lógico asumir que este grupo poblacional es candidato potencial a las terapias anteriormente sugeridas. Sin embargo, en la mayoría de los estudios publicados consultados en su momento, la exclusión de dichos pacientes en las diferentes investigaciones por las razones listadas anteriormente resultó ser bastante común.

Bajo este contexto, y debido a la experiencia acreditada por nuestro grupo de investigación en relación con la DM y sus complicaciones asociadas, nuestro grupo de trabajo diseñó un ensayo piloto en 2008 (# NCT00872326 www.clinicaltrials.gov) el cual se basó en la extracción de células mononucleadas autólogas procedentes de la MO de pacientes diabéticos con CLI sin opciones de revascularización. La población celular fue concentrada en el laboratorio e infundida intraarterialmente en el área isquémica afectada, tal y como plantearon en 1999 Isner y Asahara (153) (*Figura 15*). De esta forma, se pretendía dar solución a alguno de los problemas planteados anteriormente comentados y que tienen lugar en los pacientes diabéticos, como son el reducido número de progenitores derivados de la MO y su reducida actividad migratoria.



Figura 15. Hipótesis implantación celular en la zona afectada. Fuente: imagen modificada de Isner JM, Asahara T (153).

Los pacientes diabéticos con CLI mostraron mejoras en el cuadro clínico asociado a dicha patología como cicatrización de las úlceras; aumento en la vascularización y consecuentemente en la temperatura del miembro; aumento en la $tcpO_2$; aumento en el ITB; y ningún paciente precisó amputación mayor. A diferencia de otros estudios, la vía intrarterial fue la elegida en este ensayo y la dosis celular fue 10 veces menor de la dosis utilizada por otros grupos. Además, sorprendentemente, 6 de los pacientes diabéticos que recibían insulina, redujeron la necesidad de ésta.

Tras el ensayo piloto descrito, nuestro grupo de investigación se planteó el uso de una sola de las poblaciones existentes en el conjunto celular de la MO como fuente para la terapia celular, como son las MSCs. Puesto que las MSCs procedentes de la MO son obtenidas bajo un método invasivo, y además se encuentran en un número reducido en este nicho celular (representan entre el 0.01 y el 0.001% de las células mononucleadas de la MO), se buscaron fuentes celulares alternativas para su obtención, como resultó ser el tejido adiposo. Según Gimble y colaboradores (154), las AdMSCs serían una fuente celular idónea para su uso médico debido a que son más abundantes en este tejido, su obtención resulta menos invasiva, tienen la capacidad de diferenciarse en varias líneas celulares, son fáciles de cultivar y pueden ser trasplantadas de manera tanto autóloga como alogénica de forma segura. Así mismo, debido a sus propiedades tróficas, inmunomodulatorias y antiinflamatorias, las AdMSCs suponían una fuente celular prometedora para la patología descrita.

Para este nuevo ensayo se contó con las instalaciones GMP de CABIMER acreditadas por la AEMPS para el cultivo y expansión celular.

Puesto que la CLI es más acusada en los pacientes diabéticos, en el momento del diseño del ensayo en el que se basa esta tesis, también se tuvo en cuenta que la hiperglucemia crónica presente en la DM resulta en una remodelación vascular anormal y una neovascularización alterada (155–157), teniendo lugar una angiogénesis “deficiente” o “aberrante” (158). Esto se debe, entre otras cosas al estrés oxidativo asociado, la disfunción endotelial subyacente y a la falta de regeneración del endotelio (159). De forma adicional, la respuesta angiogénica endógena en los pacientes diabéticos no es suficiente para satisfacer plenamente las necesidades metabólicas de los tejidos afectados, originándose síntomas de isquemia. Esto se debe, entre otras causas, a una menor expresión de VEGF en el miembro afectado. Esto puede observarse en distintos modelos animales, tales como conejos hipercolesterolémicos homocigotos (160,161), donde la administración exógena de este factor se asoció con una mejoría significativa de la respuesta angiogénica.

En este sentido, las MSCs derivadas de tejido adiposo han demostrado mejorar la perfusión en modelos animales isquémicos (134). Datos recientes apuntan a que los efectos terapéuticos de estas células en patologías isquémicas se deben a la secreción de moléculas angiogénicas a niveles bioactivos y a su habilidad de restaurar el microambiente del área dañada. La proliferación de las ECs y la inhibición de la apoptosis es crítica para el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (162), por lo que la secreción de factores de crecimiento por parte de las MSCs en el tejido isquémico es posible que promueva la angiogénesis. Así mismo, la angiogénesis y el crecimiento colateral de la red vascular probablemente requieran la actuación de múltiples factores a la vez. En este contexto, la secreción de factores angiogénicos y antiapoptóticos como VEGF y HGF los cuales se sabe que actúan de forma sinérgica (161) por parte de las MSCs, hace que las consideremos una herramienta válida para la terapia angiogénica. De igual manera, la habilidad adicional de responder a estímulos tales como la hipoxia les permite adaptarse al ambiente en el cual son inyectadas, modulando la producción de VEGF en respuesta a la isquemia cuando la nueva vasculatura se está formando.

La angiogénesis es un proceso que consta de varias etapas como son: invasión de las ECs, proliferación, migración, formación del tubo y maduración. Todas estas fases han sido reproducidas *ex vivo* y se ha observado que las MSCs están involucradas en todos los estados de la angiogénesis, no sólo en las primeras etapas de proliferación y migración de las ECs, sino que también actúan en las fases relacionadas con la maduración de los vasos sanguíneos (14).

Asimismo, se han descrito mediante diversas técnicas un amplio repertorio de factores angiogénicos en el secretoma de las MSCs, como son el VEGF, FGF-2, ang-1, MCP-1, IL-6, HGF, TGF- β . Además, también ha sido probado que la secreción de estos factores angiogénicos pueden ser regulados por una variedad de quimoquinas y en condiciones de hipoxia (14).

La isquemia diabética también origina lesiones tróficas en los miembros afectados. La cicatrización de las heridas y por tanto, la regeneración tisular, es un proceso multifactorial complejo, en el cual interaccionan procesos de inflamación, reepitelización, angiogénesis, deposición de matriz extracelular (ME) y remodelación. La aplicación exógena de MSCs durante el proceso de cicatrización ha demostrado tener capacidad terapéutica en modelos animales. Varios estudios han indicado una aceleración en el tiempo de cicatrización, así como una angiogénesis incrementada, re-epitelización y reclutamiento de células mieloides a la zona afectada (163). Asimismo, estudios en pacientes con DM han mostrado que las úlceras que se producen en estos individuos están asociadas con un estado inflamatorio crónico en el área afectada, provocando una desregulación en el proceso de curación (164). Las células troncales, y entre ellas las MSCs, tienen la capacidad de movilizarse y colonizar el tejido isquémico dañado donde secretan quimiocinas y factores proangiogénicos que promueven la angiogénesis y la remodelación de la ME, creando un entorno local propicio para la cicatrización de las heridas (165). De igual manera, un sistema proteolítico activo es requerido para la degradación de los coágulos de fibrina característicos de las lesiones vasculares, facilitándose así la migración celular hacia las zonas dañadas. En este sentido, las MSCs producen una amplia gama de enzimas fibrinolíticas, necesarias para la migración celular así como para la remodelación dinámica de la ME (166).

1.3.6. RIESGOS POTENCIALES EN EL USO CLÍNICO DE LAS MSCs

Las terapias celulares son especialmente complejas debido a la naturaleza del producto. El modo de acción no siempre es claro, y los ensayos de potencia son imprecisos, por los que podría no ser posible predecir completamente los riesgos.

Cuando se considera el uso de MSCs expandidas *ex vivo* para aplicaciones clínicas, es necesario tener en cuenta una serie de riesgos potenciales que podrían afectar a nuestro producto celular.

a) Inmunogenicidad y reacciones: la administración de células troncales podría afectar al sistema inmune del receptor. Dichas células podrían directamente influir en su sistema inmune (por ejemplo, en un ambiente proinflamatorio) o tener un efecto modulador. Aunque las MSCs son consideradas inmuno-privilegiadas en este sentido, la exposición durante un tiempo prolongado al medio de cultivo puede hacerlas más inmunogénicas, por ejemplo, regulando positivamente el conjunto normal de moléculas de histocompatibilidad (MHC).

Esta inmunogenicidad puede resultar impredecible en los casos en los que la administración de células no vaya a ser usada para la misma función esencial en el receptor que en el donante (uso no homólogo), o cuando se inyecten en sitios no fisiológicos.

Es evidente que el uso alogénico de las células conlleva mayor riesgo de rechazo por parte del sistema inmune. Este rechazo podría conducir a una pérdida de la función de las células administradas y consecuentemente, verse comprometida su actividad terapéutica. El uso de inmunosupresores podría limitar estos riesgos, pero a su vez podría provocar reacciones adversas debido a la medicación inmunosupresora.

En el presente ensayo, las células infundidas son de origen autólogo, es decir, provienen del mismo paciente al que posteriormente se le infunden.

Por otro lado, las MSCs aisladas de donadores sanos han mostrado propiedades uniformes y consistentes, mientras que aquellas procedentes de pacientes afectados por alguna enfermedad degenerativa y/o inflamatoria difieren en sus

características biológicas y funcionales (167). A este respecto, estudios llevados a cabo con MSCs procedentes de pacientes diabéticos, apuntan a que el ambiente hiperglucémico así como los demás desórdenes metabólicos asociados a la diabetes afectan a la reserva endógena celular, viéndose desreguladas sus capacidades de proliferación, diferenciación y capacidad angiogénica entre otras (168–170). Por el contrario, son muchas las investigaciones que han reportado beneficios con el uso de MSCs de origen autólogo en una gran variedad de enfermedades.

Una vez infundidas, las células entran en contacto directo con los tejidos, torrente sanguíneo y otras células del paciente, desconociéndose, hasta la fecha las interacciones que se producen. Puesto que la capacidad fibrinolítica de las MSCs ha sido descrita anteriormente (166), es posible que las MSCs puedan ejercer cierta influencia en el sistema de coagulación. Así mismo, se han reportado eventos relacionados con la infusión celular de MSCs, incluyendo el tromboembolismo después de su administración intravenosa (167,171,172) o intra-arterial (173).

b) Estabilidad celular: Otro factor a tener en cuenta es la estabilidad celular. En general, pases sucesivos o cultivos de larga duración inducen inestabilidad genética y transformación de las células. Varios investigadores han descrito la contribución de las MSCs en la formación de tumores (174,175). Además, algunos grupos han reportado que las hMSCs podrían desarrollar inestabilidad genética y verse sometidas a procesos de transformación después de cultivos de larga duración (176,177), aunque posteriormente se comprobó que los cultivos celulares usados en estos dos últimos estudios sufrieron una contaminación cruzada con líneas tumorales (178,179).

c) Anormalidades cromosómicas: Varios autores han descrito que las MSCs cultivadas *in vitro* pueden ser expandidas en múltiples ocasiones sin una aparente pérdida del potencial de diferenciación o alteraciones cromosómicas (180), e incluso que cultivos de MSCs de larga duración pueden desarrollar anomalías cromosómicas pero sin un evidente potencial de transformación (181).

Aunque hasta la fecha la formación de tumores en pacientes humanos no han sido descritos después de la administración de MSCs, y en nuestro ensayo no se ha dado

ningún caso, debemos tener en consideración que existen una serie de factores que pueden contribuir de manera significativa a la inducción de anormalidades citogenéticas, como son:

- Aspectos relacionados con el proceso de fabricación del medicamento celular: las condiciones del cultivo y la duración de la expansión de las células influye específicamente en la formación de anormalidades citogenéticas. Así mismo, el estrés fisiológico que sufren las células en cultivos *in vitro*, como el causado por la disociación enzimática (por ejemplo, con tripsina), plantea más problemas en relación a las anormalidades que la disociación mecánica.
- Heterogeneidad de la población de MSCs: las MSCs son células estromales adultas con un limitado número de expansiones *in vitro*, al contrario de lo que ocurre con las células embrionarias o las iPS. La población mesenquimal se compone de células en diferentes estadios de duplicación, por lo que es posible que algunas células puedan ser más proclives a desarrollar aberraciones cromosómicas.

Las células troncales comparten características con las células cancerosas, como por ejemplo, larga vida útil, resistencia relativa a la apoptosis y capacidad para replicarse por amplios periodos de tiempo. Además, tanto en el mantenimiento de las células cancerosas como en las troncales existen mecanismos de control y reguladores de crecimiento similares (182). En este sentido, las células troncales pueden ser consideradas candidatas potenciales de transformación maligna. Es debido a esto por lo que la formación de un tumor puede ser visto como un obstáculo para el uso seguro de los medicamentos basados en células troncales.

El potencial tumorigénico de un medicamento de terapia celular puede depender de factores intrínsecos y extrínsecos, tales como el sitio de administración en el paciente (debido al microambiente del receptor) y/o la manipulación del cultivo *ex vivo* (la manipulación de las células podría contribuir al potencial tumorigénico).

Desde los trabajos de Friedenstein y colaboradores (183), la MO se ha convertido en una de las fuentes principales de MSCs para multitud de investigaciones y ensayos clínicos. Además de la MO, las MSCs han sido aisladas de diferentes tejidos,

como el adiposo, sangre de cordón umbilical, pulpa dental, líquido sinovial y fluido amniótico entre otras. Todos estos tejidos varían en sus componentes celulares, señales y factores secretados, resultando en diferentes nichos fisiológicos. Aunque las MSCs aisladas y cultivadas de la mayoría de los tejidos comparten similares características inmunofenotípicas, han sido encontradas ciertas diferencias entre MSCs de distinto origen de acuerdo con datos obtenidos de experimentos *ex vivo*.

d) Procedimiento expansión: Las MSCs son típicamente cultivadas en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) o alpha-MEM con la adición de suero fetal bovino (FBS, del inglés *fetal bovine serum*) como fuente de factores de crecimiento, citoquinas y mitógenos (184). Es por ello por lo que se debe valorar los aspectos de bioseguridad de los componentes del medio de expansión utilizado para el cultivo en laboratorio de MSCs. Para la aplicación clínica, la utilización de FBS puede conllevar ciertas dificultades. El uso de proteínas bovinas se asocia con el riesgo de transmisión de zoonosis y reacciones inmunológicas potenciales en el receptor, teniendo como consecuencia un rechazo de las células, especialmente tras tratamientos repetitivos (185,186). Existe una variabilidad entre los diferentes lotes de FBS y su procedencia, lo cual podría repercutir en el grado de proliferación y obstaculizar la reproducibilidad y consistencia del proceso de producción. Además, hay que tener en cuenta el riesgo de contaminación del FBS con micoplasma, virus y especialmente la encefalopatía espongiforme bovina. Aunque actualmente el uso de FBS está permitido bajo estrictos controles de calidad y seguridad, las agencias reguladoras cada vez más, abogan por una fuente alternativa cuando sea posible.

Nuestro grupo ha desarrollado al respecto un medio químicamente definido, el cual se encuentra pendiente de patente.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente descrito y a pesar de resultados prometedores, la terapia de regeneración celular aplicada a CLI mantiene importantes interrogantes en cuanto a efectividad y seguridad. Aunque las AdMSCs muestran una serie de propiedades únicas (liberación de factores, inmunomodulación, capacidad antiinflamatoria entre otros), en el momento actual se desconoce si en la población diabética la administración de AdMSCs autólogas es eficaz para promover la vasculogénesis en el miembro isquémico ya que existen muy pocos ensayos clínicos publicados relacionados. A este respecto, el diseño de un medicamento celular basado en AdMSCs para CLI supone todo un reto.

Este trabajo de tesis tratará de describir los resultados alcanzados tras la utilización de un medicamento celular en pacientes diabéticos con la patología mencionada bajo el marco de un ensayo clínico en fase I-II.

II. OBJETIVOS

Objetivo principal

El objetivo principal de esta tesis y “*end-point*” primario del Ensayo Clínico con código de protocolo CeTMAAd/ICPD/2008 y N° de EudraCT: 2008-001837-88 es evaluar la seguridad y factibilidad del tratamiento regenerativo con células estromales mesenquimales autólogas derivadas de tejido adiposo subcutáneo y administradas por vía intraarterial en pacientes diabéticos con isquemia en miembros inferiores y sin posibilidades de revascularización ni alternativas terapéuticas dentro del marco de un ensayo clínico fase I-II.

Objetivos secundarios

- Selección y establecimiento de criterios de la población de estudio.
- Obtención del medicamento celular: aislamiento, expansión, caracterización, dosis celular y envasado del producto celular bajo condiciones GMP.
- Valoración de la idoneidad de las AdMSCs autólogas como agentes terapéuticos para esta patología.
- Obtención de datos sobre la efectividad del tratamiento propuesto que nos permitan diseñar futuros Ensayos Clínicos para las complicaciones asociadas a la diabetes.

III. PACIENTES Y METODOLOGÍA

3.1. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

3.1.1. TIPO Y DISEÑO DEL ESTUDIO

En esta memoria de tesis se describen los resultados del Ensayo Clínico registrado con código de protocolo CeTMAd/ICPD/2008 y N^o de EudraCT: 2008-001837-88, con el título *“Uso de las células troncales mesenquimales de tejido adiposo (CeTMAd) como terapia de regeneración celular en el síndrome de isquemia crónica crítica de miembros inferiores en pacientes diabéticos”*, así como las bases moleculares y celulares de una reacción adversa acontecida durante el desarrollo de dicho Ensayo. En este segundo aspecto, también han sido utilizadas células procedentes del Ensayo Clínico NCT01745744 (www.clinicaltrials.gov) *“Estudio de la aplicación de Terapia de regeneración celular con células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo en pacientes no diabéticos con isquemia crónica en miembros inferiores”*.

El protocolo fue aprobado por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) en 2009 y fue presentado y aprobado por el Comité Ético de Investigación clínica (CEIC) del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla. Ha sido financiado por el Instituto Carlos III (ISCIII) dentro de la convocatoria Acción Estratégica de Salud; Subprograma Estatal de Generación de Conocimiento, Proyectos de Investigación en Salud.

Se realizó en el marco de colaboración de los siguientes entes públicos: FPS-CABIMER, el Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla y Hospital San Lázaro de Sevilla.

Se trata de un estudio en fase I-II, prospectivo, multicéntrico, abierto, aleatorizado y controlado con grupos paralelos para 2 niveles de dosis, con el objetivo de valorar la seguridad y factibilidad de la infusión de células troncales mesenquimales administradas por vía intraarterial, en pacientes diabéticos con isquemia crónica crítica de miembros inferiores y sin posibilidades de revascularización ni alternativas terapéuticas.

El promotor de nuestro estudio fue la Fundación Progreso y Salud (FPS), siendo el medicamento en investigación (MEI) manipulado, elaborado y controlado por la Unidad de Apoyo de Producción Celular (UAPC) del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER) o GMP-CABIMER mediante contrato previo.

La monitorización fue realizada por la Compañía de Investigación por Contrato (CRO) Chiltren International, y posteriormente por la Iniciativa Andaluza de Terapias Avanzadas (IATA), ya que la primera empresa dejó de dar servicio.

El investigador principal del Ensayo Clínico fue el Dr. Rafael J. Ruiz Salmerón del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla con la colaboración del Dr. Antonio de la Cuesta del Hospital San Lázaro de Sevilla y del Dr. Bernat Soria Escoms y el Dr. Abdelkrim Hmadcha de CABIMER.

La definición y búsqueda de nuevos Medicamentos Celulares forma parte de los objetivos de CABIMER, en concreto del Departamento de Células Troncales que dirige el Dr. Bernat Soria (Responsable Científico de la UAPC de CABIMER). El ensayo en el que se basa esta memoria forma parte del grupo de Ensayos coordinados bajo la dirección del Dr. Bernat Soria. Los resultados que aquí se describen se refieren al ensayo N^o de EudraCT: 2008-001837-88 y a la investigación clínica derivada del mismo. Aunque los datos corresponden a este ensayo, puede haber referencias a otros ensayos. En el estudio de la reacción adversa se utilizan datos del Ensayo NCT01745744 con pacientes no diabéticos.

3.1.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y ASIGNACIÓN DE TRATAMIENTO

La población de estudio estuvo formada por 30 pacientes diabéticos con CLI de al menos un miembro inferior y sin posibilidades de revascularización, de los cuales, 20 fueron incluidos en el grupo experimental (10 por cada nivel de dosis) y 10 en el grupo control. La asignación de los pacientes al grupo experimental o al grupo control en cada uno de los niveles de dosis se realizó de forma aleatorizada, siguiendo listado de números aleatorios, en bloques de 3 pacientes con asignación 2:1 (*Figura 16*).

El reclutamiento se realizó con escalada de dosis, iniciándose por la dosis inferior. Para pasar de una dosis a la superior, se requirió el dictamen favorable del CEIC del H. Universitario Virgen Macarena.

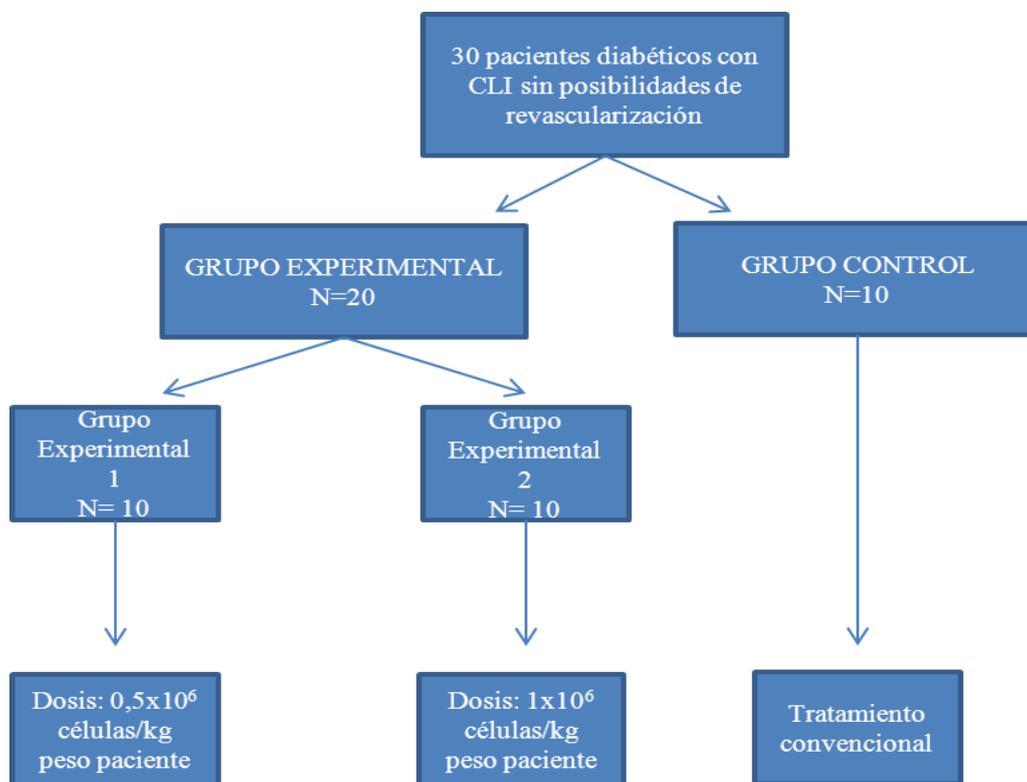


Figura 16: Diagrama de asignación del tratamiento del ensayo.

3.1.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

La población incluida en el ensayo fueron pacientes diabéticos con isquemia crónica crítica de miembros inferiores y sin posibilidad de revascularización. El consentimiento informado fue obtenido de cada uno de los pacientes antes de iniciar cualquier tipo de actividad relacionada con el ensayo. Los criterios de inclusión y exclusión de los pacientes vienen resumidos en la *Tabla 7*.

Tabla 7: Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión

- Ambos sexos (mujeres en edad fértil con resultados negativos en prueba de embarazo) de edades comprendidas entre 18 y 85 años
- Diabetes tipo I o II en tratamiento
- Enfermedad vascular infrapoplítea aterosclerótica de grado severo (Rutherford-Becker II-III; categorías 4-6) de al menos un miembro inferior, con imposibilidad de revascularización quirúrgica o endovascular
- Dolor persistente/recurrente que requiere analgesia y/o úlceras no cicatrizantes de > 4 semanas sin mejoría con tratamiento convencional y/o walking test entre 1-6 minutos y/o ITB en reposo < 0.8
- Parámetros bioquímicos normales

Criterios de exclusión

- Antecedente de neoplasia o enfermedad hematológica en los últimos 2 años
 - Pacientes con hipertensión arterial incontrolada
 - Insuficiencia cardíaca severa (NYHA IV) y/o arritmias ventriculares malignas y/o angina inestable y/o insuficiencia cardíaca o FE < 30% y/o ACV o infarto de miocardio en los últimos 3 meses.
 - IMC > 40Kg/m²
 - Retinopatía proliferativa no tratada
-

3.1.4. PERIODO Y SEGUIMIENTO DE ESTUDIO

El periodo de estudio abarcó 12 meses desde la infusión de las AdMSCs al paciente hasta el cierre del mismo. El seguimiento efectuado a los pacientes consistió en una serie de visitas planificadas en el tiempo, en las cuales los pacientes fueron evaluados clínicamente. Dicho seguimiento, así como las pruebas realizadas se resumen en la *Tabla 8*.

Tabla 8: Resumen del seguimiento

Procedimiento	Visita 1 Selección	Visita 2* Día 0	Visita 3 Día 1	Visita 4 Día 2	Visita 5 Mes 1	Visita 6 Mes 3	Visita 7 Mes 6	Visita 8 Mes 9	Visita 9 Mes 12
Firma CI	X								
Criterios inclusión y exclusión	X								
Aleatorización	X								
Historia médica, enfermedad de base, datos demográficos	X								
Signos vitales Exploración física	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Prueba embarazo	X								
Angiografía* Escala Vascularización	X		X				X		X
Escala Grado RB	X				X	X	X	X	X
ITB, medida úlceras	X				X	X	X	X	X
TcpO ₂	X				X	X	X	X	X
Perímetro gemelar	X				X	X	X	X	X
Hematología y Bioquímica	X		X	X	X*	X	X	X	X
Serología	X								
Orina	X								X
Extracción Tejido adiposo*		X							
Infusión CeTMAd*			X						
Acontecimiento Adverso		X	X	X	X	X	X	X	X
Medicación Concomitante		X	X	X	X	X	X	X	X
Final del estudio									X

* Estas visitas/pruebas no se realizaron en el grupo control.

RB: Rutherford-Becker; ITB: índice tobillo-brazo; tcpO₂: presión transcutánea de oxígeno

3.2. MEDICAMENTO EN INVESTIGACIÓN

3.2.1. PREPARACIÓN DEL MEDICAMENTO EN INVESTIGACIÓN (M.E.I.)

El medicamento en investigación (M.E.I.) procede de tejido graso correspondiente al faldón abdominal, más concretamente de la franja de tejido situada en la región periumbilical. Dichas muestras son recolectadas de cada paciente, ya que se trata de un trasplante autólogo. Las AdMSCs son expandidas *ex vivo* en condiciones GMP hasta alcanzar el número requerido para cada dosis celular. Por lo tanto, el M.E.I. son células mesenquimales de tejido adiposo autólogas.

La forma farmacéutica en la que se presenta dicho medicamento es en jeringas que contienen una suspensión de células troncales mesenquimales adultas autólogas de tejido adiposo expandidas *ex vivo*, con una concentración final óptima de 2×10^6 células/ml. La vía de administración del M.E.I. fue intraarterial, con una pauta de administración de una sola dosis, con una velocidad de infusión de 20×10^6 células/minuto.

El producto final (PCF) es una suspensión celular en una solución estéril de uso clínico (Ringer Lactado con 2,5% de glucosa y 1% de albúmina humana), conteniendo un número de células referido al peso de cada paciente. Las especificaciones del PCF debían cumplir las características recogidas en la *Tabla 9*.

Tabla 9: Especificaciones del producto celular final (PCF)

Parámetros	Especificaciones
Morfología	Fusiforme
Adherencia al plástico	Positivo
Esterilidad	Negativo
Endotoxinas	Ausencia
Micoplasma	Ausencia
Fenotipo celular	CD73 > 80% CD90 > 80% CD29 > 80% CD13 > 80%
	CD45 < 10% CD34 < 10% CD31 < 10% HLA-II < 10%
Viabilidad celular	>80%
Nº células /kg según dosis	$0,5 \times 10^6$ 1×10^6
Diferenciación celular	
• Osteogénica	Positiva
• Adipogénica	Positiva

3.2.2. CRITERIOS DE LIBERACIÓN DEL PRODUCTO CELULAR

Los criterios de liberación para la administración del M.E.I. se basaron en:

- Resultados negativos de todos los controles microbiológicos (micoplasma y esterilidad)
- Contenido de endotoxinas < 5 EU/ml
- Viabilidad celular del PCF > 80% (realizado con trypan blue)
- Cariotipo celular normal
- Fenotipo celular dentro de los límites estipulados
- Confirmación de la capacidad de diferenciación a los linajes adipocíticos y osteogénicos.
- Límites de pases celulares ≤ 7

3.2.3. PROCESO DE PRODUCCIÓN

El proceso de Terapia celular se compuso de varias fases:

- a) Pedido por parte del promotor
- b) Fase de transporte y recepción de la muestra
- c) Fase de procesamiento de la muestra y primera siembra
- d) Mantenimiento del cultivo celular, pases y Banco Celular Maestro (BCM)
- e) Envasado final, preparación del envío y Banco Celular de Trabajo (BCT)
- f) Infusión al paciente

3.2.4. UNIDAD DE APOYO DE PRODUCCIÓN CELULAR (UAPC) DE CABIMER

La Unidad de Apoyo de Producción Celular (UAPC-CABIMER / GMP-CABIMER) con la que cuenta CABIMER, es un área para la producción de medicamentos de Terapias Avanzadas bajo la más estricta regulación y la autorización de los órganos competentes. Esta unidad fue acreditada por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) el 12 de Marzo de 2009, siendo la primera Unidad de Producción Celular GMP acreditada en Andalucía. Posteriormente se certificó en

Marzo de 2012 y Abril de 2015 para la continuación de los Ensayos Clínicos que se llevan a cabo en la misma desde 2008.

En la actualidad, la UPC-CABIMER cuenta con un modelo optimizado de producción de MSCs obtenidas de tejido graso abdominal, destinadas a ser infundidas en pacientes con diferentes patologías que han sido reclutados en los Ensayos Clínicos en los que lleva participando desde 2008. Esta producción celular se realiza bajo una estricta calidad, sometiendo a controles continuos tanto el producto intermedio y final, como al personal, equipos, instalaciones, materiales y reactivos, condiciones imprescindibles que proporcionan la seguridad de cada uno de los pacientes tratados.

Las instalaciones de la UAPC-CABIMER / GMP-CABIMER cuenta con dos áreas diferenciadas:

-La primera de ellas, denominada área no clasificada, compuesta por el laboratorio de Control de Calidad, Almacén externo, Sala de citometría de flujo, Sala de microscopía y Sala de ultracongelación y criogenización.

-La segunda, área clasificada (Laboratorio GMP), comprende más de 56 metros cuadrados y contempla las dos Salas de Producción Celular (salas de fabricación del medicamento), Sala de Envasado, dos Vestuarios y un Almacén.

Todas las áreas cuentan con el equipamiento necesario para la producción de medicamentos estériles bajo normativa GMP.

La UAPC-CABIMER está llevando a cabo 4 ensayos autorizados:

1. Uso de las células troncales mesenquimales de tejido adiposo (CeTMAd) como terapia de regeneración celular en el síndrome de isquemia crónica crítica de miembros inferiores en pacientes diabéticos. (Código protocolo: CeTMAd/ICPD/2008 - Número de EudraCT: 2008-001837-88)

2. Ensayo clínico multicéntrico fase I/II aleatorizado y controlado con placebo, para la evaluación de seguridad y factibilidad de la terapia con dos dosis distintas de células troncales mesenquimales autólogas de tejido adiposo (CeTMAd) en pacientes con esclerosis múltiple secundariamente progresiva, que

no responden adecuadamente a los tratamientos registrados. (Código protocolo: CMM/EM/2008 - Número de EudraCT: 2008-004015-35)

3. Ensayo clínico fase I/II multicéntrico, abierto y aleatorizado para el estudio del uso de las células troncales mesenquimales de tejido adiposo (CeTMAd) como terapia de regeneración celular en el síndrome de isquemia crónica crítica de miembros inferiores en pacientes no diabéticos. (Código protocolo: CeTMAd/ICC/2009 - Número de EudraCT: 2009-013554-32)

4. Ensayo clínico fase I/II multicéntrico, abierto, aleatorizado y controlado para el estudio del uso de las células madre como terapia celular en isquemia crítica del miembro inferior en pacientes diabéticos tipo 2 insulinizados: estudio de las necesidades de insulina. (Código protocolo: CeTMMoTa/ICPDI/2010- Número de EudraCT: 2010-019774-33).

Por otro lado, en la actualidad, también se está llevando a cabo la implantación y desarrollo de nuevas técnicas y protocolos para poner en marcha nuevos Ensayos Clínicos. Concretamente, se está trabajando en el desarrollo de nuevos protocolos de producción de diferentes tipos celulares como productos procedentes de biopsias de piel entre otros y células madre hematopoyéticas y progenitores endoteliales.

3.2.5. EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA BIOLÓGICA

Antes de proceder a la extracción de la muestra, se comprobó que se disponía del consentimiento informado para realizar la toma de la muestra, previamente firmado por el paciente.

La extracción de la muestra biológica se realizó según las especificaciones marcadas en el protocolo. En quirófano reglado del Hospital Virgen Macarena de Sevilla se procedió al lavado de la zona abdominal, región periumbilical. Posteriormente, se pintó con líquido antiséptico (povidona yodada). A continuación, se infiltró la zona con anestésico local, tipo mepivacaina al 3%, sin vasoconstrictor, utilizando aguja gold, nº 27g biselada. Se reseccionaron 4x2 centímetros de tejido adiposo, incluyendo piel, en zonas arriba mencionadas, ya

fuera en una única o varias piezas, de modo que la muestra total fue > 30 gramos. Se introdujo la/s muestra/s en recipientes estériles, con suero fisiológico y se cerró el panículo adiposo con puntos de Dexon y piel con puntos de seda con aguja TB 15.

3.2.6. TRANSPORTE Y RECEPCIÓN DE LA MUESTRA BIOLÓGICA

La fase de transporte de la muestra se realizó de manera inmediata en el momento de su obtención desde el Hospital a la UAPC de CABIMER, por personal de transporte autorizado. Asimismo, el proceso de transporte de la muestra fue previamente validado según procedimiento interno de la UAPC de CABIMER.

La recepción de la muestra fue realizada por personal formado y autorizado de la UAPC de CABIMER, el cual verificó la integridad del envío, del envase y de la documentación anexa recibida, así como la trazabilidad de la muestra.

3.2.7. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA BIOLÓGICA DE TEJIDO ADIPOSO Y OBTENCIÓN DE CÉLULAS ESTROMALES (AdMSCs)

La muestra recibida del hospital se introdujo en el área estéril de la UAPC de CABIMER. Todo el proceso de preparación de las muestras a partir de este momento se realizó en condiciones GMP, siguiendo el protocolo de Fabricación (P-FAB) correspondiente de la UAPC de CABIMER.

En un primer paso, se realiza una disgregación mecánica: la muestra de tejido adiposo se coloca en una placa de Petri con la ayuda de pinzas estériles desechables. Se seleccionan los fragmentos de tejido que contengan menos vasos sanguíneos y tejido conjuntivo con ayuda de bisturí estéril y pinzas. Para limpiar la muestra, se utilizó solución salina (PBS; Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA), y se repitió el lavado las veces que fueron necesarias hasta obtener una muestra limpia. Los fragmentos de tejido seleccionados se pasaron a un tubo Falcon de 50 ml. A continuación se realizó una pesada de la muestra en una balanza de precisión, previamente calibrada mediante procedimiento interno. Posteriormente, se dividió la muestra en los tubos Falcon necesarios (aproximadamente de 5 a 10 gramos de

muestra en cada tubo). Seguidamente, se pasó la muestra a tubos IKA para la disgregación de la muestra mediante el equipo Ika Ultra Turrax Tube Drive (IKA-Werke, Staufen, Alemania).

Posteriormente, se sometió a la muestra a una digestión del tejido adiposo por colagenasa (Roche, Indianapolis, IN). Para ello, se preparó el medio de digestión en una proporción 1:1 (v/p) de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium bajo en glucosa; Sigma Aldrich) y Colagenasa A (Roche). Se pasó la muestra dividida a tubos tipo Falcon y se añadió 1 ml de medio de digestión por cada 0.5 gramos de muestra de tejido adiposo homogeneizado. Posteriormente, se limpiaron los tubos IKA Ultra Turrax Drive (IKA-Werke) con medio de digestión. Se colocaron los tubos en un agitador el cual fue introducido en incubador de CO₂ a 37°C, durante 2 horas y 30 minutos. Para inactivar la acción de la colagenasa, una vez transcurrido el tiempo de incubación, se añadió medio de expansión, formado por DMEM bajo en glucosa, 2% Glutamax 200 mM, 10% suero fetal bovino (FBS), 1% penicilina-estreptomicina y 1% L-glutamina (todos de Sigma-Aldrich) en una proporción 1:1 respecto al medio de digestión. A continuación, se realizó una centrifugación a 1000 rpm, 10 minutos a 20°C.

Posteriormente a la centrifugación, se procedió a la filtración para la obtención de las células estromales. Esto se llevó a cabo retirando la fase superior y filtrando la fase semisólida por un filtro *cell strainer* de 100 µm con ayuda de PBS estéril. Se retiró el sobrenadante y se pasó el pellet celular de la centrifugación al tubo donde se había filtrado la fase semisólida. A continuación, se centrifugó a 1000 rpm, 10 minutos a 20°C. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular.

La identificación y conteo de células estromales viables se realizó en cámara de Neubauer con líquido de Türck (Sigma-Aldrich) y con trypan blue (Sigma Aldrich) para identificar las células estromales viables. Posteriormente, se sembraron en flasks a una concentración entre 120.000-160.000 cél/cm² y se incubaron a 37°C, en una atmósfera de 5% CO₂ y 95% de humedad relativa.

3.2.8. MANTENIMIENTO Y EXPANSIÓN CELULAR

Pasadas aproximadamente 24 horas de la primera siembra, se retiró el medio con pipetas serológicas para descartar las células que no se habían adherido y aquellas que por cualquier circunstancia no eran viables, se realizó un lavado del cultivo con PBS, y se añadió medio fresco. Esta operación se realizó cada 2-3 días.

3.2.9. PASES CELULARES

Se realizaron hasta conseguir un determinado porcentaje de confluencia en el cultivo celular ($\geq 80\%$). Se retiró el medio de los flasks/factorías (NUNC) y se realizó un lavado con PBS. A continuación, se añadió suficiente tripsina (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) para que la superficie del flask/factoría quedara totalmente cubierta y se dejó actuar durante 5 minutos a 37°C. Se observaron las células al microscopio para comprobar que las células se habían despegado de la superficie del flask/factoría y se neutralizó el efecto de la tripsina añadiendo medio de expansión. Posteriormente, se llevó a cabo una centrifugación a 1000 rpm, 10 minutos, 20°C. Se retiró el sobrenadante con pipeta serológica y se realizó un conteo celular con Trypan Blue para calcular el número de células viables obtenidas. Se sembraron las células a una concentración entre 3500 y 5000 células/cm², y se incubaron a 37°C, 5% CO₂, 95 % Hr.

Se realizaron los pases que fueron necesarios para obtener la dosis fijada por el promotor del ensayo, siempre que no se sobrepasaran los 7 pases.

3.2.10. BANCO CELULAR MAESTRO (BCM)

El BCM se define como el conjunto de células esencialmente idénticas a las del tejido de origen y que se encuentran en una fase de producción lo más cercana a Pase 0 “*in vitro*” desde la preparación inicial. Esto nos permitiría reproducir el proceso nuevamente si fuese necesario.

La obtención de una muestra para su almacenamiento en el BCM se realizó una vez obtenido el cultivo primario. Para ello, cuando se obtuvieron un número de células

suficientes para poder continuar con la expansión de las células restantes entre el Pase 0 y el 3, se congeló un vial con 10^6 células en nitrógeno líquido a -196°C , siguiendo el protocolo normalizado de trabajo (PNT) correspondiente de la UAPC de CABIMER.

3.2.11. ENVASADO DEL PRODUCTO FINAL Y OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE RETENCIÓN

Se realizó el mismo procedimiento que un pase celular. Se centrifugaron las células a 1000 rpm, 10 minutos a 20°C y se realizó por triplicado el conteo celular. Se separaron 10^6 células como muestra de retención que se congelaron en nitrógeno líquido siguiendo el PNT correspondiente de la UAPC de CABIMER. Se calcularon y separaron en un tubo Falcon el número de células requerido para la dosis a infundir. El sobrante de las células se desechó. Se centrifugó a 1000 rpm, 10 minutos a 20°C . Se retiró el sobrenadante con pipeta serológica y se resuspendió el pellet en medio de envasado, formado por Ringer Lactado, 2,5% de glucosa al 5% y 1% de albúmina humana (todos de Grifols, Barcelona, España). Se cargaron la/s jeringa/s con tapón luer lock mediante aguja de 120 mm de largo. Se cerraron las jeringas en condiciones de esterilidad. Una vez cerradas, se introdujeron en una bolsa estéril que se pasó por la esclusa presurizable (SAS) de salida a la Sala de Recogida de Lote envasado de la UAPC de CABIMER. En dicha sala, se introdujeron estas bolsas en otras bolsas de autoclave y se sellaron para su posterior envío al hospital.

3.2.12. CONTROLES DE CALIDAD DURANTE EL PROCESO DE FABRICACIÓN

Se establecieron controles de calidad (CC) a lo largo de todo el proceso aséptico de fabricación del M.E.I. para comprobar que el cultivo de AdMSCs era de una pureza establecida (fenotipo y diferenciación celular), era estable genéticamente (cariotipo) así como para verificar la inexistencia de contaminación (detección de micoplasmas, endotoxinas y análisis de esterilidad) (187).

a) Fenotipo celular

Se realizó fuera del área estéril. Una alícuota con suspensión celular ($2,5 \times 10^5$ - 5×10^5) se facilitó desde el interior de la sala de producción.

En el laboratorio de Control de Calidad, se enumeraron los tubos de citometría (11 en total). Se les añadió 100 μ l de suspensión celular a cada tubo (concentración celular por tubo de 2×10^4 – 5×10^4). Se añadieron 5 μ l de anticuerpo (Beckton-Dickinson, San Diego, CA, USA) a los tubos correspondientes según el siguiente orden:

Tubo 1- Isotipo FITC IgG1, κ	Tubo 7- CD34 PE
Tubo 2- Isotipo FITC IgG2a, κ	Tubo 8- CD45 FITC
Tubo 3- Isotipo PE IgG1, κ	Tubo 9- CD73 PE
Tubo 4- CD13 PE	Tubo 10- CD90 FITC
Tubo 5- CD29 FITC	Tubo 11- HLA II FITC
Tubo 6- CD31 FITC	

Se incubaron durante 20 minutos en oscuridad a 4°C. A continuación se añadió 3 ml de PBS a cada tubo y se centrifugaron a 1000 rpm, durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 300 μ l de PBS. Se analizaron en la siguiente hora en el citómetro de flujo FACS Calibur (BD).

Los criterios fenotípicos fijados por las UAPC de CABIMER de los resultados son:

Marcadores positivos ($\geq 80\%$): CD13, CD29, CD73, CD90

Marcadores negativos ($\leq 10\%$): CD31, CD34, CD45, HLA II

b) Diferenciación celular

Las AdMSCs se caracterizan, entre otras cosas, por diferenciarse al linaje mesodérmico. En la UAPC de CABIMER, el control en proceso de diferenciación se realizó diferenciando el cultivo celular a adipocitos y osteocitos. Para ello, se separaron de la suspensión celular un total de entre 15×10^4 y 20×10^4 células en medio de expansión por placa Petri de 35mm.

b.1) diferenciación osteogénica: en la sala de producción estéril se sembró la suspensión celular anteriormente mencionada en placas Petri de 35 mm (se realizó por duplicado). Se incubaron a 37°C, 5% CO₂, 95% Hr. Se cultivaron con el medio de diferenciación *Osteogenic Differentiation Medium* (Lonza, España) y se siguieron las instrucciones del fabricante.

- Análisis de la diferenciación osteogénica: Se utilizó una solución de trabajo de Alizarin Red (Sigma-Aldrich) (Alizarin Red al 2% en agua destilada). Se ajustó el pH a 4,2. Se añadieron 2-3 ml de solución de trabajo. Se dejó reposar 20 minutos. Se observaron al microscopio. La matriz extracelular quedó teñida de naranja-rojo.

b.2) diferenciación adipocítica: para la diferenciación in vitro de las MSCs al linaje adipogénico, las células fueron cultivadas en medio de diferenciación *Adipogenic Differentiation Medium* (Lonza, España) y en las condiciones de cultivo recomendadas por el fabricante. Las células se cultivaron a una densidad de 160.000 cél/cm² en placas de 35 mm durante 14 días, cambiando el medio cada 2-3 días por medio fresco de diferenciación.

- Análisis de la diferenciación adipogénica: Se utilizó el colorante liposoluble Oil Red O (Sigma-Aldrich) para la detección de triglicéridos, ácidos grasos y lipoproteínas intracelulares. Este colorante da una tinción rojiza.

Protocolo de tinción:

- Retirar medio de diferenciación. Lavar las células con PBS
- Fijar con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos
- Lavar con PBS
- Preparación de solución stock de Oil Red O al 5%
- Preparación de solución de trabajo (6 ml de solución stock + 4 ml de agua destilada). Dejar reposar y filtrar.
- Añadir 2-3 ml de la solución de trabajo y mirar al microscopio. Las gotas lipídicas de los adipocitos quedan teñidas de rojo.

c) Cariotipo celular

El estudio se lleva a cabo en células con división activa, es decir en metafase. Mediante el estudio del cariotipo es posible detectar anomalías en el número o la forma de los cromosomas.

Este control lo realizó un servicio externo, previamente contratado y homologado por la UAPC de CABIMER. En el interior del área estéril, se prepararon 3 flasks de 25 cm² sembrados con la concentración celular requerida por el centro de análisis con medio de expansión, realizándose cambios de medio de 2-3 veces por semana hasta su envío al centro de diagnóstico.

d) Esterilidad

La esterilidad se define como la ausencia de organismos vivos. Este ensayo busca determinar contaminantes microbianos como bacterias, hongos y levaduras en el medio de cultivo utilizado en la expansión celular de nuestro M.E.I.

Se realizó de acuerdo a la Farmacopea Europea (20601) por el método de inoculación directa en aislador según queda establecido en las NCF. Se realizó en condiciones asépticas, pero procurando que las precauciones para evitar la contaminación no afecten a los microorganismos cuya presencia deban ponerse de manifiesto en el ensayo.

Las muestras (sobrenadante del cultivo celular) se inocularon en medios de crecimiento que contenían inhibidores de antibióticos como la penasa. Se utilizó medio de tioglicolato para detectar anaerobios y aerobios facultativos y medio de triptona soja para los aerobios estrictos y hongos.

Condiciones de incubación:

Medio	Temperatura	Tiempo
Tioglicolato	35°C	14 días
Triptona soja	22°C	14 días

e) Endotoxinas

Sirve para detectar pirógenos endotóxicos de bacterias gran negativas. Estos agentes microbianos juegan un papel fundamental ya que pueden ser adquiridos por el producto en cualquier fase de su producción alterando la calidad del fármaco final.

El ensayo se realizó por la técnica de gelificación: ensayo límite (Farmacopea Europea 20614). El límite de endotoxinas de los principios activos administrados por vía parenteral, es igual a K/M , donde K = dosis pirógena umbral de endotoxina por kg de masa corporal por hora. Según Farmacopea $K= 5 \text{ EU/kg} \times \text{h}$ (EU=Unidad de Endotoxina) y M = dosis máxima recomendada de producto por kg de masa corporal por hora. Como valor extremo para un volumen de 40 ml y peso de paciente de 40 kg sería $1\text{ml/kg} \times \text{h}$. El límite de endotoxina establecido es de 5 EU/ml.

f) Micoplasma

La contaminación de micoplasmas en cultivos celulares puede inducir efectos citogénéticos, disminución en las concentraciones de nutrientes, alteración de la morfología celular, modulación de la respuesta inmune e incluso interrupción del metabolismo celular.

Se realizó de acuerdo a la Farmacopea Europea (20607) mediante amplificación de ácido nucleico (PCR) con el kit comercial Venor GeM (Minerva Biolabs GmbH, Alemania).

El ensayo está validado según la farmacopea frente al método de referencia: detección de micoplasma por el método de cultivo (187).

3.2.13. PARÁMETROS DE INFUSIÓN DEL PRODUCTO CELULAR

Tras comprobar y asegurar que el M.E.I. cumplía con todos los criterios establecidos de medicamento celular, éste fue recepcionado en el centro hospitalario para su infusión en los pacientes incluidos en el ensayo aleatorizados en los grupos experimentales. La infusión se realizó en quirófano reglado del

Hospital Virgen Macarena de Sevilla, por parte del personal del Servicio Endovascular del mismo.

Siempre que fue posible, la infusión del medicamento celular se efectuó a través de la arteria femoral mediante un catéter (catéter OUTBACK® LTD™ Re-Entry Catheter (Cordis)). En casos puntuales donde no se pudo acceder por vía femoral, se canuló la arteria radial o la humeral. Inmediatamente tras la canulación se administró cocktail espasmolítico con 5000 unidades de Heparina Sódica como método de anticoagulación.

La infusión celular se realizó de modo manual, siendo la velocidad de infusión prevista de 20×10^6 células/ minuto (entre 3 y 5 minutos) a una concentración de 2×10^6 células por mililitro en una dilución heparinizada de 20 cc. No se paralizó en ningún momento la circulación sanguínea.

3.3. EVALUACIÓN DE LA FACTIBILIDAD

La factibilidad fue definida como la capacidad del equipo técnico de conseguir las dosis celulares requeridas en condiciones GMP, cumpliendo con los criterios de liberación del producto.

Para ello, todas las etapas del proceso (ver apartado 3.2.3. Proceso de producción) fueron evaluadas, así como todos los integrantes del equipo de la UAPC que participaron (dirección técnica, Control de Calidad, Garantía de Calidad, Producción).

3.4. EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD

La seguridad es referida a la ausencia de acontecimientos adversos locales o generales relacionados con la muestra de tejido biopsiada o la infusión celular. Para evaluar la seguridad, se controlaron los acontecimientos adversos (AA) y los acontecimientos adversos graves (AAG) que tuvieron lugar a lo largo del estudio.

Un AA se define como cualquier episodio o experiencia médica desfavorable en un paciente o sujeto reclutado para un ensayo clínico que recibe un tratamiento

experimental, en este estudio la administración de AdMSCs autólogas, sin importar la dosis o relación causal. Esto puede incluir cualquier signo (como erupción cutánea o hepatomegalia) o síntoma (como náuseas o dolor torácico) desfavorable o no intencional, un hallazgo anormal de laboratorio (incluyendo análisis de sangre, radiografías, escáneres), una enfermedad temporalmente asociada al uso de la terapia celular del estudio o un empeoramiento de un trastorno preexistente (afección clínica, incluido aquel que está siendo tratado, que se diagnosticó antes de que el sujeto firmara el CI y que está documentado en la historia médica del sujeto). Además, todo acontecimiento asociado a una sobredosis del producto, también será considerado un AA.

Un AAG se define como cualquier experiencia no deseada que afecta a un paciente, se considere o no relacionada con el tratamiento del protocolo.

Un AA relacionado con el protocolo es aquel que aparece durante un estudio clínico y que no está relacionado con el M.E.I pero que, en opinión del investigador, está relacionado con los requisitos objeto de investigación.

Los AA fueron valorados causalmente y según la severidad por el investigador usando las definiciones de la *Tabla 10*.

Tabla 10. Valoración de la causalidad y severidad de los AAs.

Relación	Definición
NO RELACIONADO	Sin evidencia de relación causal.
IMPROBABLE	Existe poca evidencia que sugiera relación causal y/o existe otra explicación razonable para el acontecimiento.
POSIBLE	Existen evidencias que sugieren una posible relación causal. Sin embargo, la influencia de otros factores puede haber contribuido al acontecimiento.
PROBABLE	Existen evidencias que sugieren una relación causal y la influencia de otros factores es poco probable.
SEGURO	Existen evidencias claras que sugieren una relación causal y se puede descartar una posible contribución de otros factores.
NO VALORABLE	No hay evidencia suficiente o es incompleta para poder hacer un juicio clínico sobre una relación causal.

Intensidad	Definición
LEVE	AA es apreciado por el paciente pero no interfiere con su vida.
MODERADO	AA produce molestia e interfiere con la vida habitual.
GRAVE	AA limita severamente la capacidad del paciente de realizar tareas habituales y requiere tratamiento sintomático. El AA pone en peligro directo la vida del paciente.

3.5. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA

Se entiende por eficacia los efectos o los beneficios que proporciona un tratamiento farmacológico en condiciones ideales de uso, como en el caso de este ensayo.

Se evaluó la eficacia mediante criterios clínicos y hemodinámicos relacionados. Se establecieron tres bloques de análisis:

1. Variable principal: desarrollo de la neovascularización en el área de infusión mediante cuantificación angiográfica.

2. Variables secundarias: Se evaluaron los cambios producidos en la cicatrización de las úlceras, amputación, escala visual analógica del dolor (EVA), y perímetro gemelar antes y después de la infusión celular.

3. Severidad de la enfermedad: fue evaluada mediante los cambios producidos en la Escala de Rutherford-Becker, ITB y tcpO₂ antes y después de la infusión celular.

3.5.1. EVALUACIÓN DE LA NEOVASCULARIZACIÓN MEDIANTE CUANTIFICACIÓN ANGIOGRÁFICA

Se analizaron las imágenes resultantes de las angiografías intra-arteriales de sustracción digital (DSA) realizadas a los pacientes infundidos con el medicamento celular.

Para ello, se introdujo un catéter “pigtail” a través de la aorta (mediante canulación radial o femoral) hasta la bifurcación iliaca o de forma preferente, hasta el inicio de

cada arteria ilíaca. La angiografía se realizó con inyectora automática la cual permitió una visión con calidad de los lechos infrapoplíteos de cada pierna, guardando parámetros de flujo y volumen de la inyección de contraste, así como los parámetros de altura del intensificador, mesa y campo, para ser repetidos en la angiografía de seguimiento. El procedimiento fue realizado en un único centro por personal entrenado.

Para cada paciente se realizó una comparativa de las imágenes obtenidas por DSA del miembro inferior diana tomadas antes, a los 6 meses y 12 meses después de la infusión celular. La adquisición de las imágenes fueron realizadas por un sistema de imagen fluoroscópico vascular (Infinix, Toshiba, Japón) y se centraron en la región infrapoplíteo. Las imágenes obtenidas se evaluaron según dos criterios:

a) Criterio cualitativo: mediante escala de vascularización, con grados 0 (arterias principales infrapoplíteas presentan una nula o mínima ramificación); +1 (Presencia de una débil ramificación que no sobrepasa 1/3 de la distancia entre la arteria principal y la superficie externa del miembro); +2 (Ramificación arterial que abarca el tercio medio de la distancia entre la arteria infrapoplíteo principal y la superficie del miembro) y +3 (Rica ramificación arterial desde la arteria principal infrapoplíteo que se extiende hasta la superficie del miembro). Dicha valoración se llevó a cabo por dos expertos independientes.

b) Criterio cuantitativo: Se analizaron tres regiones vasculares: poplíteo, infrapoplíteo y plantar. La cuantificación se realizó de modo ciego en CABIMER mediante programa informático *MetaMorph® Premier Image System Meta Series Software v.7.7.0 Tube Formation application module*. Los análisis fueron realizados usando 4 niveles de intensidad por encima del background (400, 600, 800, 1000 niveles de grises). La valoración de la red vascular se centró en la determinación del estado vascular del paciente mediante la medida en las zonas de interés infrapoplíteas tanto de la extensión como la densidad vascular. Se consideró extensión vascular a la suma de la longitud de los vasos arteriales (variable TTL, del inglés *total tubule length*) o bien el sumatorio del área que suponen los vasos arteriales (variable TTA, del inglés *total tubule area*). Con respecto a la densidad vascular, se determinó mediante las variables número de segmentos (que indican el número de segmentos que conectan puntos de cruce) (variable S) o el número

de uniones entre segmentos vasculares (variable BP, del inglés *branch points*) (Figura 17).

Se consideró que se había producido neovascularización cuando se observó un incremento en la extensión (TTL y/o TTA) y/o densidad vascular (S y/o BP) con respecto a los datos basales.

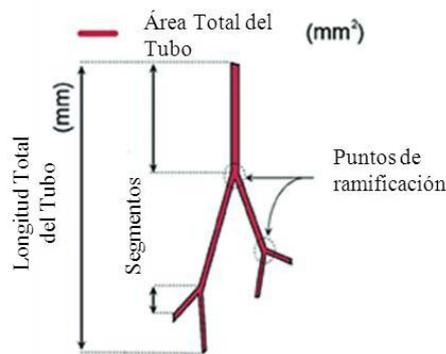


Figura 17: Esquema de las variables cuantificadas con el programa *MetaMorph*. Fuente: Imagen modificada de Ruiz-Salmerón y colaboradores (83).

3.5.2. VARIABLES SECUNDARIAS

a) Cicatrización de las úlceras en el miembro diana

Las úlceras fueron clasificadas según el Sistema de Clasificación de la Universidad de Texas propuesto por Armstrong, Lavery y Harkelss (188).

Fue la primera clasificación de tipo bidimensional, donde las lesiones son estadiadas en base a dos criterios principales: profundidad y existencia de infección/isquemia. El eje longitudinal de la matriz se ocupa del parámetro profundidad con cuatro grados (desde grado 0 hasta grado 3) y el eje vertical se ocupa del parámetro infección/isquemia, con la asignación de cuatro letras (desde la A hasta la D). Dichos parámetros se muestran en la *Tabla 11*.

Tabla 11. Clasificación de las úlceras diabéticas. Universidad de Texas

Estadíos	Grado 0 Lesión epitelial. Pre o post-úlceras	Grado 1 Úlcera superficial	Grado 2 Úlcera profunda cápsula tendón	Grado 3 Úlcera profunda llega a hueso
A	Limpia	Limpia	Limpia	Limpia
B	Infección	Infección	Infección	Infección
C	Isquemia	Isquemia	Isquemia	Isquemia
D	Infección e isquemia	Infección e isquemia	Infección e isquemia	Infección e isquemia

Las úlceras fueron medidas tomando como referencia el diámetro mayor de la herida y el diámetro menor, y aplicando el método elíptico descrito por Shaw y colaboradores (189) que se muestra en la *Figura 18*.

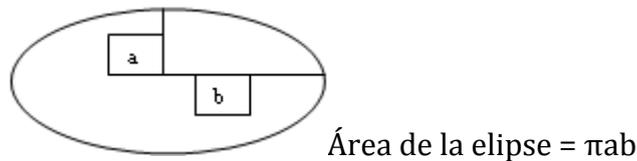


Figura 18: Método elíptico para la medición de úlceras. a = diámetro menor/2; b =diámetro mayor de la úlcera/2.

b) Amputaciones en miembros inferiores

Se realizó una revisión en la historia clínica de los pacientes para recopilar datos sobre amputaciones previas al estudio. Así mismo, se anotaron las amputaciones que tuvieron lugar en el transcurso del estudio, diferenciando entre mayores y menores. Las amputaciones mayores se consideraron aquellas realizadas a nivel de la articulación del tobillo (de Syme), a nivel medio de la tibia (infracondilea o transtibial), a nivel de la articulación de la rodilla, la realizada por encima de la rodilla (supracondilea) o a nivel de la cadera. Se consideraron amputaciones menores la transfalángica, la digital metatarsiana y la transmetatarsiana del pie.

c) Escala visual analógica de dolor (EVA)

Se evaluaron los cambios producidos en la intensidad del dolor por parte del paciente durante el estudio mediante la escala EVA. Dicha escala consistió en que el paciente marcó en un escala de 0 a 10 la intensidad del dolor, siendo 0 considerado como “no dolor” y el 10 como “dolor insoportable”.

d) Perímetro gemelar

El perímetro gemelar de los pacientes que participaron en el estudio fue medido en cada visita para observar los posibles cambios producidos a lo largo del estudio atribuible al aumento de la circulación colateral del miembro diana.

3.5.3. SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD**a) Clasificación Rutherford-Becker (RB)**

Se evaluó la severidad de la isquemia del miembro diana, comparando los valores basales con los obtenidos a lo largo del estudio. Los pacientes fueron categorizados según la Clasificación de Rutherford-Becker (54)(*Tabla 12*).

Tabla 12: Clasificación de Fontaine-Rutherford-Becker. CI: claudicación intermitente

FONTAINE		RUTHERFORD			
Estadio	Clínica	Grado	Categoría	Clínica	Hemodinámica
I	Asintomático	0	0	Asintomático	Ergometría o test de hiperemia reactiva normal
IIa	CI leve	I	1	CI leve	Completa ergometría
IIb	CI moderada-grave	I	2	CI moderada	
		I	3	CI grave	
III	Dolor en reposo	II	4	Dolor en reposo	Pres tobillo basal <60 mmHg o en dedo <40 mmHg
		III	5	Pérdida tisular menor	
IV	Ulceración o gangrena	III	6	Ulceración o gangrena	

En 1997 Rutherford modificó la Clasificación de Fontaine existente, añadiendo una serie de criterios objetivos, clasificando a los pacientes en 4 grados (desde grado 0 a grado III) y en 7 categorías. En la *Tabla 10* se muestra la clasificación de RB la cual tiene su correspondencia con la escala de Fontaine.

b) Índice Tobillo-Brazo (ITB)

Se evaluaron los cambios producidos durante el estudio en los valores del ITB para todos los pacientes.

El índice, en los casos en que pudo ser cuantificado, se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{ITB} = \frac{\text{Presión arterial sistólica (PAS) de la arteria pedia o tibial inferior}}{\text{Presión sistólica de la arteria braquial}}$$

Los valores de ITB fueron presentados como sigue:

ITB bajo: se consideró a los valores menores de 0,9

ITB normal: los valores comprendidos entre 0,91 y 1,2

ITB anormal: los valores mayores de 1,2

c) Presión transcutánea de oxígeno (T_{cp}O₂)

Las mediciones se realizaron en posición supina del paciente usando un monitor de oxígeno (TCM400 Radiometer, Copenhagen, Dinamarca).

Interpretación de los valores de la T_{cp}O₂:

Valores bajos < 20 mmHg

Valores medios: entre 20-40 mmHg

Valores normales: >40 mmHg

3.6. INVESTIGACIÓN DE LA REACCIÓN ADVERSA

3.6.1. ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Muestras sanguíneas. Se utilizaron muestras de suero humanas de pacientes diabéticos y no diabéticos con CLI, así como de voluntarios sanos. Fue requerido el consentimiento informado de todos los sujetos.

3.6.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

a) MSCs de tejido adiposo. Las AdMSCs fueron aisladas mediante biopsias abdominales de pacientes diabéticos y no diabéticos con CLI incluidos en dos ensayos clínicos independientes (EudraCT: 2008-001387-88 and EudraCT: 2009-013554-32). Las células mesenquimales control fueron adquiridas de la ATCC (*American Type Culture Collection*).

Fueron cultivadas en medio basal de MSCs (MSCBM, Lonza, Barcelona, España) complementado con factores de crecimiento (GS: MSCGM SingleQuots, Lonza), 100 unidades/ml de penicilina-estreptomina e incubadas a 37°C, 20% O₂ y 5% CO₂. Inicialmente, las células se sembraron a una densidad de 5 x 10⁴ cél/cm². A las 24 horas se reemplazó el medio basal por un medio libre de factores de crecimiento (serum/GS free MSCBM Lonza) y 24 horas después con medio basal suplementado con factores de crecimiento (Control), suero humano sano (SS), suero humano diabético (SD) o suero humano no diabético (SND). Los sobrenadantes fueron recogidos para realizar análisis ELISA. La extracción de ARN se realizó en células que habían permanecido 24 horas después de la adición de suero.

b) Transcripción inversa. Se realizó a partir de 2 µg de ARN total de cada muestra, utilizándose para la síntesis del ADNc la enzima MMLV (Promega Biotech, Alcobendas, España) según las instrucciones del fabricante.

c) PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativa (QT-PCR). La q-PCR se realizó en el termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando SensiFAST SYBR Lo-ROX Mix (Bioline Reagents Ltd). Los cebadores

utilizados para tPA y PAI-1 se diseñaron usando el software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) y fueron obtenidos bajo pedido. Como controles endógenos se utilizaron PPIA y RPLP (Tataabiocenter).

d) Evaluación de los niveles de secreción de tPA y PAI-1. Los niveles totales de tPA (libre y complejo) y de PAI-1 (formando complejo activo con tPA y latente inactivo) secretados en el medio de los distintos grupos experimentales (SS, SD y SND) fueron cuantificados usando placas de ELISA pre-tratadas (Bender MedSystems, Viena, Austria) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

e) Gel de fibrina. Se prepararon según se ha descrito en bibliografía (166). Se añadió 1 ml de medio libre de factores de crecimiento o con SS, SD, SND. Los geles fueron fijados con formalina y teñidos con tinción hematoxilina-eosina.

f) Dímero-D. Se detectó usando el kit Blue D-Dimer (Teco, Neufahrn, Alemania) en el medio recogido de los geles de fibrina a las 24 horas.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.7.1. DATOS DEMOGRÁFICOS Y BASALES

Se realizó un análisis descriptivo de todas las variables demográficas recogidas así como de los datos clínicos previos al inicio del tratamiento. Las variables cualitativas se expresaron mediante frecuencias absolutas y porcentajes, mientras que las variables cuantitativas se presentaron a través de las media, mediana, desviación típica, máximo, mínimo y número de observaciones.

3.7.2. ANÁLISIS DE LA SEGURIDAD

Se calcularon el número y porcentaje de pacientes que abandonaron el estudio debido a acontecimientos adversos, los pacientes que han experimentado al menos un acontecimiento adverso, los acontecimientos adversos más frecuentes y los pacientes que han experimentado al menos un acontecimiento adverso grave.

3.7.3. ANÁLISIS DE EFICACIA

Los parámetros cuantitativos obtenidos del análisis de imagen con “*MetaMorph Image System v.7.7.0*” se compararon entre el día 1 (día de administración de la terapia celular), el mes 6, y el mes 12, mediante el test t-test para muestras pareadas si la variable cumplía los requisitos de normalidad y mediante el test de Wilcoxon para muestras pareadas en otro caso.

Las variables secundarias de eficacia, como son ITB, tamaño de la úlcera, TcPO₂, grado Rutherford-Becker y perímetro gemelar se analizaron del mismo modo que la variable principal de eficacia, comparando sus valores basales con los obtenidos en los meses 6 y 12.

3.7.4. REACCIÓN ADVERSA

Los datos fueron representados como valores medios \pm error estándar (SEM), y se analizaron mediante el test one-way and two-way ANOVA. El test de Tukey fue usado para las comparativas. Los valores de $P \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

IV. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

De acuerdo con los criterios de inclusión del ensayo, la población del estudio se compuso inicialmente de 35 pacientes diabéticos (DM1 y DM2) con CLI de al menos un miembro inferior y sin posibilidades de revascularización. En el transcurso del ensayo se dieron 5 interrupciones prematuras al presentar los pacientes algunos de los criterios de exclusión que tuvieron como consecuencia su retirada del ensayo. Por tanto, se consideraron evaluables los 30 pacientes que finalizaron el estudio, de los que 10 formaban el grupo experimental 1 (infusión celular de $0,5 \times 10^6$ células/kg peso paciente); 10 pertenecían al grupo experimental 2 (infusión celular de 1×10^6 células/Kg peso paciente) y 10 representaban al grupo control (siguieron con su tratamiento convencional).

La aleatorización de los grupos de tratamiento se detalla en la *Figura 19*.

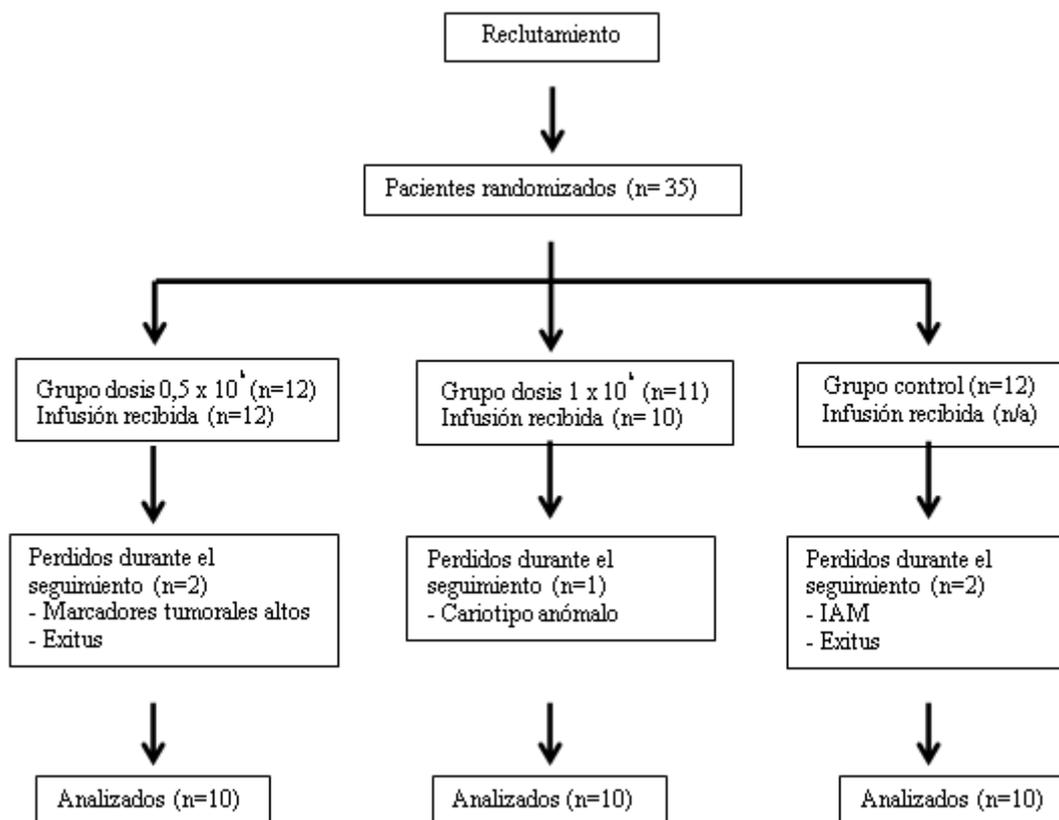


Figura 19: Diagrama ilustrativo de la randomización, seguimiento y análisis de los pacientes incluidos en el ensayo. IAM: infarto agudo de miocardio.

La edad media de los 30 pacientes incluidos en el estudio fue de $66,3 \pm 10,5$ (edades comprendidas entre 43 y 84 años). De los 30 casos analizados, 24 eran hombres (80%) y 6 mujeres (20%) con un cociente de varones-mujeres de 4:1.

La mayoría de los pacientes presentaron DM2 (96,6%), excepto un paciente que presentó DM1 (P22). 21 pacientes (70%) se encontraban insulinizados, 17 de ellos (56,6%) en combinación con antidiabéticos orales (ADO). 9 pacientes (30%) recibían como único tratamiento para la diabetes ADO.

De los pacientes incluidos en el estudio, el 86,6% presentó enfermedad macrovascular asociada importante, concretamente: 10 pacientes (33,3%) habían sufrido un accidente cerebrovascular (ACV) y 16 (53,3%) tenían un historial de cardiopatía isquémica. Asimismo, varios pacientes presentaban complicaciones microvasculares severas: retinopatía en 14 pacientes (46,6%), nefropatía diabética en 8 pacientes (26,6%) y neuropatía diabética en 15 pacientes (50%).

En relación a los factores de riesgo que predisponen a la isquemia crónica crítica de los miembros inferiores, además de la diabetes, 25 casos (83,3%) presentaban HTA y 25 casos dislipemia. En cuanto al hábito tabáquico, la mitad de los pacientes del estudio han sido fumadores (15 casos, 50%) y 5 pacientes (16,6%) seguían fumando en el momento del estudio.

El 100% de los pacientes incluidos en el ensayo presentaban un cuadro severo de la patología: 20 pacientes (66,6%) fueron clasificados con grado II en la Escala de RB (dolor en reposo) y 10 (33,3%) con grado III (pérdida tisular en mayor o menor medida). El grupo control fue el que más pacientes en grado II registró (80% vs. 60%).

En cuanto a las úlceras, 10 pacientes en total (33,3%) las presentaron al inicio del ensayo.

24 pacientes (80%) presentaban afectación de ambas extremidades por la patología, mientras que el 19,9% tenían sólo una extremidad afectada (13,3% extremidad derecha; 6,6% extremidad izquierda). 10 pacientes (33,3%) habían sufrido una angioplastia (ATP) y/o implantación de stent en el miembro

considerado diana para la terapia celular, mientras que 6 tenían un by-pass (Tabla 13).

Tabla 13: Características basales de la población del estudio

	Grupo experimental		Grupo control
	1 (n=10)	2 (n=10)	(n= 10)
Edad (años)	67,4±7,7	64,3±9,1	67,1±14,3
Sexo			
Masculino	8 (80%)	8 (80%)	8 (80%)
Femenino	2 (20%)	2 (20%)	2 (20%)
Diabetes			
Tipo 1	-	-	1 (10%)
Tipo 2	10 (100%)	10 (100%)	9 (90%)
Tratamiento diabetes			
ADO	5 (50%)	1 (10%)	3 (30%)
Insulina	1 (10%)	2 (20%)	1 (10%)
ADO + insulina	4 (40%)	7 (70%)	6 (60%)
Co-morbilidades			
ACV	5 (50%)	3 (30%)	2 (20%)
Cardiopatía isquémica	4 (40%)	6 (60%)	6 (60%)
Retinopatía	5 (50%)	4 (40%)	5 (50%)
IRC	2 (20%)	2 (20%)	4 (40%)
Neuropatía	8 (80%)	2 (20%)	5 (50%)
Factores de riesgo			
HTA	9 (90%)	8 (80%)	8 (80%)
Dislipemia	9 (90%)	9 (90%)	7 (70%)
Tabaco actuales	-	2 (20%)	3 (30%)
Ex-fumadores	6 (60%)	5 (50%)	4 (40%)
Grado Rutherford			
R-II (categoría 4)	6 (60%)	6 (60%)	8 (80%)
R-III (categorías 5-6)	4 (40%)	4 (40%)	2 (20%)
Úlceras MD	4 (13,3%)	4 (13,3%)	2 (6,66%)
Revascularización MD			
ATP/Stent	2 (20%)	2 (20%)	6 (60%)
By-pass	2 (20%)	2 (20%)	2 (20%)

ADO: antidiabéticos orales; ACV: accidente cerebrovascular; IRC: insuficiencia renal crónica; HTA: hipertensión arterial; MD: miembro diana; ATP: angioplastia transluminal percutánea

4.2. PRODUCCIÓN DEL MEDICAMENTO CELULAR

Para la obtención del medicamento utilizado en la terapia celular se biopsiaron muestras procedentes del tejido adiposo subcutáneo. En todos los casos, las biopsias fueron mayores de 30 gramos, tal y como se especificaba en el protocolo. Una vez limpias de tejido conectivo y vasos sanguíneos, las muestras de grasa pesaron $27,6 \pm 10$ gramos y de $24,8 \pm 6$ gramos para el grupo experimental 1 y el grupo experimental 2 respectivamente (*Figura 20*).



Figura 20: *Imágenes representativas del proceso de producción celular. (A). Kit de transporte validado; muestra de tejido adiposo; proceso de producción bajo condiciones GMP; producto final.*

No se observó ningún signo de contaminación en ninguna de las muestras de tejido adiposo biopsiadas. Asimismo, no se detectaron contaminaciones ni durante ni después del proceso de expansión celular. Los controles de calidad microbiológicos (CC) de todos los lotes del producto celular fueron negativos. El contenido de endotoxinas fue < 5 EU/mL en todos los casos, cumpliendo con los requerimientos de la farmacopea. La esterilidad se preservó a lo largo de todo el proceso de producción del medicamento celular.

La viabilidad celular media del producto final fue del $97,8 \pm 1,4\%$ en el grupo experimental 1 y del $96,7 \pm 0,9\%$ en el grupo experimental 2. Se realizó el cariotipo de cada preparación celular, presentándose un patrón normal en todas ellas, a

excepción del cultivo celular derivado de la muestra biológica del paciente P26, lo que supuso una desviación del protocolo que tuvo como consecuencia la exclusión del ensayo de este paciente (*ver apartado 4.4*). Se confirmó la capacidad de diferenciación celular de cada lote a los linajes adipocítico y osteocítico (*Figura 21*).

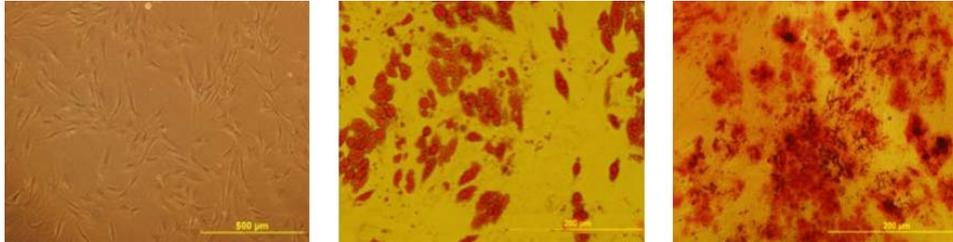


Figura 21: Imágenes representativas de la capacidad de diferenciación de las AdMSCs. Imagen izquierda: cultivo de AdMSCs. Imagen central: AdMSCs diferenciadas a adipocitos con tinción Oil Red. Imagen derecha: AdMSCs diferenciadas a osteocitos con tinción de Alizarin Red. Barra de escala: 500µm.

Los pases celulares en el proceso de expansión celular de cada lote no sobrepasaron en ningún caso 7 subcultivos (Pase 7). Se obtuvo la dosis requerida para el tratamiento celular en todos los casos, obteniéndose una media de $40,95 \pm 9,6$ millones de células para el grupo experimental 1 (que tenían un peso medio de paciente de $81,9 \pm 19,2$ kg) y de $82,0 \pm 13,7$ millones de células para el grupo experimental 2 (con un peso medio en kilos por paciente de $82,0 \pm 13,7$) (*Tabla 14*). En los dos grupos de tratamiento experimental se obtuvieron resultados similares en parámetros relacionados con el cultivo celular de AdMSCs autólogas. Las diferencias entre los dos grupos no fueron significativas (*Tabla 14*).

Tabla 14: Características de la producción del medicamento celular

	Grupo experimental	
	Grupo 1	Grupo 2
Peso en kg por paciente	$81,9 \pm 19,2$ kg	$82,0 \pm 13,7$ kg
Grasa de partida (limpia)	$27,6 \pm 10$ gr	$24,8 \pm 6$ gr
Viabilidad celular	$97,8 \pm 1,4$ %	$96,7 \pm 0,9$ %
Diferenciación celular	Todas positivas	Todas positivas
CC microbiológicos	Ausencia	Ausencia

Grupo Experimental 1: dosis $0,5 \times 10^6$ células/kg peso del paciente. Grupo Experimental 2: dosis 1×10^6 células/kg peso del paciente. CC: Controles de Calidad

Las células AdMSCs obtenidas del tejido adiposo fueron caracterizadas mediante citometría de flujo para determinar la pureza del producto celular para la terapia. Entre el 94% y el 99% de las AdMSCs cultivadas expresaron los marcadores estromales mesenquimales (CD73 y CD90), concretamente con unos porcentajes en el grupo experimental 1 de $98,5 \pm 1,8\%$ y $99,6 \pm 0,3$ y de $94,7 \pm 7,1$ y $99,7 \pm 0,2$ en el grupo experimental 2. Así mismo, fueron negativas para la detección de macrófagos, células hematopoyéticas y endoteliales en el producto final (CD31, CD34 y CD45), con unos valores de $0,4 \pm 0,4\%$ y $1,1 \pm 1,4\%$; $2,2 \pm 1,4\%$ y $4,8 \pm 3,2\%$; $0,4 \pm 0,5\%$ y $1,1 \pm 1,3\%$ en el grupo experimental 1 y en el grupo experimental 2 respectivamente (Figura 22).

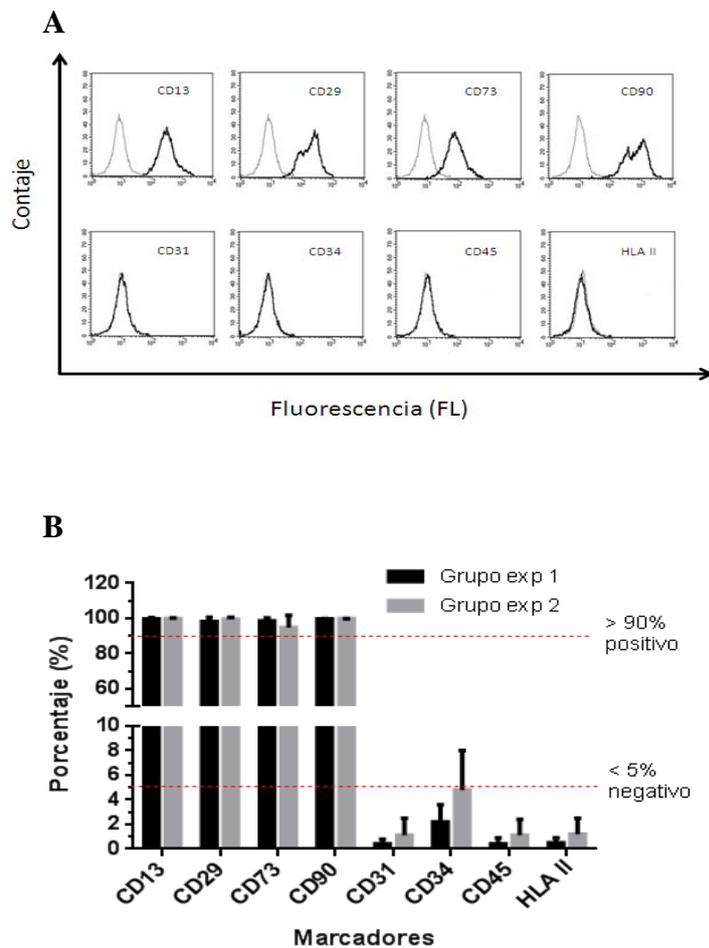


Figura 22. Caracterización fenotípica del producto celular. (A).Diagrama representativo de los marcadores de superficie de las AdMSCs. **(B).** Representación gráfica del porcentaje resultante de los distintos marcadores que expresaron las AdMSCs en el producto final.

4.3. FACTIBILIDAD DEL TRATAMIENTO CON AdMSCs AUTÓLOGAS

El tratamiento en estudio (AdMSCs autólogas procedentes de tejido adiposo) se aplicó a todos los pacientes aleatorizados en la rama experimental siguiendo el protocolo establecido. No hubo incidencias relevantes.

4.4. SEGURIDAD RELACIONADA CON EL TRATAMIENTO CON AdMSCs AUTÓLOGAS

De los 30 pacientes que finalmente fueron incluidos en el ensayo, 27 (90%) experimentaron al menos 1 acontecimiento adverso (AA) y 13 (43,3%) experimentaron al menos un acontecimiento adverso grave (AAG).

Se registraron 69 AA en total. En cuanto a la clasificación de la severidad de los AAs, la cual se basa en el juicio clínico del investigador responsable del estudio, se consideraron leves 41; de intensidad moderada 23, y graves 5 (*Figura 23*).

En relación con la aplicación del medicamento celular, 64 AAs (92,7%) fueron clasificados como no relacionados; 1 (1,4%) como improbable; 3 (4,3%) como posible y 1 (1,4%) como probable (*Figura 23*).

No se registró ningún nuevo caso de retinopatía ni una progresión de los casos existentes debido a una angiogénesis desregulada después de la infusión celular.

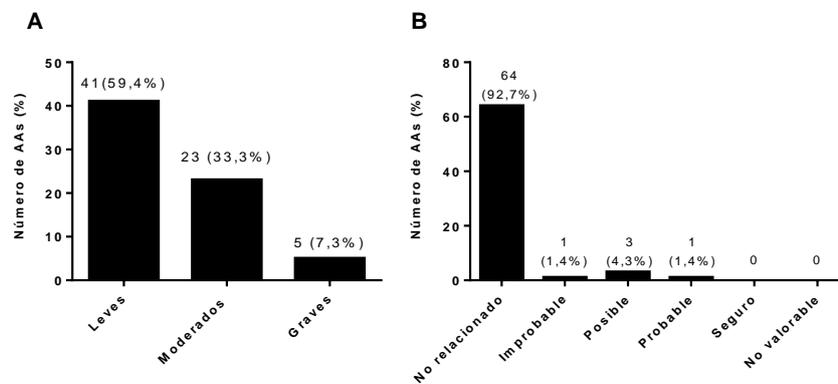


Figura 23: Acontecimientos Adversos (AAs). (A) Severidad de los AAs. (B) Relación con la medicación.

4.4.1. AAS NO RELACIONADOS CON EL MEDICAMENTO CELULAR

El AA más común fue el aumento del dolor (20%), variaciones en los niveles de glucemia (13.3%) y variación en la tensión arterial (10%). 1 paciente (P16) experimentó un evento cardiovascular mayor (insuficiencia cardíaca aguda), y 2 pacientes fueron ingresados para implantación de 2 *stents* coronarios (P34 y P35). 2 pacientes requirieron transfusión de concentrado de hematíes durante el ensayo, aunque ninguna tuvo relación con el tratamiento celular. 1 paciente (P28) fue ingresado por ausencia de pulso desde nivel poplíteo izquierdo con signos de inicio de rabdomiolisis. Este ingreso no tuvo relación con el tratamiento celular, ya que el paciente estaba incluido en el grupo control.

Varios pacientes fueron ingresados para someterse a diversas intervenciones quirúrgicas programadas (pancreatitis crónica, fractura de húmero, colonoscopia por polipectomía), ninguna de las cuales tuvieron relación con el tratamiento del estudio.

3 pacientes experimentaron celulitis en los miembros inferiores (P12, P17, P22), precisando ingreso con tratamiento antibiótico por vía intravenosa. El AA tiene relación con la gravedad de la patología, no con el medicamento en investigación.

4.4.2. AAS RELACIONADOS CON EL PROCEDIMIENTO

a) Procedimiento de infusión: 4 pacientes presentaron AAs en la zona de extracción de la muestra de tejido adiposo: 1 paciente (P23) presentó una erupción pruriginosa en la pared abdominal después de la extracción de la muestra de tejido adiposo. Experimentó dolor en la cicatriz de la extracción, y fue tratado sin más complicaciones. El paciente P24 fue tratado para la cicatrización de la herida quirúrgica. 1 paciente (P31) presentó dolor en la zona de infusión. El P25 tuvo que prolongar su hospitalización después de la infusión celular por presentar eritema reticulado, sin empastamiento con dolor en región proximal del miembro inferior, debido a que el acceso para la infusión fue femoral. Preciso tratamiento profiláctico con antibioterapia.

b) Procedimiento de expansión celular: El cultivo celular de AdMSCs autólogas del paciente P26 presentó un cariotipo anómalo en dos determinaciones independientes y en pases diferentes de cultivo. Inicialmente, se analizaron 60 metafases de las que se cariotiparon 13 de un cultivo en pase 3. Tres de ellas (5%) presentaron 47 cromosomas, siendo el excedente un cromosoma C, que parece corresponde al cromosoma 7, siendo las 57 restantes (95%) normales 46, XX.

Ante este cariotipo anómalo, se volvió a remitir una muestra del mismo cultivo pero esta vez en pase 5. Se analizaron 30 metafases, de las que se cariotiparon 6. Tres de ellas (10%) presentaron alteraciones distintas, apareciendo en dos un excedente de cromosoma 7 (47, xx, +18 [1]/ 47, xx, +7 [1]/ 48, x, +7 +7 +10[1]), siendo el resto (90%) normales (46,xx [27]) (Figura 24).

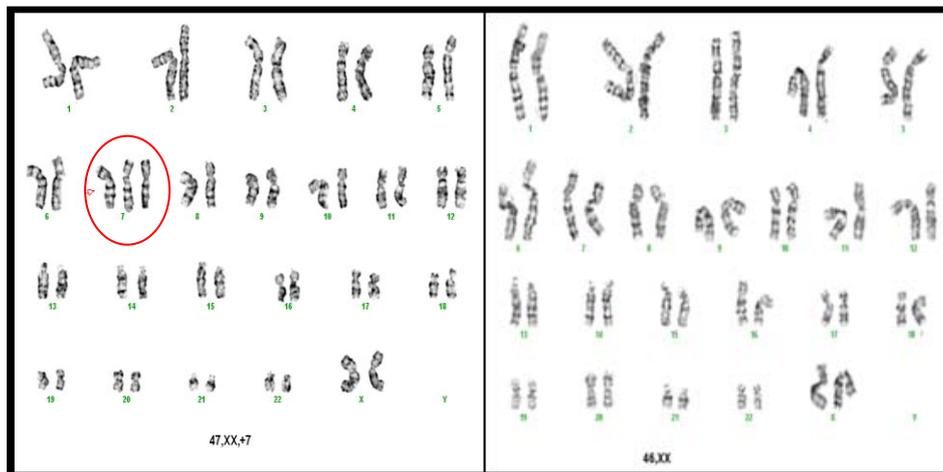


Figura 24. Cariograma del cariotipo realizado al cultivo del paciente P26. La imagen de la izquierda muestra un excedente de cromosoma 7 trisomía (47,XX,+7), mientras que la imagen de la derecha presenta un cariotipo normal (46, XX).

Este evento adverso afecta al producto en investigación y no al paciente, puesto que las células no fueron infundidas en ningún momento ya que no se cumplieron las normas de liberación para el producto celular. Tras este acontecimiento, el paciente fue excluido del ensayo. Asimismo, las células cultivadas fueron desechadas según procedimiento de la UAPC de CABIMER.

4.4.3. AAs RELACIONADOS CON EL MEDICAMENTO EN INVESTIGACIÓN

Se registraron 2 reacciones adversas, que a juicio clínico y del promotor, podrían relacionarse con la naturaleza del medicamento celular y el procedimiento/forma de la infusión del producto utilizado en la terapia celular. Dos pacientes (P02 y P09) desarrollaron microtrombosis distal en las 24 horas siguientes a la infusión celular. Ambos requirieron terapia antitrombótica para su estabilización y posteriormente, fueron dados de alta (*ver apartado 4.6*). Uno de ellos (P02) fue excluido del ensayo posteriormente por causas no relacionadas ni con el tratamiento celular ni con la reacción experimentada según fue determinado a juicio clínico y del promotor.

4.5. RESULTADOS DE EFICACIA

Todos los análisis de eficacia fueron exploratorios, ya que inicialmente el ensayo no fue diseñado para detectar diferencias entre los grupos de tratamiento en los parámetros de eficacia.

4.5.1. EVALUACIÓN DE NEOVASCULARIZACIÓN

Se evaluaron los cambios producidos en el grado de angiogénesis y/o vasculogénesis en el miembro diana.

a) Análisis cualitativo: Dos expertos independientes analizaron las angiografías y valoraron cualitativamente la vascularización de los pacientes según grados 0, +1, +2 y +3. (*Figura 25*).

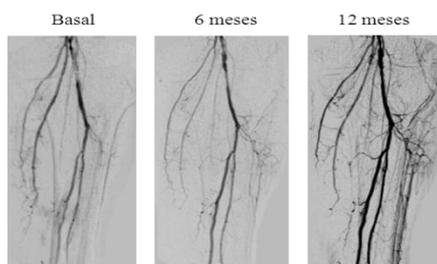


Figura 25: Imágenes representativas de las angiografías en el momento basal y a los 6 y 12 meses posteriores a la infusión celular.

Si bien ninguno de los pacientes presentó el grado 3 de vascularización, en el 20% de los pacientes de cada grupo experimental se observó un aumento de la vascularización en el miembro infundido después de los 6 meses de recibir el medicamento celular. Dichos pacientes mantuvieron ese nivel de vascularización al año de seguimiento. Además, el 10% del grupo experimental 1 y el 20% del grupo experimental 2 experimentaron un aumento de la vascularización observable a los 12 meses de ser infundidos con las células. Ningún paciente sufrió una disminución de la graduación según la escala de vascularización comentada (*Tabla 15*).

Tabla 15: Valoración cualitativa de las angiografías

Escala de vascularización (criterio cualitativo)				
	Basal	6 meses	12 meses	Resultado
Grupo experimental 1				
P01	2	2	2	No cambios
P03	1	ND	2	ND/+
P06	1	2	2	+/+
P08	1	2	2	+/+
P09	1	ND	1	ND/=
P10	2	2	2	No cambios
P12	1	1	1	No cambios
P13	1	1	2	=/+
P15	1	1	ND	=/ND
P16	1	1	ND	=/ND
Grupo experimental 2				
P18	2	2	2	No cambios
P20	2	2	2	No cambios
P23	1	1	ND	=/ND
P24	2	2	2	No cambios
P25	1	1	2	=/+
P27	2	2	2	No cambios
P29	1	2	2	+/+
P31	1	2	2	+/+
P34	1	1	1	No cambios
P35	1	1	2	=/+

0: nula o mínima ramificación; +1: débil ramificación que no sobrepasa 1/3 de la distancia entre la arteria infrapoplítea principal y la superficie del miembro; +2: ramificación arterial que abarca el tercio medio de la distancia entre la arteria infrapoplítea principal y la superficie del miembro; +3: rica ramificación arterial desde la arteria principal infrapoplítea que se extiende hasta la superficie del miembro. ND: no datos. +: aumento.

Un 30% de los pacientes del grupo experimental 1 y un 50% de los pacientes del grupo experimental 2 no presentaron cambios en su circulación colateral observable cualitativamente en las angiografías.

En un 40% de los pacientes del grupo experimental 1 no se recibió la imagen de la angiografía en alguno de los periodos de post-infusión y no pudo ser valorado. En el grupo 2, esto ocurrió en el 10% de los pacientes.

b) Análisis cuantitativo: Se cuantificó el árbol vascular en las angiografías recibidas con el programa informático *Metamorph® Image System Meta Series Software v.7.7.0 Formation application module*.

En el Grupo Experimental 1 se cuantificaron todas las imágenes recibidas pertenecientes al momento de la infusión celular (periodo basal), el 70% de las imágenes recogidas en el periodo de los 6 meses después de la infusión celular y el 80% de las imágenes que corresponden al periodo de los 12 meses.

En el grupo experimental 2 se cuantificaron el 90% de los casos en el periodo de los 6 meses y el 80% de las imágenes recibidas en el periodo de los 12 meses. El resto de las imágenes no cumplieron los criterios para la cuantificación.

En función de las imágenes recibidas y bajo las características descritas en el apartado de Pacientes y Metodología, la cuantificación del árbol vascular mediante *Metamorph®* nos permitió observar un aumento en los parámetros elegidos del 30% de los pacientes incluidos en el Grupo Experimental 1. Dicha mejora se mantuvo en el tiempo, observándose tanto a los 6 como a los 12 meses posteriores a la infusión celular recibida. En concreto, los pacientes P06 y P08 mostraron una mejora significativa con respecto a su estado basal, resultados concordantes con la mejora clínica experimentada por dichos pacientes (*Figura 26*).

En el Grupo Experimental 2 la cuantificación del árbol vascular mediante *Metamorph®* nos permitió observar un aumento en los parámetros elegidos en el 40% de los pacientes. Concretamente, en los pacientes P29, y P31, dicho incremento fue observable desde los 6 meses de la infusión celular y moderadamente mantenido a los 12 meses. En el caso de los pacientes P20 y P34,

el aumento del árbol vascular fue observable a los 12 meses del tratamiento celular (*Figura 26*).

De forma general, la cuantificación mostró que la neovascularización tuvo lugar en varios pacientes tratados con el producto celular. El 35% mostró una mejora en la vascularización con un incremento en las variables de extensión vascular (TTL/TTA) y/o en las de densidad vascular (BP y S), por el contrario, el 45% mostró una disminución en alguna de las variables (*Figura 26*).

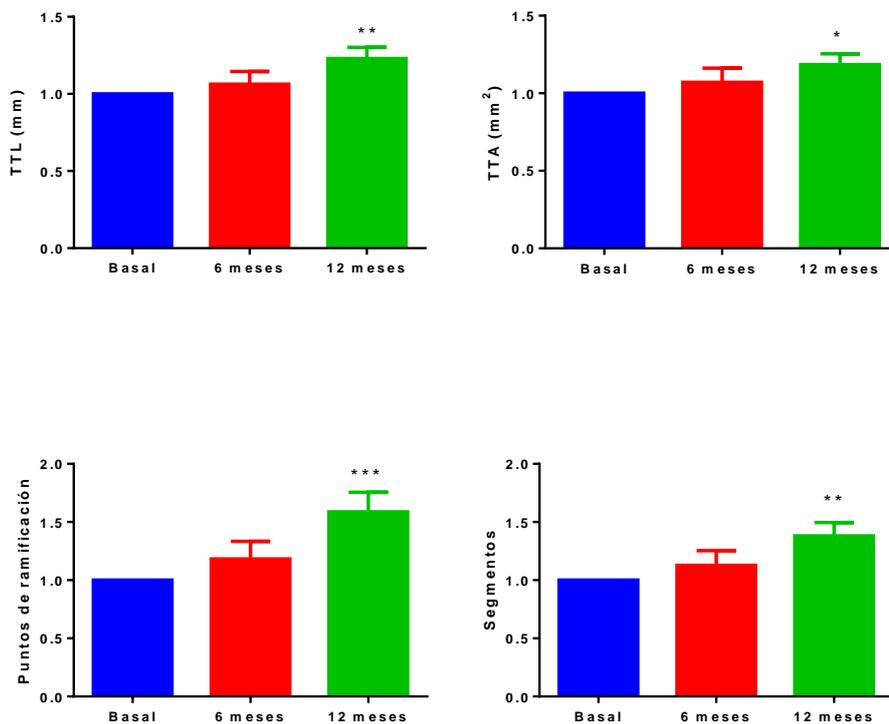


Figura 26: Cuantificación de la neovascularización. Los datos angiográficos de extensión vascular (longitud total del vaso (TTL) y área total del vaso (TTA)) y de densidad vascular (puntos de ramificación (BP) y segmentos (S)) fueron cuantificados en la región vascular infrapoplítea y comparados con la situación basal (azul), a los 6 meses de la infusión celular (rojo) y a los 12 meses (verde). Se observó un incremento significativo de cada variable, lo cual expresa la aparición de neovascularización inducida por la infusión de AdMSCs autólogas. Análisis estadístico usando paired t-test (sig. Two-tailed). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

A los 6 meses de seguimiento, tuvo lugar un aumento estadísticamente significativo en el 15% de los pacientes en las variables utilizadas para medir la extensión vascular (TTL y TTA). En el 25% se observó una disminución probablemente como consecuencia de la evolución de la enfermedad. A los 12 meses, el aumento lo experimentaron el 30%, mientras que sólo el 25% de los

pacientes mostraron una disminución de la vascularización en las variables de extensión vascular.

Con respecto a las variables que midieron la densidad vascular, la cuantificación resultó en un aumento en el 15% y en el 20% de los pacientes en las variables de puntos de ramificación (BP) y de segmentos (S) respectivamente frente al 25% y 30% donde se observó una disminución de dichos parámetros. A los 12 meses, el incremento tuvo lugar en el 25% de los pacientes en la variable de BP y en el 30% en la de S. Disminuyó en el 20% tanto en BP como en S.

No se obtuvieron resultados estadísticamente significativos al comparar las dos dosis de tratamiento.

Por tanto, podemos concluir que a lo largo del estudio, el 35% de los pacientes experimentó un aumento de la neovascularización en el miembro infundido atribuible a la terapia celular recibida. Dicho aumento fue mantenido en el tiempo, ya que fue observado tanto a los 6 meses como a los 12 meses después de la infusión celular. Por el contrario, en un 45% de los pacientes disminuyó la vascularización según los datos arrojados por la cuantificación. Dicha disminución puede ser debida a la progresión evolutiva de la enfermedad que presentan. En la *Tabla 16* se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación expresada con flechas ascendentes las cuales implican un aumento, o con flechas descendentes las cuales se refieren a una disminución de los parámetros. Dicha cuantificación fue comparada con los parámetros basales que presentaban los pacientes al comienzo del ensayo.

Tabla 16: Resumen de los resultados obtenidos mediante cuantificación con MetaMorph

Pacientes	TTL		TTA		BP		S	
	Basal/6 m	Basal/12 m						
Grupo experimental 1								
P01	n.s	↓↓↓	n.s	↓↓↓	n.s	n.s	n.s	n.s
P03	No imagen	n.s						
P06	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
P08	n.s	↑↑↑	n.s	↑↑↑	n.s	↑↑↑	n.s	↑↑↑
P09	No imagen	↓						
P10	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
P12	No imagen	n.s						
P13	↓	n.s	↓	n.s	↓	n.s	↓	n.s
P15	↓↓↓	No imagen						
P16	n.s	No imagen	n.s	No imagen	n.s	No imagen	↓	No imagen
Grupo experimental 2								
P18	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	↑	n.s
P20	↓↓	↑	↓↓	↑	↓↓	↑	↓↓	↑↑
P23	n.s	No imagen						
P24	↓↓↓	↓	↓↓↓	↑↑	↑↑↑	↓↓	↓↓↓	↓↓
P25	No imagen	No imagen						
P27	No imagen	↓	No imagen	n.s	No imagen	↓↓↓	No imagen	↓↓↓
P29	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
P31	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
P34	↓↓	↑↑	↓↓	↑↑	↓↓↓	n.s	↓↓↓	n.s
P35	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓

TTL: total tube length (longitud de los vasos arteriales); TTA: total tube area (área que suponen los vasos arteriales); BP: branch point (puntos de ramificación); S: Segmentos; n.s: no estadísticamente significativo; ↑: aumento; ↓: disminución ↑/↓: p≤0.05 ↑↑/↓↓: p≤0.01 ↑↑↑/↓↓↓: p≤0.001

4.5.2. VARIABLES SECUNDARIAS

Se evaluaron los cambios producidos en los índices de amputación, la cicatrización de las úlceras, escala visual analógica del dolor (EVA) y perímetro gemelar.

a) Amputaciones

5 pacientes presentaron amputaciones previas al estudio. Durante el año de seguimiento, ningún paciente sufrió una amputación mayor ni en el miembro diana ni en el contralateral. Sin embargo, 5 pacientes experimentaron amputaciones menores a nivel digital, 3 de los cuales presentaban grado III en la Escala de RB. 1 paciente presentó la amputación en el miembro contralateral (P12), mientras que 4 de ellos la presentaron en el miembro diana (P09, P13, P29, P33). La *Tabla 17* resume el número de pacientes así como el porcentaje de amputaciones sufridas a lo largo del estudio (6 y 12 meses) en los tres grupos de aleatorización.

Tabla 17: Amputaciones ocurridas a lo largo del ensayo en el miembro considerado diana.

	Control	Grupo exp.1	Grupo exp.2
6 meses	Pacientes (%)		
Pacientes con amputación (N)	10%(1)	20% (2)	10%(1)
Pacientes con amputación mayor (N)	0%	0%	0%
Número total de amputaciones	2	2	4
12 meses	Pacientes (%)		
% con amputación (N)	10%(1)	10%(1)	10%(1)
% con amputación mayor (N)	0%	0%	0%
Número total de amputaciones	2	1	1

N: número de pacientes

El paciente P09, el cual sufrió una reacción adversa que se comenta en el apartado 4.6, cursó con fenómenos de trombofilia asociados que se objetivaron después de la infusión celular, y de los que el paciente era portador con anterioridad. Esto dio como resultado lesiones necróticas en los dedos 3º, 4º y 5º y en la base del 1º dedo y en la cabeza de metatarsiano. A los 3 meses de la infusión celular fueron amputados por presentar necrosis seca.

El paciente P13 sufrió una amputación menor (1º dedo del pie izquierdo) tras meses de gangrena húmeda un mes después de la infusión celular. A los 9 meses de la infusión, presentó embolización de gérmenes en el curso de infección del pie, por lo que sufrió otra amputación en un dedo del pie izquierdo.

El paciente P29 sufrió 4 amputaciones menores en total, teniendo lugar la primera de ellas antes de la infusión celular. A los 4 días de la infusión, requirió ingreso hospitalario por infección en la herida de la amputación, apareciendo lesiones cutáneas nuevas. A los 3 meses de la infusión, presentó amputación del 4º dedo. A los 6 meses presenta amputación de otros dos dedos (2º y 3º). A los 9 meses de la infusión, ya le han sido amputados todos los dedos del miembro diana, aunque presentó excelente tejido de granulación.

El paciente P33, aleatorizado en el grupo control, sufrió amputaciones en ambos miembros, así como diversas úlceras (un total de 4) a lo largo del estudio. 4 dedos del miembro considerado diana fueron amputados.

b) Cicatrización de úlceras

Respecto a la evolución de la cicatrización de las úlceras, 10 pacientes (33,3%) presentaron úlceras no cicatrizadas en el miembro diana al inicio del estudio. 5 de ellas fueron consecuencia de heridas quirúrgicas tras amputaciones sufridas previas a la inclusión en el ensayo. Según la Clasificación de la Universidad de Texas para úlceras diabéticas, un paciente presentaba grado C2, dos pacientes grado B2, uno grado B1, cuatro presentaron grado B2 y dos grado A1.

Al finalizar el estudio, la escala de Texas reflejó la completa curación de las lesiones tróficas en 6 casos (A0), excepto para los pacientes P12, P29 y P33 que presentaron úlceras superficiales (A1) en los dos primeros casos, y una úlcera infectada de proporciones considerables (9x14 cms) en el caso del paciente P33 (grupo control).

La cicatrización de las úlceras en los dos grupos de tratamiento con células fue más rápida en la mayoría de los casos respecto al grupo control, cuya evolución ocurrió de una manera más lenta y discreta (*Figura 27*).

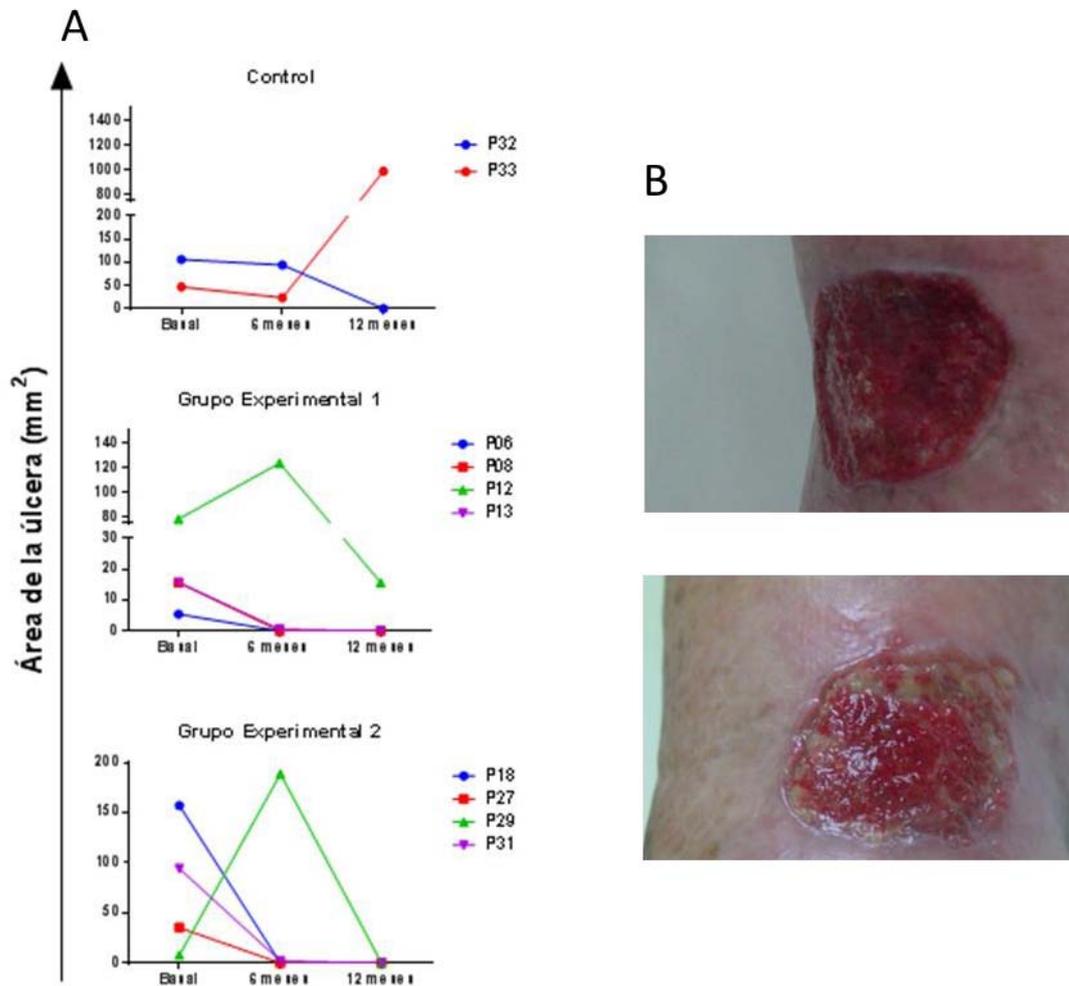


Figura 27: Cicatrización de úlceras. (A). Evolución del área de la úlcera en mm^2 en el momento basal, 6 meses y 12 meses del seguimiento de los tres grupos de tratamiento. **(B).** Imagen representativa de la cicatrización de una úlcera en el momento basal y a los 45 días tras el tratamiento celular, observándose buen tejido de granulación.

c) Escala analógica visual del dolor (EVA)

El dolor en los pacientes afectados por isquemia arterial periférica es un síntoma principal por el que se acude a la consulta médica y a través del cual se realiza el diagnóstico.

En general, el dolor se redujo en un 60% (18 pacientes) de los pacientes del estudio. Un 53,3% (16 pacientes) pertenecían a los grupos de tratamiento celular.

10 pacientes (33,3%) (P01, P06, P08, P13, P15, P16, P18, P25, P27, P31) se presentaron asintomáticos en cuanto al dolor al final del estudio, siendo todos ellos de los grupos de tratamiento celular. El 90% de los pacientes pertenecientes al grupo control refirió más dolor que al inicio del estudio. En el 20% de los casos (6 pacientes) tuvo lugar un aumento de la escala con respecto al periodo basal, siendo un 16,6% (5 pacientes) pertenecientes al grupo control.

En un 23,3% no se obtuvieron las medidas de la escala EVA a nivel basal y/o a los 12 meses del seguimiento debido a la no objetivación por parte del paciente.

La comparativa entre los diferentes grupos arrojó una diferencia estadísticamente significativa tanto entre el grupo experimental 1 con respecto al grupo control ($p \leq 0.001$) como entre el grupo experimental 2 y el grupo control ($p \leq 0.01$) (Figura 28).

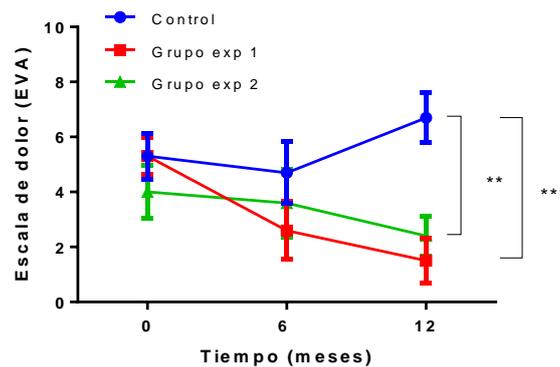


Figura 28: Escala visual analógica de dolor (EVA). Comparativa entre los grupos de tratamiento celular y el grupo control. ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$

Si bien una reducción en la escala de dolor puede parecer un dato positivo, no hay que olvidar que la mayoría de estos pacientes sufren neuropatía asociada con la DM, por lo que este dato clínico debe ser interpretado con precaución.

d) Perímetro gemelar

El incremento de la perfusión tisular así como un aumento en la capacidad de marcha del paciente comportará un aumento de la masa muscular en la zona afectada, por lo que la medición del perímetro gemelar puede indicar una mejoría indirecta del curso de la enfermedad.

Un 40% de los pacientes del grupo control experimentó un aumento de este parámetro al comparar las medidas basales con las tomadas a los 12 meses del seguimiento; un 10% presentó la misma medida que al inicio del estudio mientras que en un 40% disminuyó dicho perímetro (*Figura 29 A*).

En el grupo experimental 1, el 40% de los pacientes presentaron un aumento del perímetro gemelar a los 12 meses; el 30% permanecieron igual que al inicio y un 30% sufrió una disminución en la medida (*Figura 29 B*).

En el grupo experimental 2, el 70% de los pacientes aumentó la medida del perímetro gemelar; un 10% presentó la misma medida que al inicio del ensayo y un 20% experimentó una disminución en el perímetro gemelar (*Figura 29 C*).

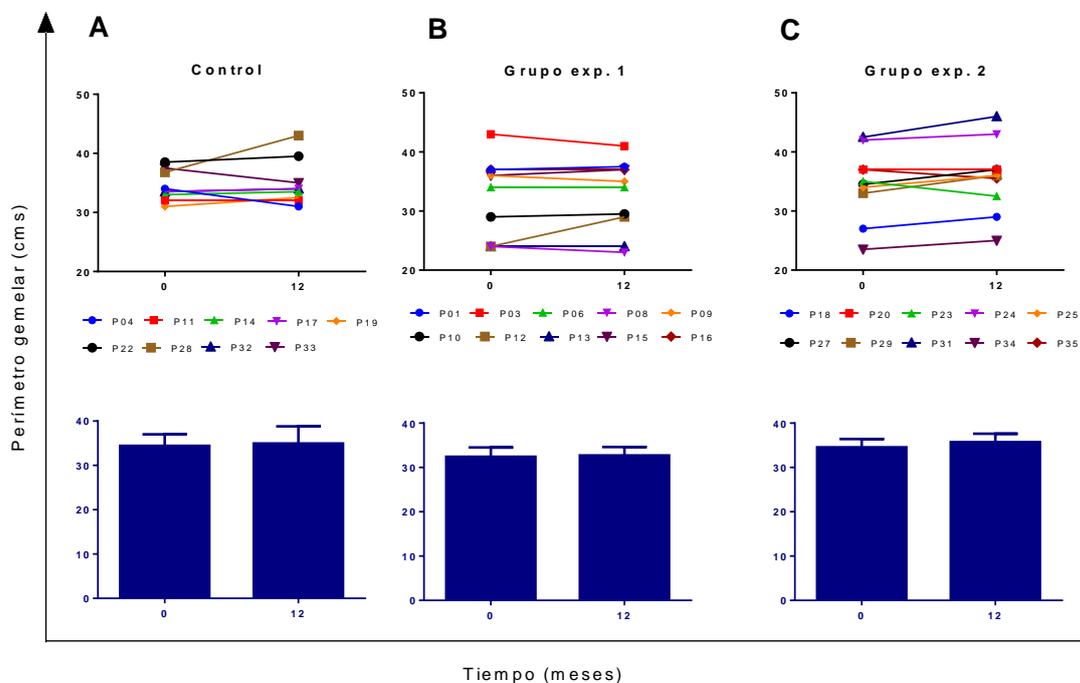


Figura 29: Medidas del perímetro gemelar en centímetros de los grupos de tratamiento al inicio y al final del estudio (0 y 12 meses). A. Grupo control. B. Grupo experimental 1. C. Grupo experimental 2.

Aunque los resultados relativos a la medida del perímetro gemelar no indicaron cambios significativos, los pacientes de los grupos experimentales refirieron más calor en el miembro infundido, un aumento de la coloración así como nacimiento del vello.

4.5.3. SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD

Para estimar la evolución de la severidad de la enfermedad en los pacientes del estudio, se analizaron los cambios producidos en la Escala de Rutherford-Becker, índice tobillo-brazo (ITB) y presión transcutánea de oxígeno (tcpO₂).

a) Escala de Rutherford-Becker (RB)

Según el grado de severidad de la enfermedad, todos los pacientes fueron clasificados según la Escala RB (*ver Tabla 13*) en el grado II categoría 4 (R II-4, aquellos que experimentan dolor en reposo) o en el grado III-categorías 5-6 (R III-5-6, clasificación relacionada con la presencia de lesiones tróficas). Dicha escala tiene en cuenta tanto criterios hemodinámicos como clínicos. En los grupos de tratamiento, tanto en el grupo experimental 1 como en el grupo experimental 2, hubo mayor proporción de pacientes con pérdida de tejido (grado III) que en el grupo control (40% frente al 20%).

La tasa global de mejoría para todos los pacientes del estudio a los 6 meses fue de un 40%. Cuando la evaluación se llevó a cabo separando los grados, para todos los pacientes, el 42,1% de los categorizados como R II-4 mejoraron, mientras que sólo el 36,4% de los R III-5-6 lo hicieron. En el grupo de tratamiento 1 hubo una mejora mayor en el grupo categorizado como R III-5-6 frente al R II-4 (50% vs 33,3%). En el grupo de tratamiento 2 y en el grupo control, fue mayor la mejora en los pacientes con grado II-4 (66,7% vs 50%; 28,6% vs 0%). Cabe destacar que en el grupo control no se produjo ninguna mejora en los pacientes con la clínica más severa, es decir, aquellos pacientes catalogados como R-III. Además, la mejora en el grupo R-II de los pacientes control es discreta frente a los grupos tratados con células (28,6% vs 33,3% y 66,7%), siendo el grupo control el que más pacientes con esta graduación tenía al comienzo del estudio (80% vs 60%) (*Tabla 18*).

A los 12 meses del tratamiento, la mejora general de todos los pacientes fue de un 60% con respecto al inicio del estudio, porcentaje que coincide tanto en los pacientes grado II como en los de grado III. La mejoría por grupos de tratamiento dio como resultado un 60% en el grupo 1, un 80% en el grupo 2 y un 40% en el grupo control, siendo éste último claramente inferior que los grupos tratados con células. Con respecto a los grados de RB, en el grado II mejoraron un 37,5% de los pacientes del grupo control, frente al 50% y el 100% de los grupos tratados con células 1 y 2 respectivamente. Los pacientes con grado III en la escala de RB, experimentaron una mejora del 50% en el grupo control que coincide con el grupo de tratamiento 2. En el grupo de tratamiento 1 la mejora fue de un 75% de los pacientes (Tabla 18).

Tabla 18: Número de pacientes-casos (%) clasificados según la severidad de la enfermedad mediante la escala de Rutherford-Becker a lo largo del ensayo.

	Grados RB	Basal Casos (%)	1 mes Casos (%)	3 meses Casos (%)	6 meses Casos (%)	9 meses Casos (%)	12 meses Casos (%)
CONTROL	0					1 (10%)	1 (10%)
	I			1 (10%)	2 (25%)	2 (20%)	2 (20%)
	II	8 (80%)	7 (70%)	7 (70%)	5 (62,5%)	2 (20%)	6 (60%)
	III	2 (20%)	3 (30%)	-	1 (12,5%)	5 (50%)	1 (10%)
	Total	10	10	8	8	10	10
GRUPO EXP. 1	0				3 (30%)	3 (30%)	4 (40%)
	I		4 (40%)	4 (40%)	1 (10%)	1 (10%)	1 (10%)
	II	5 (50%)	1 (10%)	2 (20%)	2 (20%)	2 (20%)	2 (20%)
	III	5 (50%)	5 (50%)	4 (40%)	4 (40%)	4 (40%)	3 (30%)
	Total	10	10	10	10	10	10
GRUPO EXP. 2	0		1 (10%)	5 (50%)	4 (40%)	6 (60%)	6 (60%)
	I		3 (30%)	3 (30%)	3 (30%)	2 (20%)	3 (30%)
	II	6 (60%)	4 (40%)	-	-	-	-
	III	4 (40%)	1 (10%)	1 (10%)	2 (20%)	2 (20%)	1 (10%)
	Total	10	9	9	9	10	10

El 60% de los pacientes del grupo control no presentó ninguna mejora en la escala de RB a los 12 meses del seguimiento (P11, P14, P17, P22, P28, P33). En 3 casos (30%) se produjo una subida al grado anterior que podríamos interpretar como una mejoría relativa (P05, P19 y P32), y únicamente 1 paciente (P04) se mostró asintomático (grado 0) a los 12 meses del seguimiento (*Figura 30*).

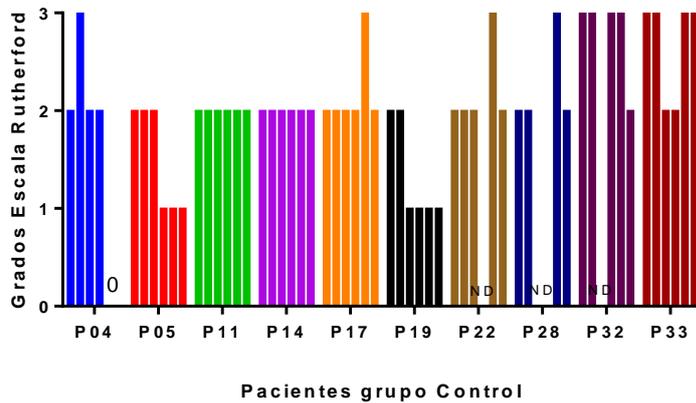


Figura 30: Evolución de los pacientes del grupo control en la Escala de RB durante el transcurso del ensayo. Cada paciente está representado por un color. Las barras representan cada una de las visitas realizadas durante el seguimiento. “Cero (0)” implica paciente asintomático. ND: datos no disponibles.

En el grupo experimental 1, el 40% (4 casos) se presentó asintomático al final de su seguimiento (P06, P08, P15, P16), mientras que el 20% de los pacientes (P10, P13) experimentó una mejora de un grado en la escala de RB. A los 12 meses del tratamiento celular no existen cambios en la graduación de la escala en el 30% de ellos (3 casos) (P01, P03, P12), si bien tanto el paciente P01 como el P03 experimentaron una disminución de 2 y 1 grado respectivamente, al mes de la infusión celular. Esta mejoría es atribuible al medicamento celular. Dicha mejoría no fue continuada en el caso el paciente P01, puesto que a los 3 meses volvió a presentar la graduación que poseía al principio del ensayo, es decir, grado 3. En el caso del paciente P03, la mejoría después de la infusión celular se prolongó hasta los 6 meses posteriores a la infusión celular. En la visita de los 9 meses volvió a presentar la graduación inicial, grado 2. El paciente P09 sufrió un empeoramiento, pasando de un grado 2 en el momento de su selección a un grado 3 desde la infusión del medicamento celular. Este empeoramiento se atribuye a una reacción

adversa, que a juicio clínico pudo estar relacionada con la infusión celular, acompañada de fenómenos de isquemia en dedos de los pies, aumento del dolor y lesiones necróticas en tercer, cuarto y quinto dedos, base del primer dedo y cabeza del quinto metatarsiano (*Figura 31*).

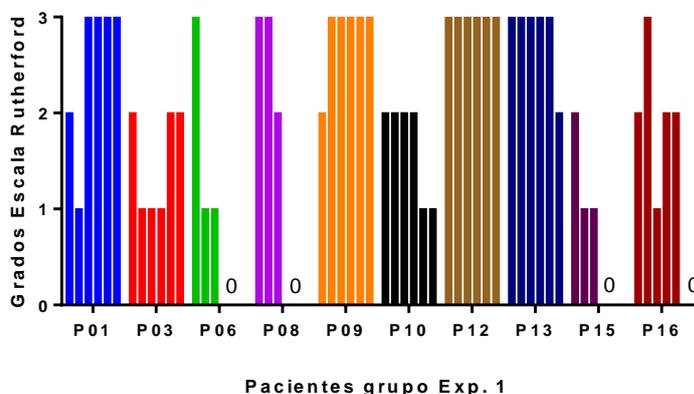


Figura 31: Evolución de los pacientes del grupo experimental 1 (dosis $0,5 \times 10^6$ cél/Kg peso paciente) en la Escala de RB durante el transcurso del ensayo. Cada paciente está representado por un color. Las barras representan cada una de las visitas realizadas durante el seguimiento. "Cero (0)" implica paciente asintomático. ND: datos no disponibles.

En el grupo experimental 2, los pacientes P18, P24, P25, P27, P31, P34 (60%) presentan un grado 0 en la escala de Rutherford a los 12 meses de la infusión del medicamento celular. En el 30% (P20, P23, P35) existe una disminución de un grado en la escala, si bien el paciente P35 se mantuvo asintomático en las visitas de los 3 meses hasta la visita de los 9 meses, pasando al grado I de la escala en el último mes de seguimiento. El paciente P20 presentó su mejora en la graduación al mes de la infusión celular, manteniéndola hasta el final del estudio. El paciente P23 experimentó a los 3 meses la disminución en la escala. El paciente P24 se muestra asintomático al mes de la infusión celular, manteniéndose en este estado hasta los 6 meses. Posteriormente, sufrió un empeoramiento en su estado, mostrando un grado 3 en la escala, retornando al grado 0 al final del seguimiento del estudio. Sólo en un caso (P29) no se observa ninguna mejora, atribuible a diversas amputaciones menores sufridas a lo largo del seguimiento. En términos generales, sorprende la rápida mejoría de los pacientes en el grupo experimental 2, ya que

tan sólo al mes de la infusión celular, ya hay un paciente asintomático, y a los 3 meses de recibir el tratamiento 5 pacientes se muestran asintomáticos (Figura 32).

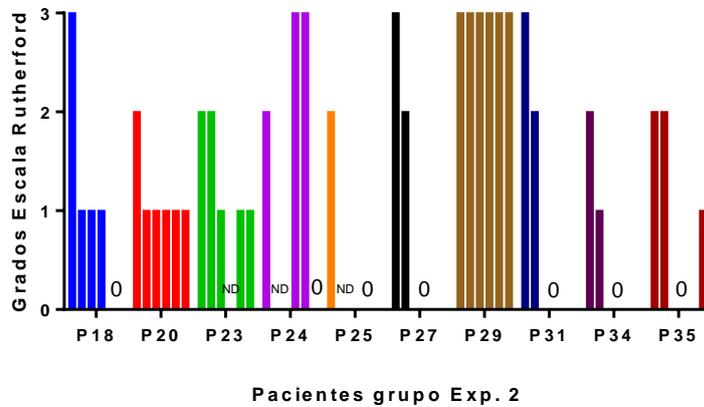


Figura 32: Evolución de los pacientes del grupo experimental 2 (dosis 1×10^6 cél/Kg peso paciente) en la Escala de RB durante el transcurso del ensayo. Cada paciente está representado por un color. Las barras representan cada una de las visitas realizadas durante el seguimiento. “Cero (0)” implica paciente asintomático. ND: datos no disponibles.

En cuanto al análisis estadístico, mientras que en los pacientes del grupo control no se aprecia ninguna mejoría estadísticamente significativa, en el grupo experimental 1 existe una disminución en la Escala de RB a los 12 meses de la infusión con respecto al tiempo basal (* $p < 0,05$) (Figura 35). En el grupo experimental 2 se observan mejoras desde el primer mes de la infusión celular, obteniéndose una significación estadística tanto a los 6 meses después del tratamiento ($p < 0,05$) como a los 12 meses ($p < 0,01$) (Figura 33).

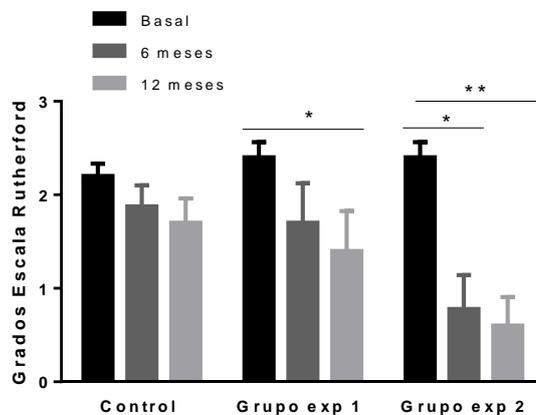


Figura 33: Evolución de los pacientes en la severidad de la enfermedad mediante la graduación en la escala de Rutherford-Beecher con respecto a su situación basal. $p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **

b) Índice tobillo-brazo (ITB)

Si bien el ITB puede ser un buen indicativo de la evolución de la patología durante el seguimiento de los pacientes, en nuestro estudio no pudo ser determinado en la mayoría de los casos. Únicamente en 11 de los 30 pacientes incluidos en el ensayo se obtuvieron las medidas en el momento basal, a los 6 y 12 meses. De éstas, sólo en 2 pacientes se obtuvo un registro válido; en el resto no fue valorable (*Figura 34*).

Se considera un ITB normal entre 1.0 y 1.2, y la EAP es diagnosticada cuando el ITB es < 0.9 . Sin embargo, individuos de edad avanzada y DM de larga duración pueden padecer calcificación en las arterias pedias, lo cual causa una elevación artefactual del ITB. De hecho, en nuestro estudio, varios pacientes exhiben valores considerados normales incluso en el momento basal, aunque por su historial clínicos y pruebas complementarias han sido diagnosticados con CLI.

En los casos en que se pudo realizar la medida el 56,67% presentó valores por debajo de 0,9 en alguna visita, y el 30% superior a 1,2.

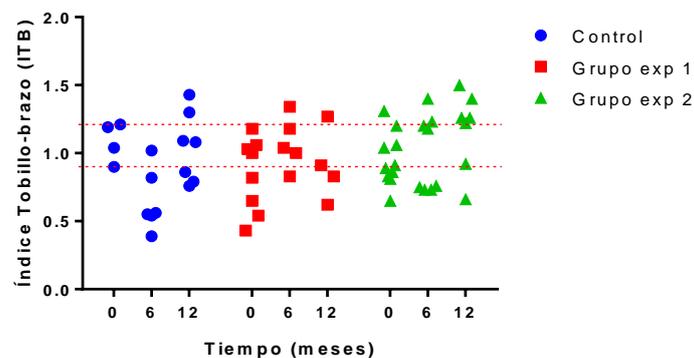


Figura 34: Medidas de ITB obtenidas en el momento basal, a los 6 y 12 meses del tratamiento. Se considera patológico un ITB < 0.9 , mientras que un ITB entre 1.0 y 1.2 se considera normal. Varios pacientes del estudio aparecen con valores considerados normales incluso al comienzo del ensayo. Esto se debe a una calcificación que presentan en las arterias, las cuales provocan falsos valores.

c) Presión transcutánea de oxígeno (tcpO₂)

La medición de la tcpO₂ analiza la microcirculación y la perfusión de los tejidos después de la difusión del oxígeno desde los vasos. Se tomaron como valores normales aquellos mayores de 40 mmHg, valores medios entre 20-40 mmHg y los valores con mayor riesgo de amputación los menores de 20 mmHg.

La media de los valores que presentaron al inicio del ensayo el grupo control y los grupos experimentales (1 y 2) fueron de 34,5 ± 16,56 mmHg; 32,4 ± 16,81 mmHg y 30 ± 12,88 mmHg respectivamente. Al finalizar el seguimiento (12 meses), los valores recogidos fueron 24,9 ± 16,21 mmHg; 28,3 ± 16,5 mmHg y 42,67 ± 16,1 mmHg, siendo el grupo experimental 2 el único que experimentó un aumento estadísticamente significativo (p<0.05) (Figura 35).

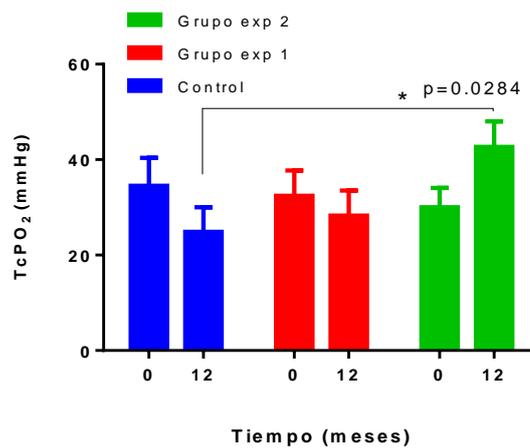


Figura 35: Evolución de los pacientes en la presión transcutánea de oxígeno (tcpO₂) a lo largo del ensayo. Evolución estadísticamente significativa del grupo experimental 2 vs. Control (*p<0.05)

El grupo experimental 2 presentó a la finalización del ensayo mayor número de pacientes con valores considerados normales respecto al grupo control y el grupo experimental 1 (60% vs. 20%). Así mismo, también se observó en este grupo menor porcentaje de pacientes con valores considerados con mayor riesgo de amputación (10% vs. 50% vs. 40%). Estos resultados pueden ser atribuibles a una respuesta positiva del organismo del paciente al tratamiento celular de mayor dosis (Figura 36).

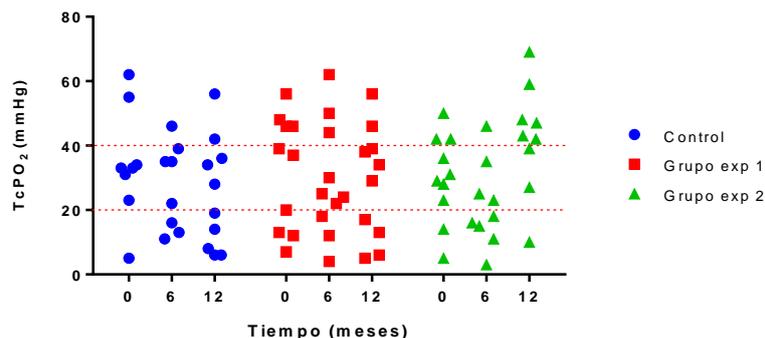


Figura 36: Evolución en la $tcpO_2$ en los distintos grupos de tratamiento durante el seguimiento del ensayo. Valores por debajo de los 20 mmHg se consideran de mayor riesgo para sufrir una amputación. Valores por encima de los 40 mmHg son considerados normales.

4.6. INVESTIGACIÓN DE LA REACCIÓN ADVERSA

Durante el transcurso del estudio se registraron dos reacciones adversas en dos pacientes aleatorizados en el grupo experimental 1 (P02 y P09) los cuales fueron comunicados a la agencia en las 24 horas siguientes. A juicio clínico y del promotor, podrían relacionarse con la infusión del producto utilizado en la terapia celular. El paciente P02 fue excluido del ensayo con posterioridad por causas no relacionadas con el tratamiento celular ni con la reacción adversa. El paciente P09 continuó en el estudio y completó todas las visitas del seguimiento.

El ensayo fue interrumpido para evaluar las causas subyacentes de las reacciones adversas y su posible relación con el producto celular utilizado.

4.6.1. DESCRIPCIÓN DE LAS REACCIONES

La trombosis aparece por una reducción de flujo de sangre, por lesiones en la pared vascular y por un aumento de la tendencia a la coagulación sanguínea (por ejemplo cuando aumenta la concentración de factores de coagulación o se altera el equilibrio normal entre coagulación y dilución de los coágulos a causa de determinados medicamentos).

Los dos pacientes refirieron opresión a nivel infrapoplíteo y reacción vasomotora de origen neurógeno en el tercio distal del miembro diana, acompañado de discreto dolor en las diez horas posteriores a la infusión celular. Se les realizó Eco

Doppler para comprobar la permeabilidad arterial, demostrándose la indemnidad de los vasos arteriales de mediano calibre. Los pacientes fueron tratados con terapia antitrombótica y fueron dados de alta a las 72 horas de desaparecer totalmente la sintomatología.

4.6.2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FIBRINOLÍTICA DEL PRODUCTO CELULAR

La formación de un trombo debido a condiciones patológicas como la DM y la CLI supone una barrera contra agentes externos. La red de fibrina que se produce debe ser degradada por la población celular endógena mediante la capacidad fibrinolítica que poseen (166), para facilitar la migración celular hacia las áreas lesionadas. Bajo este contexto, y debido a las dos reacciones adversas acontecidas, nuestro grupo consideró la hipótesis de una posible desregulación entre los procesos de formación de la fibrina y su subsecuente solubilización por parte de las MSCs utilizadas en el estudio. Los fenómenos de trombofilia asociados que se objetivaron después de la infusión celular, y de los que los pacientes eran portadores con anterioridad, (ambos pacientes cursaban con hiperfibrinogenemia), nos llevó a evaluar si el ambiente protrombótico generado por la DM puede influir en alguna de las propiedades fibrinolíticas de las AdMSCs utilizadas para la terapia. Al tratarse de un tratamiento autólogo, esta opción era posible.

Se analizaron mediante qPCR y ELISA los factores clave de la cascada fibrinolítica (niveles de t-PA y PAI-1) estimulando las AdMSCs bajo distintas condiciones, con el fin de evaluar si las AdMSCs derivadas de pacientes diabéticos como las usadas en el ensayo en el que se basa esta tesis manifestaban alguna desregulación en su capacidad fibrinolítica, ya que se ha descrito que el exceso o déficit de alguno de los factores del sistema de fibrinólisis-antifibrinólisis puede inducir trombosis (*Figura 37*).

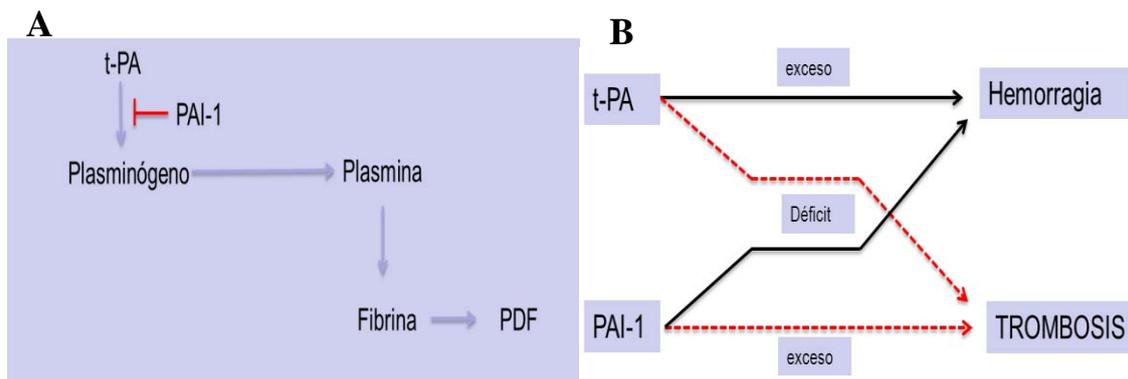


Figura 37. Esquema ilustrativo de la implicación de algunos de los factores que participan en la fibrinólisis y trombosis. A. t-PA: activador tisular del plasminógeno; PAI-1: inhibidor del activador de plasminógeno-1; PDF: productos de degradación del fibrinógeno. B. El exceso o déficit de alguno de los factores del sistema de fibrinólisis-antifibrinólisis puede inducir hemorragia o trombosis (Fuente: Imagen modificada de Vaughan, 1995)

Para ello, se cultivaron AdMSCs control (AdMSCs-C), AdMSCs de pacientes diabéticos (AdMSCs-D) y no diabéticos (AdMSCs-ND) en presencia de suero comercial (control), suero humano sano (Sh-S), diabético (Sh-D) y no diabético (Sh-ND). En condiciones control, mediante el análisis por qPCR las tres poblaciones celulares obtuvieron similares niveles de expresión de tPA, obteniéndose una disminución significativa ($p \leq 0,05$) en las AdMSCs-ND con respecto a las AdMSCs-C a nivel de proteína secretada (Figura 36).

Al estimularlas con suero humano (Sh-S, -D y -ND), los niveles tanto transcripcionales como de proteína secretada de tPA resultaron significativamente más bajos en AdMSC-D ($p \leq 0,01$) con respecto a las AdMSCs-C, sugiriendo que la adición de suero, independientemente de su origen inhibe la expresión de tPA en estas células (Figura 38).

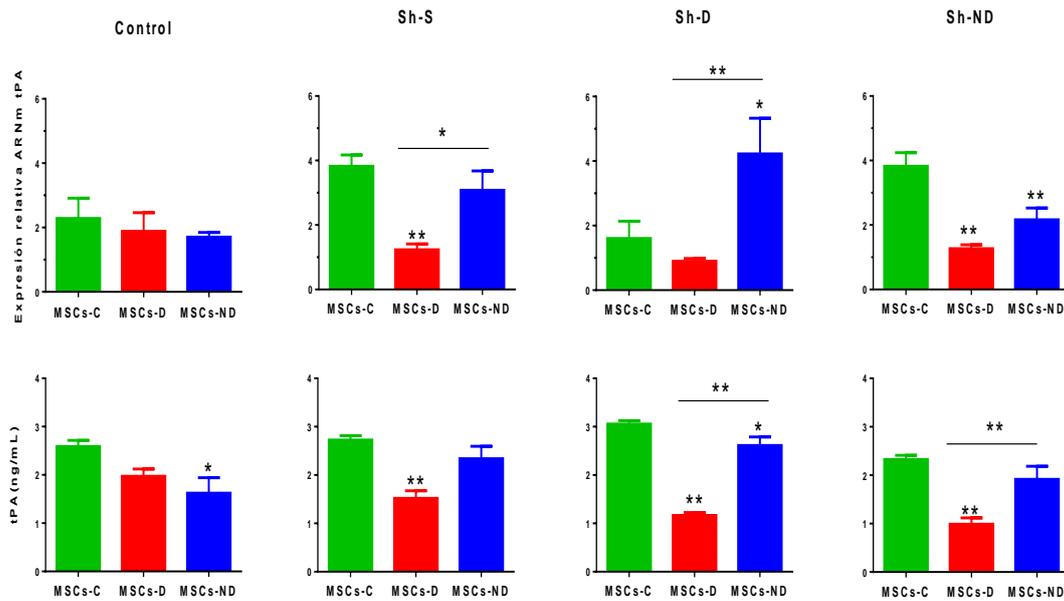


Figura 38. Detección de la expresión de tPA a nivel de ARNm (fila superior) y proteína (fila inferior) en AdMSCs procedentes de línea comercial (AdMSCs-C), paciente diabético con CLI (AdMSCs-D) y paciente no diabético con CLI (AdMSCs-ND) después de cultivarlas con suero comercial (Control), suero humano sano (Sh-S), suero humano diabético con CLI (Sh-D) y suero humano no diabético con CLI (Sh-ND). La expresión relativa de ARNm indica el ratio entre el gen específico y el gen de referencia (housekeeping). Los valores son normalizados respecto a la expresión de AdMSCs estimuladas, arbitrariamente establecidos como 1. Datos representados como media±error estándar (SEM). N=4. *p<0.05; **p<0.01.

Igualmente, se evaluaron los niveles de PAI-1. Se ha demostrado que un exceso de este inhibidor del sistema fibrinolítico promueve la deposición patológica de fibrina favoreciéndose los eventos trombóticos. Los niveles transcripcionales de PAI-1 fueron significativamente más altos en las AdMSCs-D en todas las condiciones de cultivo con respecto a las AdMSCs-ND. Las AdMSCs-C presentaron un patrón de expresión similar a las AdMSCs-D. Sin embargo, respecto a la cantidad de proteína liberada, las AdMSCs-D secretaron la mayor cantidad de PAI-1, llegando a los 400 ng/mL en presencia de Sh-D, mientras que las AdMSCs-C y las AdMSCs-ND, independientemente de las condiciones de cultivo, liberaron entre 150 y 200 ng/mL de proteína. En presencia del suero control AdMSCs-C y las AdMSCs-D secretaron niveles similares de PAI-1, mientras que las AdMSCs-ND lo hicieron en menor cantidad (Figura 39).

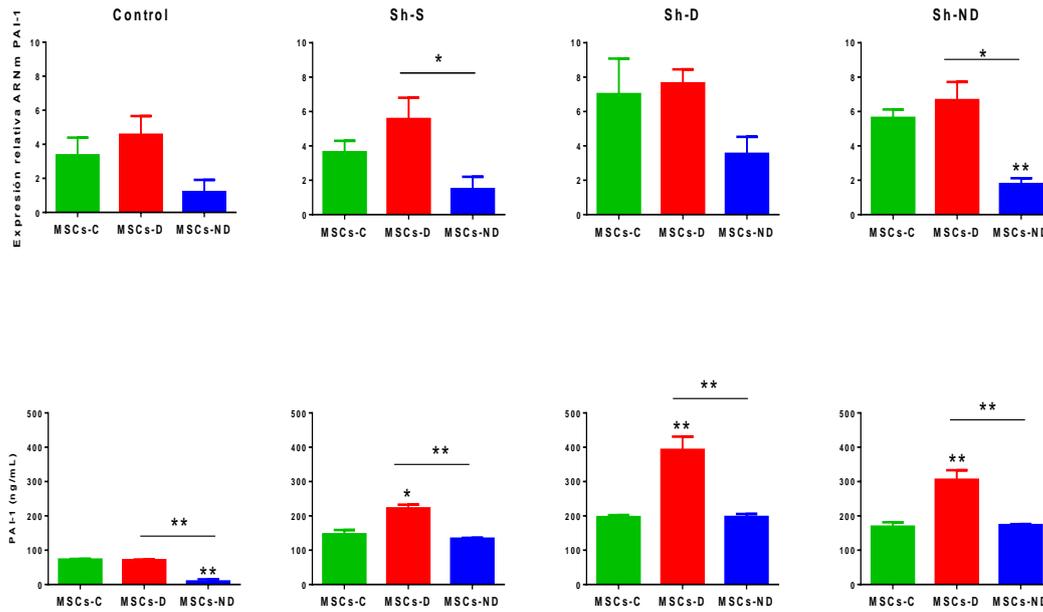


Figura 39: Detección de la expresión de PAI-1 a nivel de ARNm (fila superior) y proteína (fila inferior) en AdMSCs procedentes de línea comercial (AdMSCs-C), paciente diabético con CLI (AdMSCs-D) y paciente no diabético con CLI (AdMSCs-ND) después de cultivarlas con suero comercial (Control), suero humano sano (Sh-S), suero humano diabético con CLI (Sh-D) y suero humano no diabético con CLI (Sh-ND). La expresión relativa de ARNm indica el ratio entre el gen específico y el gen de referencia (housekeeping). Los valores son normalizados respecto a la expresión de AdMSCs no estimuladas, arbitrariamente establecidos como 1. Datos representados como media±error estándar (SEM). N=4. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

Para mimetizar una situación fibrinolítica *ex vivo*, las AdMSCs fueron cultivadas en geles de fibrina con suero control y en la presencia de los distintos sueros sanguíneos humanos (Sh-S, -D y -ND). La degradación del gel de fibrina se encontró desregulada (disminuida) en las AdMSCs-D, independientemente del suero sanguíneo humano adicionado (Figura 40), tal y como se observa por la lisis del gel alrededor de las células. Este efecto tuvo lugar independientemente de las condiciones de cultivo establecidas.

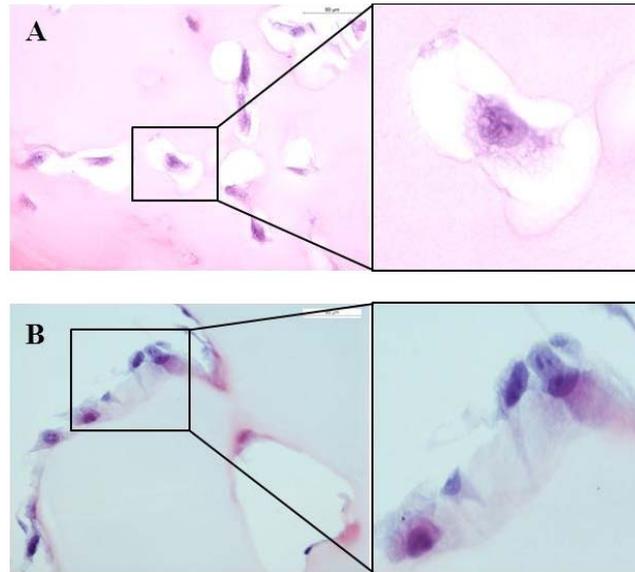


Figura 40. Degradación de gel de fibrina. Tinción eosina-hematoxilina (A). Degradación de gel de la fibrina por parte de las células control (AdMSCs-C). (B). Degradación del gel de la fibrina en AdMSC-D. Las células diabéticas tienen atenuada su capacidad fibrinolítica. Barra de escala: 50μm.

Para validar esta observación, se cuantificó la producción de Dímero-D (DD) por parte de las AdMSCs cultivadas en los gels de fibrina. El DD se produce tras la acción de degradación de la plasmina sobre la fibrina durante la fibrinólisis. Por tanto, es posible encontrar valores elevados de DD ante un aumento de la capacidad fibrinolítica. La cuantificación del DD dio como resultados valores disminuidos respecto al control, lo que se relaciona con un mayor riesgo protrombótico (Figura 41).

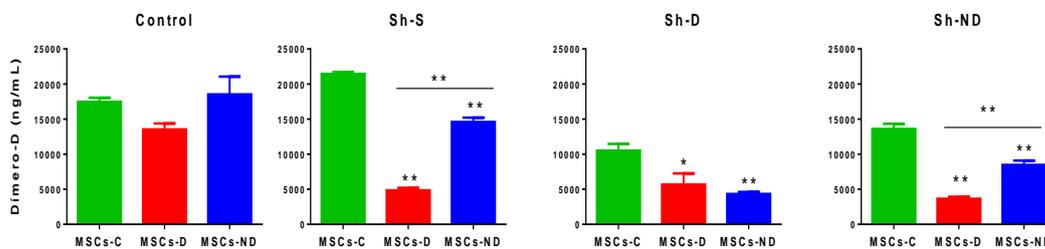


Figura 41. Cuantificación de Dímero-D en AdMSCs procedentes de línea comercial (AdMSCs-C), paciente diabético con CLI (AdMSCs-D) y paciente no diabético con CLI (AdMSCs-ND) después de cultivarlas con suero comercial (Control), suero humano sano (Sh-S), suero humano diabético con CLI (Sh-D) y suero humano no diabético con CLI (Sh-ND). Los valores son normalizados respecto a la expresión de AdMSCs no estimuladas, arbitrariamente establecidos como 1. Datos representados como media±error estándar (SEM). N=4. *p<0.05; **p<0.01.

En resumen, los resultados anteriormente descritos mostraron que los factores fibrinolíticos de las AdMSCs-D se encuentran desregulados, con niveles aumentados de PAI-1 y disminuidos de t-PA, tanto a nivel de transcripción como de proteína. Así mismo, la cuantificación de DD también resultó disminuida. Como consecuencia, la eficacia de la fibrinólisis disminuye, favoreciéndose de esta forma la trombosis.

V. DISCUSIÓN

La isquemia en miembros inferiores representa el estado más severo de la EAP, y los pacientes diabéticos la sufren de una forma más avanzada y difusa que los sujetos o pacientes no diabéticos. El objetivo principal para el tratamiento de esta patología es la revascularización quirúrgica o endovascular. Sin embargo, una gran proporción de pacientes no son aptos a dicha revascularización debido principalmente a la extensión anatómica y la distribución de la lesión. Actualmente, el tratamiento farmacológico y/o quirúrgico no ha mostrado ser efectivo, por lo que es pertinente la búsqueda de procedimientos alternativos con el fin de mejorar los tratamientos actuales disponibles, tal y como es el caso de este trabajo de tesis.

La angiogénesis terapéutica se ha convertido en una de las estrategias utilizadas para la proliferación de vasos colaterales en los tejidos isquémicos. Existen varios métodos para mejorar la perfusión tisular tales como la administración de factores de crecimiento mediante proteínas recombinantes (medicamentos biológicos) (190,191), o transfiriendo los genes que los codifican insertados en vectores (terapia génica) (192). Ambas terapias han mostrado que promueven la angiogénesis en territorios isquémicos en modelos preclínicos (193), pero en los ensayos clínicos existentes se han obtenidos beneficios modestos (194,195). Aunque cuentan con ciertas ventajas, también refieren una serie de inconvenientes. Por ejemplo, con respecto a los medicamentos biológicos, la brevísima vida media que tienen estos factores obligaría a una administración continuada que elevaría brutalmente los costos (196). Además, esta liberación constante de dichos factores puede conducir al desarrollo de angiogénesis patológica (197). En cuanto a la terapia génica, se desconoce la cantidad exacta de factores de crecimiento que se sintetizan a través de los genes seleccionados para tal fin. Asimismo, la introducción de material genético extraño o de virus conlleva el riesgo potencial de una respuesta inflamatoria sistémica, persistencia viral, integración del ADN viral en el genoma del paciente o alteraciones en la regulación de ciertos genes (196).

En contraste, la terapia celular puede proporcionar una fuente continua de factores de crecimiento además de elementos estructurales para la angiogénesis terapéutica. Desde un punto de vista general, la terapia celular ofrece la posibilidad

de regenerar el tejido dañado mediante un procedimiento mínimamente invasivo. Además, al tratarse en nuestro caso de una terapia autóloga, no existe riesgo de rechazo inmunológico. Económicamente, hoy día se considera una terapia cara, aunque en previsión de las aplicaciones clínicas que ofrece, se prevé una disminución de los costes haciendo que el procedimiento se considere competitivo en relación a las terapias actuales.

Aunque si bien es cierto que ninguno de los tres métodos mencionados anteriormente cuentan con suficientes estudios para saber cuál proveería el mejor efecto en cuanto a la dosis, frecuencia de aplicación y vías de administración, la terapia celular se posiciona como una de las posibles alternativas de tratamiento para promover la angiogénesis en pacientes/casos sin posibilidades terapéuticas, tal y como queda acreditado por las investigaciones preclínicas y por los numerosos ensayos clínicos que se están desarrollando en este campo (*Tabla 6*).

Los mecanismos por los que la terapia celular mejora la perfusión tisular no están bien definidos, siendo la búsqueda del tipo celular más adecuado para la CLI y otras patologías isquémicas un reto para la medicina regenerativa en la actualidad. Varios tipos celulares han sido evaluados como potenciales candidatos para la mejora de la perfusión y la prevención de la amputación que puede generar esta enfermedad (105,106,198–200). Existen numerosos ensayos y estudios experimentales donde el trasplante de la fracción mononuclear de la MO, o aquella procedente de la sangre periférica, ha conseguido regenerar una red capilar, aumentar la red de circulación lateral e incluso aumentar el flujo sanguíneo tanto en animales como en humanos (111,141,142). El estudio TACT fue el primer ensayo clínico randomizado y controlado que se llevó a cabo para evaluar el uso de células mononucleadas procedentes de la MO para tratar EAP. Aunque los resultados fueron estadísticamente significativos para los sujetos isquémicos tratados del estudio en cuanto a ITB, $TcpO_2$ y dolor en reposo, los pacientes con diabetes fueron excluidos del ensayo (111). Sin embargo, las células mononucleadas de la MO utilizadas en los ensayos clínicos son una población heterogénea de células que a día de hoy, no ha sido completamente caracterizada. Además, la administración de la fracción mononuclear de la MO no está exenta de subtipos celulares con posible actividad proinflamatoria (linfocitos y neutrófilos).

Por tanto, debido a su composición celular (*Figura 11*), así como a la variabilidad existente en el proceso de obtención (con posible contaminación de sangre periférica), es difícil establecer una definición de medicamento celular a partir de BM-MNCs.

A este respecto, es posible que un mayor efecto y/o un beneficio más persistente se pueda conseguir mediante una población celular más definida. Además, actualmente no se conoce qué combinación de células progenitoras podría ser más beneficiosa en términos terapéuticos en humanos. Una posibilidad consistiría, por ejemplo, en una combinación de EPCs purificadas junto con otros precursores asociados con la estabilización de la red endotelial como las MSCs (201).

En pacientes diabéticos se ha comprobado que los mecanismos de neovasculogénesis no funcionan adecuadamente, mostrando una movilización dañada de las células procedentes de la MO (202,203) así como una circulación disfuncional de progenitores. Existen evidencias que apuntan a que la DM está asociada con una reducción generalizada de EPCs circulantes (152,202,204). Bajo este contexto y tras la experiencia previa de nuestro grupo con pacientes diabéticos tratados con inyección intra-arterial de células mononucleares de MO (83), la cual demostró ser segura, factible y eficaz, se decidió diseñar un nuevo ensayo clínico fase I-II para obtener datos sobre la seguridad y factibilidad sobre el uso de la terapia celular con células troncales mesenquimales autólogas procedentes de tejido adiposo para tratar una complicación derivada de la diabetes como es la isquemia crónica en miembros inferiores. MSCs aisladas de diversas fuentes han mostrado ser efectivas en modelos experimentales para el tratamiento de la isquemia (134). Asimismo, la facilidad de su obtención, su capacidad de expansión *ex vivo* y sus características inmunomoduladoras, fibrinolíticas y antiinflamatorias las convierten en una prometedora fuente de células troncales adultas para su uso en patologías isquémicas.

En nuestro estudio se evaluaron 30 pacientes diabéticos con isquemia crítica en al menos uno de los miembros inferiores sin alternativa terapéutica. La mayoría (96,6%) presentaron DM2, a excepción de un paciente diagnosticado con DM1. La severidad de la enfermedad fue evidente, puesto que la población de nuestro estudio se encontraba entre los grados más severos de la escala de Rutherford-

Becker (II-4, III-5 y III-6). Estudios anteriores al nuestro han excluido a la población diabética (111), han incluido un número reducido de pacientes con diabetes (205,206), reflejaron diferentes patologías (Buerger, tromboangeitis obliterante, etc) y/o han excluido a los pacientes con CLI más avanzada (205,206).

Nuestro producto en investigación (M.E.I.) utilizado se ajustó a la definición de “Medicamento de Terapia Celular” según lo descrito en la Orden SCO/3461/2003 de 26 de Noviembre. El proceso se realizó bajo los protocolos diseñados, siendo aprobados y validados por el CEIC del H.U. Virgen Macarena de Sevilla y la AEMPS. Se actuó de acuerdo con la Ley General de Sanidad, la Ley de Garantías y el Uso Racional de los Medicamentos y Productos Sanitarios y según el RD 561/1993 y el RD223/2004.

El procedimiento de extracción y la infusión celular se realizaron con sedación y en régimen ambulatorio o de corta estancia, siendo el riesgo anestésico mínimo. Tras la biopsia abdominal, 3 pacientes presentaron ocasionalmente eritema y/o dolor en la zona. Tras la infusión celular, 1 paciente refirió dolor en el área de infusión, precisando tratamiento profiláctico con antibioterapia. No se percibió ninguna otra sintomatología al respecto.

Se realizaron un total de 20 infusiones intra-arteriales con el medicamento celular descrito (AdMSCs autólogas), 10 con una dosis de $0,5 \times 10^6$ células/kg paciente (Grupo Experimental 1) y 10 con una dosis de 1×10^6 células/kg paciente (Grupo Experimental 2). En todos los casos se obtuvo la dosis celular requerida, cumpliéndose los criterios de fabricación y liberación del medicamento celular en todos los casos infundidos. Todos los pacientes que recibieron el tratamiento celular finalizaron el seguimiento y por tanto el ensayo. El hecho de proponer dos dosis celulares consiste en obtener más información para poder responder a una de las grandes preguntas relacionadas con la terapia celular, que es la dosis óptima necesaria para la obtención de los resultados deseados (207,208). Puesto que las dosis óptimas para su aplicación clínica se desconocen, y existen ciertas complicaciones al respecto (logística, randomización, coste, etc), es necesario realizar estudios de dosificación del mismo modo que se hacen con los fármacos usados en la práctica clínica habitual.

El proceso de cultivo y producción celular cursó sin incidencias significativas, cumpliéndose en todo momento las NCF y siguiendo los protocolos diseñados. El cultivo celular de un paciente (P26) mostró 2 cariotipos anómalos en dos análisis realizados en pases celulares diferentes. A diferencia de otros grupos que obtienen el resultado del cariotipado después de la infusión celular al paciente, en nuestro ensayo el análisis se realiza antes de la liberación del producto celular. Aunque el producto a infundir se trata de células autólogas y en principio su infusión en el paciente no debería verse comprometido, al no cumplir con los criterios impuestos de estabilidad genética, fue desechado y no infundido. Como consecuencia, el paciente P26 fue excluido del ensayo. A este respecto, nuestro grupo intenta limitar el potencial de anormalidades cromosómicas realizando la expansión del medicamento celular bajo NCF y en condiciones GMP para asegurar el control y la seguridad del proceso. Igualmente, intentamos evitar el alto grado de proliferación celular eligiendo correctamente las condiciones de cultivo y mantenemos al mínimo el número de duplicaciones de la población celular. La técnica utilizada para cariotipar es el bandeo G, existiendo actualmente procesos más avanzados y sensibles que podrían aportar más información al respecto, como las técnicas FISH (hibridación fluorescente "in situ"), la HGC (hibridación genómica comparada), el SKY (cariotipo espectral de colores) o los estudios cromosómicos de bandeo extendido.

No se observó ninguna reacción de tipo inmunológica en ninguno de los pacientes infundidos, si bien las células son cultivadas *ex vivo* durante un tiempo que varía entre 2-4 semanas según dosis, poniéndose de manifiesto las propiedades inmunogénicas que acredita este tipo celular. Aunque el control de la función inmunomoduladora no está considerado actualmente como un criterio para la liberación del producto celular, y en principio su uso autólogo no parece verse comprometido, la implementación de tests que certifiquen su estado inmunoprivilegiado sería muy recomendable.

Por todo lo anteriormente expuesto, en relación a la factibilidad del estudio, no encontramos ninguna dificultad técnica durante la obtención de la muestra, su procesamiento y cultivo así como en la aplicación del tratamiento celular.

Desde el punto de vista de la seguridad del tratamiento, encontramos la terapia celular segura, sin un incremento en el desarrollo de tumores o fallecimientos asociados con la terapia. El porcentaje de AAG fue bajo y no se registró ningún AA fatal relacionado con los procedimientos de la aplicación de la terapia celular. No obstante, 2 pacientes del estudio sufrieron reacciones adversas serias en las horas posteriores a la infusión celular, teniendo que ser tratados con una terapia antitrombótica agresiva. La microtrombosis distal experimentada por estos pacientes fue abordada desde distintas perspectivas:

1. Se modificó nuestro procedimiento de infusión celular a los pacientes del ensayo debido a la existencia de investigaciones preclínicas en las cuales la inyección intraarterial de MSCs provocó la oclusión de la vasculatura distal (173). La modificación consistió en la administración de un *cocktail* espasmolítico con heparina sódica tras la canulación del acceso a la arteria radial, femoral o humeral.
2. Se instauró un estudio de trombofilia completo como prueba a realizar en el reclutamiento de los pacientes para detectar posibles factores protrombóticos (209).
3. Se investigó si la causa podría deberse a la relación entre el medicamento celular utilizado y el potencial estado trombótico que presentan los pacientes diabéticos. A este respecto, se ha demostrado que dichos pacientes muestran una actividad fibrinolítica alterada (210). Nuestros resultados sobre las MSCs que se encuentran inmersas en un ambiente diabético, demostraron igualmente que su capacidad fibrinolítica se encuentra desregulada (en cultivos *ex vivo* en contacto con suero diabético) (167). Esto ha sido confirmado por otros grupos, así como que el ambiente diabético afecta al fenotipo celular de diversas maneras (220,221). Datos recientes apuntan a que la diabetes influye en la población celular endógena, por lo que es fundamental investigar la funcionalidad de las células procedentes de pacientes enfermos para ser utilizadas en terapia celular antes de considerar su infusión con propósitos terapéuticos. Sin embargo, las reacciones adversas registradas fueron tratadas y no desembocaron en un AA severo.

Aunque el estudio en el que se basa esta memoria se trata de un ensayo en fase I-II y el número de pacientes incluidos no nos permite realizar una declaración firme

respecto a la eficacia clínica, se han observado una serie de efectos que podrían ser atribuidos a la terapia celular, como son:

Neovascularización de arterias colaterales

Normalmente, la valoración de la eficacia de la terapia celular en la EAP severa se basa en la mitigación del dolor y la disminución en la tasa de amputación, o en tests funcionales como el ITB y la tcpO₂, los cuales reflejan la perfusión del miembro isquémico (83,141,213). Si bien estos parámetros también son tenidos en cuenta en este ensayo como variables secundarias, ninguno de los estudios previos ha demostrado la neovascularización en pacientes diabéticos con CLI mediante un método cuantitativo (únicamente en estudios preclínicos en animales de experimentación). Actualmente no existe una medida fidedigna del flujo sanguíneo a nivel tisular en tejidos isquémicos. Esto supone un impedimento para el desarrollo terapéutico puesto que las medidas usuales como la amputación de la extremidad suponen un desafío para el diseño de ensayos en fases iniciales. La neovascularización puede ser demostrada directamente, por seguimiento angiográfico o mediante un examen anatomopatológico de los miembros amputados (214) los cuales no incorporan el área de inyección celular. Al igual que en el ensayo piloto llevado a cabo por nuestro grupo (83), en nuestro estudio objeto de esta tesis, utilizamos el software MetaMorph® el cual fue capaz de cuantificar el árbol vascular (215–217). El 35% de los pacientes del ensayo presentaron un incremento en la vascularidad en las áreas isquémicas después de la infusión celular (*Figura 26*). Dicho aumento correlacionó con el estado clínico y con una mejora sintomática en el miembro diana al año de seguimiento. Una de las limitaciones a este respecto fue que no se realizaron las DSA y, por tanto, no se recibieron las imágenes correspondientes, o bien éstas no cumplían los criterios para su evaluación (en un 25% de los casos), por lo que el porcentaje de éxito obtenido podría haber resultado mayor. La cuantificación basal se realizó en el 95% vs 75% de los casos en el periodo de los 6 meses y 80% en el periodo de los 12 meses. Asimismo, se intentaron recoger las imágenes de las angiografías realizadas al miembro contralateral puesto que podrían suponer una información valiosa al ser comparadas con las realizadas en la extremidad considerada miembro diana, aunque, igualmente, no se recibieron o no cumplieron los criterios

de evaluación. Otra limitación observada es la ausencia de angiografías en el grupo control durante el seguimiento. Al tratarse de una técnica invasiva, se consideró en un principio no realizarla en los individuos que no iban a someterse a la infusión celular por motivos obvios. La angiografía sigue siendo el estándar de referencia más empleado para obtener información del territorio afectado. Aun así, contempla una serie de limitaciones como las provocadas por la proyección en las lesiones arteriales no concéntricas, muchas veces en un único plano. Así mismo, hay vasos de salida distal permeables que no son visualizados en la DSA, incluso selectiva, por problemas de artefactos de movimiento y de salida y dilución del contraste. Por tanto, para la validación del software MetaMorph® como posible herramienta para la medición cuantitativa de la neovascularización y de cara a futuros ensayos, la obtención y tratamiento de las angiografías debe realizarse de manera más rigurosa.

Ausencia de amputaciones mayores

Los pacientes diabéticos tienen mayor riesgo de sufrir amputaciones en las extremidades inferiores que los pacientes no diabéticos y no hay evidencias convincentes de que los procesos de revascularización actuales sean eficaces para prevenir la amputación (3). En el transcurso de nuestro ensayo no se tuvo que realizar ninguna amputación mayor, si bien tuvieron lugar amputaciones menores (a nivel digital) en 5 pacientes. Una de ellas tuvo lugar en el miembro contralateral, otra fue realizada a un paciente asignado al grupo control, y tres de ellas se realizaron en pacientes de los grupos experimentales cuya enfermedad se encontraba muy avanzada.

Cicatrización de úlceras

La cicatrización de las úlceras tróficas diabéticas previas en los dos grupos de tratamiento con células fue más rápida, presentando un tejido de granulación muy vascularizado en la mayoría de los casos con respecto al grupo control, cuya evolución ocurrió de una manera más lenta y discreta (*Figura 27*).

Disminución del dolor

Aunque el dolor se redujo en un 60% de los pacientes, de los que un 53,3% pertenecían a los grupos de tratamiento celular y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control vs grupos tratados con células (*Figura 28*), los datos deben ser analizados con precaución debido a la neuropatía asociada que presentan la mayoría de los enfermos con DM, la cual provoca pérdida de sensibilidad en las piernas y pies entre otros síntomas.

Mejora en la Escala de RB

Debido a que el dolor es uno de los síntomas principales de esta enfermedad y se considera un factor diagnóstico, se aplicó la graduación establecida por RB (54). Esta clasificación no es únicamente una clasificación funcional del paciente, sino que tiene importantes implicaciones pronósticas: en el grado I la mortalidad a los 5 años es de un 25-30%, mientras que en los estadios II y III la mortalidad es del 25% al año y del 75% a los 5 años. Al inicio de nuestro estudio, el 66,67% de los pacientes presentaban el grado II mientras que el 33,3% presentaban el grado III de la escala de RB. La mayoría de los pacientes mejoraron su estado clínico, como evidencia la disminución de la severidad del grado evolutivo en dicha escala, siendo significativa en los grupos tratados con el medicamento celular (*Tabla 18; Figura 33*). La mejoría por grupos de tratamiento dio como resultado un 60% en el grupo tratado con una dosis celular de $0,5 \times 10^6$ células/Kg peso paciente, un 80% en el grupo infundido con 1×10^6 células/Kg peso paciente y un 40% en el grupo control.

Aumento en los valores de tcpO₂

Los resultados obtenidos en la tcpO₂ concuerdan con otros estudios similares (205,218). Se obtuvieron valores más significativos en el grupo experimental 2 de tratamiento celular (*Figura 35 y 36*). En enfermos diabéticos, la principal utilidad de esta técnica es medir la capacidad de cicatrización de las lesiones tróficas, así como el éxito de la revascularización (219,220). Los valores normales se encuentran alrededor de los 60 mmHg, si bien valores por encima de los 40 mmHg también se han considerado aptos para una correcta cicatrización, aunque muchos

autores han presentado resultados positivos por debajo de estos puntos (221). Las mediciones varían con la edad, localización de la medición, gasto cardíaco, actividad metabólica, disociación de la hemoglobina y la difusión de O₂ a través de los tejidos entre otros factores. En nuestro estudio, los valores obtenidos fueron divididos en tres grupos, ya que según la bibliografía, presiones transcutáneas por debajo de los 20 mmHg suponen un riesgo elevado de amputación mayor en pacientes con lesiones cutáneas (222). En cambio, mediciones por encima de los 40 mmHg se han considerado válidas para una correcta cicatrización. A la finalización del estudio, el 50% de los pacientes del grupo control mostraron valores de tcpO₂ por debajo de los 20 mmHg, mientras que el grupo experimental 1 y 2 presentaron un 40% y un 60% de los pacientes respectivamente con valores por encima de los 40 mmHg (*Figura 36*).

Niveles de glucosa

Al igual que en nuestro ensayo previo con células mononucleadas de MO, en el estudio en el que se basa esta tesis cabe destacar, aunque no estaba considerada como una variable del estudio, que en los grupos que recibieron células, 7 pacientes (35%) refirieron encontrar mejor control de los niveles de glucosa; 3 de ellos (15%) redujeron las necesidades de insulina, y otros 3 (15%) suspendieron el tratamiento con insulina y/o ADO por regularización de sus niveles glucémicos. Sin embargo, en el grupo control, ninguno de los pacientes asignados a este grupo experimentó normalizaciones en los niveles de glucemia ni se reportaron cambios en los tratamientos relacionados. Estas observaciones son importantes debido al tipo de patología y a las características de los pacientes incluidos en el estudio y han sido documentadas igualmente por otros grupos (223,224). La posible explicación de esta observación puede radicar en las características intrínsecas de las MSCs, como sus propiedades antiinflamatorias, la posible inducción de regeneración de células productoras de insulina, y la inhibición de la respuesta inmune mediada por células-T contra las células β nuevamente formadas, las cuales a su vez, son capaces de sobrevivir en un ambiente alterado inmunológicamente (225-227). Puesto que estas observaciones no formaban parte de los objetivos del ensayo, no se realizaron pruebas de péptido-C ni del índice HOMA-β y HOMA-IR (*homeostatic model assessment*). Dichas pruebas han sido

incorporadas en otro ensayo diseñado y llevado a cabo por el grupo (#NCT02287974) para evidenciar la mejora en las necesidades de insulina de este tipo de pacientes tras ser tratados mediante distintos tipos de terapia celular.

Aunque existen datos prometedores como los expuestos anteriormente, el diseño de Fase I-II no permite concluir cual es la eficacia clínica de la terapia celular. El diseño de ensayos clínicos que emplean la terapia celular se encuentra con una serie de inconvenientes debido a la heterogeneidad para definir la CLI y la dificultad para definir pruebas clínicas que objetiven el proceso y validen los resultados. De este modo, a menudo los investigadores se ven obligados a agrupar a una población heterogénea de pacientes, con el fin de conseguir un grupo de estudio suficiente. Es por ello que en muchos ensayos nos encontramos con pacientes con grado II-4 (dolor en reposo), grado III-5 (pérdida de tejido menor o úlceras no cicatrizadas) y grado III-6 (pérdida de tejido mayor o gangrena) en la escala de RB tratados como un único grupo, siendo la severidad de la enfermedad considerablemente distinta entre ellos. En este sentido, es difícil hacer comparaciones entre estudios. Además, puesto que la CLI a menudo es una enfermedad multisegmentaria, es complicado comparar los resultados obtenidos en los pacientes basándose únicamente en criterios angiográficos. Al no existir actualmente una evaluación estandarizada sobre la perfusión de arterias isquémicas, el grado de revascularización en pacientes será considerado de manera desigual.

Puesto que los pacientes que sufren CLI tienen una alta tasa tanto de morbilidad como de mortalidad, el conseguir estar libre de amputación suele ser un *endpoint* ampliamente aceptado en los ensayos clínicos. Sin embargo, esta situación requiere ensayos en fase III con la suficiente población y con el suficiente tiempo de seguimiento para evaluar las diferencias existentes en la tasa de amputación en relación con la aplicación de terapia celular. De hecho, la mayoría de los estudios que lo han demostrado, se han basado en resultados indirectos, los cuales tienen un cierto grado de subjetividad.

Las medidas fisiológicas tales como el ITB y la $tcpO_2$ son usadas comúnmente en pequeños ensayos clínicos. El ITB es un método barato y no invasivo para la patología que nos ocupa, y refleja en gran parte la enfermedad macrovascular.

Estas medidas pueden mejorar después de revascularización quirúrgica o endovascular, pero sin embargo, la terapia celular normalmente resulta en un incremento en la formación de los vasos pequeños, y por tanto, la significancia de las medidas de ITB tras la terapia celular no está muy clara. A diferencia del ensayo piloto llevado a cabo por nuestro grupo, en este estudio en el que se basa la tesis, el ITB no pudo determinarse en la mayoría de los casos debido a que no se recibió señal, la arteria no era compresible debido a la calcificación vascular que tienen los pacientes diabéticos dando valores inusualmente altos o porque se obtuvieron medidas incorrectas y/o incongruentes. Además, las obstrucciones proximales que crean colaterales importantes pueden dar valores normales enmascarándose la lesión subyacente. En estos casos, es recomendable realizar otras exploraciones como son las presiones sistólicas en los dedos de los pies u otras pruebas de imagen.

En cuanto al uso de la $tcpO_2$, aunque suele usarse como medida indirecta del daño microvascular, actualmente no existe una prueba de referencia en este sentido para comparar este método.

Con fines exploratorios, el diseño del ensayo contó con un grupo control, el cual recibió su tratamiento convencional durante el estudio. Este grupo experimentó cierta mejoría a lo largo del ensayo, como consecuencia del control riguroso y exhaustivo al que se vio sometido durante el periodo de seguimiento, situación que suele darse en los pacientes incluidos en ensayos clínicos. Aunque cada paciente es evaluado y comparado consigo mismo desde su situación basal hasta su situación final, al comparar el grupo control con respecto a los grupos tratados con el medicamento celular se observaron diferencias estadísticamente significativas en varios parámetros (*Figuras 28, 33 y 35*). Por tanto, estos resultados nos llevan a la necesidad de realizar nuevos ensayos clínicos que evalúen específicamente la eficacia clínica de esta potencial alternativa terapéutica.

Definiendo éxito terapéutico como el desarrollo de arterias colaterales cuantificadas por MetaMorph®, mejora clínica objetivada por disminución de la severidad de la enfermedad en la escala de RB, cicatrización de úlceras, encontrarse libre de amputaciones mayores y experimentar una disminución del

dolor objetivable clínicamente, podemos afirmar que ciertos pacientes sometidos a la terapia celular en la que se basa este trabajo de tesis cumplieron estas premisas.

Ante estos resultados, cabe hacernos la siguiente pregunta: ¿Por qué la terapia celular no produce la misma respuesta en todos los pacientes infundidos?

Algunas posibles respuestas serían:

1. La edad avanzada de los pacientes influye en las características terapéuticas de las células: la edad media de los pacientes incluidos en este estudio fue de 66.3 ± 10.5 años, por lo que estamos ante una población celular senescente. Está descrito que las células de personas de avanzada edad tienen comprometidas sus propiedades de replicación, vida media y secreción de factores entre otros. Al tratarse éste de un tratamiento autólogo, es posible que la población celular tenga un rendimiento bajo.

2. La CLI es una patología crónica y los pacientes incluidos en el ensayo son pacientes sin opciones de revascularización: la CLI es a menudo asintomática y puede estar presente durante años de manera silente. Es posible que la terapia celular sea más efectiva en pacientes diagnosticados tempranamente, con un grado de enfermedad menos severo. En este sentido, la terapia celular podría actuar de manera complementaria a los procedimientos quirúrgicos y endovasculares para abordar la enfermedad micro y macrovascular. Asimismo, la duración de la diabetes también puede influir en el potencial curativo de estas células. Igualmente, la medicación concomitante a la que están sometidos estos pacientes puede interferir de alguna manera en las vías de señalización, migración y proliferación de las células.

3. El protocolo de cultivo y expansión celular no está unificado: aunque la AEMPS recomienda una serie de normas a seguir para la producción de medicamentos celulares, en la actualidad no existe un protocolo ni una definición "universal" para el cultivo y expansión de las MSCs. Las diferentes fuentes de origen, así como las distintas metodologías de obtención de las células del tejido hacen muy difícil una comparativa entre grupos de investigación en busca del método más rápido, efectivo, económico, con mayor rendimiento y con la calidad requerida.

4. La viabilidad celular tras la infusión es escasa: es sabido que muy pocas células sobreviven tras la infusión, a pesar de que el seguimiento *in vivo* es éticamente y técnicamente complicado, es preciso seguir investigando en esta línea con el fin de conocer los mecanismos intrínsecos de la integración de las células infundidas en el microambiente concreto.

5. La dosis celular y el número de aplicaciones celulares para obtener los efectos deseados no se conocen: Investigaciones realizadas con HSCs han revelado que la administración de suficientes células promueve una recuperación celular más rápida y reduce las hospitalizaciones (228). Experimentos realizados con modelos animales murinos han establecido una dosis mínima de 1×10^6 cél/kg, cantidad necesaria para obtener beneficios cuantificables aunque débiles (229,230). La dosis para el tratamiento celular probablemente está influenciada por el peso corporal del paciente y la biodistribución de los factores paracrinamente secretados por las MSCs en el cuerpo humano. Aunque la mayoría de ensayos clínicos optan por una dosis celular como la utilizada en nuestro estudio (79,231) es posible que las dosis utilizadas aquí hayan sido insuficientes en la mayoría de los casos para mostrar unos beneficios terapéuticos claros. Esto nos lleva a diseñar futuros ensayos para testar distintas dosis celulares así como plantearnos la pregunta si es más beneficiosa una única pauta de administración o por el contrario, optar por dosis a intervalos.

Asimismo, el momento y el número idóneo de aplicaciones celulares siguen sin conocerse actualmente. Puesto que los medicamentos convencionales son pautados en el tiempo según dosis, quizás la terapia celular deba ser ajustada a este respecto.

6. El tipo celular más adecuado sigue siendo un reto para la medicina regenerativa: otra gran cuestión en terapia celular es conocer qué tipo celular es el más adecuado para cada patología concreta, o si una combinación de éstos sería más recomendable.

7. El modo para la administración celular sigue sin dar resultados concluyentes: Debido a que la viabilidad celular debe ser preservada lo más posible y el tejido enfermo se asocia a menudo con isquemia, fibrosis e inflamación, lo que podría

perjudicar la supervivencia celular, el suministro terapéutico de las células troncales en las áreas distales del tejido dañado parecen ofrecer alguna ventaja. La administración intramuscular resulta en un depósito transitorio de células en el tejido isquémico, mientras que la infusión intra-arterial como la utilizada en este estudio es pensada para dirigir a las células infundidas a zonas peri-isquémicas viables, con suficiente oxígeno y nutrientes para soportar las funciones celulares. Sin embargo, no hay resultados concluyentes acerca de un mayor beneficio entre los modos de administración existentes, por lo que se trata de otra variable a tener en cuenta para futuros ensayos clínicos.

8. La frecuencia de administración es actualmente desconocida: En nuestro estudio la pauta de administración fue de una aplicación única. Es posible que la efectividad de la terapia celular pueda estar relacionada con el número de aplicaciones al igual que lo establecido con los medicamentos usados convencionalmente.

9. El efecto terapéutico deseado depende de muchos factores: Puesto que los mecanismos de acción de las MSCs en la regeneración de tejidos es probablemente multifacético, la competencia celular puede ser dictada por la capacidad de las células inyectadas de migrar, sobrevivir, integrarse, diferenciarse y producir mediadores paracrinos funcionales ("*intertalk celular*"). Es conocido que muchas enfermedades entre las que se encuentra la DM afectan a las propiedades fenotípicas y terapéuticas de las MSCs. A este respecto, en este ensayo no realizamos ningún test de efecto para verificar que las capacidades angiogénicas, de acción, inmunomodulación y paracrinas de estas células no estaban dañadas. La implantación de este tipo de pruebas serían recomendables en los futuros ensayos que desarrollemos.

10. Finalmente, para que la terapia sea efectiva, el tejido del receptor debe responder favorablemente a las MSCs inyectadas, lo que resultaría en la activación de los mecanismos de regeneración endógenos (232). Comprender la integración de los mecanismos exógenos (células inyectadas) con los endógenos (receptor) jugará un papel decisivo en el futuro uso clínico de las células troncales adultas.

Quedan aún por responder muchas preguntas en el ámbito científico en relación a la aplicación clínica de las células troncales. La definición del perfil de paciente, tipo celular, dosis, vía de administración y posología, permitirá aumentar la eficacia de este medicamento celular.

Es por tanto crucial el desarrollo de nuevas investigaciones y ensayos clínicos para esclarecer los mecanismos de reparación utilizados por estas células, para así poder ofrecer un uso rutinario y seguro de la terapia con MSCs en ésta y en otras patologías que cursan sin tratamiento efectivo actualmente.

VI. PERSPECTIVAS FUTURAS

Los tratamientos basados en el uso de células somáticas humanas se posicionan como una nueva y prometedora alternativa terapéutica para algunas enfermedades como la tratada en esta tesis. Las MSCs se encuentran entre los tipos celulares más usados en esta nueva era de Medicina Regenerativa y sus múltiples características las hacen potenciales candidatas para el tratamiento de diversas patologías.

Desde nuestro grupo, seguimos contribuyendo a la investigación de la terapia celular en la DM y sus complicaciones asociadas. Desde la fecha de este ensayo, se han llevado a cabo varios estudios, como el NCT01745744 (www.clinicaltrials.gov) *“Estudio de la aplicación de Terapia de regeneración celular con células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo en pacientes no diabéticos con isquemia crónica en miembros inferiores”* que se encuentra en fase de cierre y el NCT02287974 (www.clinicaltrials.gov) *“Ensayo clínico fase I/II multicéntrico, abierto, aleatorizado y controlado para el estudio de las células madre como terapia celular en la isquemia crítica del miembro inferior en pacientes diabéticos tipo 2 insulinizados: estudio de las necesidades de insulina”*, con los que se pretende obtener datos relacionados sobre la fuente de tejido idónea, el tipo celular más adecuado, dosis óptima de infusión, protocolos de cultivo eficaces y de bajo coste entre otros para poder ofrecer en un futuro próximo una terapia de calidad, económica y eficaz para aquellos pacientes sin opciones terapéuticas actualmente.

Poco a poco se van dilucidando los mecanismos relacionados con la regeneración de tejidos y órganos, aunque todavía queda un largo camino por recorrer. La utilización autóloga de MSCs se ha presentado hasta la actualidad como una terapia segura en los ensayos clínicos registrados y publicados hasta el momento. Es necesario seguir investigando en éste y en otros aspectos asociados para conocer qué patologías concretas así como qué perfil de pacientes pueden verse más beneficiados por esta terapia. A este respecto, y según los datos obtenidos del ensayo clínico presentado en esta tesis, encontramos razones que apoyan el diseño de un medicamento alogénico con MSCs, basándonos principalmente en la edad del donante autólogo y en su patología subyacente (DM), así como en la medicación concomitante asociada. En este caso, dado la condición de inmunoprivilegiadas de estas células, la posibilidad de un tratamiento celular con MSCs alogénicas

procedentes de donantes jóvenes y sanos podría beneficiar a este grupo de pacientes.

Esta tesis pone de manifiesto que la terapia celular actual no es un proceso unidireccional, ya que surgen nuevas cuestiones durante el desarrollo de este estudio que tienen que ser abordadas desde el inicio, es decir, desde la perspectiva de la investigación básica. Por tanto, la clásica frase "*from bench to the bedside*" (del laboratorio a la clínica) implica una búsqueda de respuestas con base en las investigaciones previas al ensayo clínico, creándose una corriente en *feed-back* que nos lleva "*from bedside to the bench*" (de la clínica al laboratorio).

VII. CONCLUSIONES

1. Las AdMSCs autólogas son una fuente segura y de fácil obtención, comprobada científicamente, validada clínicamente y aprobada desde el punto de vista ético.
2. La terapia celular autóloga con AdMSCs en pacientes diabéticos con CLI mediante inyección intra-arterial supone un tratamiento seguro y factible.
3. El 35% de los pacientes diabéticos con CLI incluidos en nuestro ensayo experimentó un aumento de la angiogénesis en los miembros considerados diana tras la infusión de AdMSCs autólogas.
4. El uso del software MetaMorph® es una herramienta válida para la cuantificación del desarrollo de la angiogénesis y/o vasculogénesis durante el seguimiento de pacientes tratados con medicamentos celulares.
5. El uso de AdMSCs autólogas favorece la cicatrización de las lesiones tróficas asociadas a la diabetes en pacientes con CLI.
6. Los pacientes tratados con AdMSCs autólogas experimentaron una mejora clínica objetivada por la disminución de la severidad en el grado evolutivo de la escala de RB así como del dolor, el aumento de la tcpO₂ y el perímetro gemelar en los miembros tratados.
7. Ninguno de los pacientes incluidos en nuestro ensayo experimentó una amputación mayor del miembro afectado tras la infusión de AdMSCs autólogas.
8. Las reacciones adversas acontecidas en este estudio sugieren la necesidad de desarrollar nuevos ensayos clínicos que incluyan mejoras relacionadas con la caracterización y propiedades del medicamento celular para obtener el efecto terapéutico deseado, teniendo en cuenta el perfil de los pacientes seleccionados.
9. Los resultados derivados de este estudio, así como los conocimientos adquiridos en ensayos previos, nos llevan a proponer el uso de un medicamento celular alogénico para garantizar su funcionalidad y asegurar el éxito terapéutico en pacientes diabéticos con CLI que no responden a los tratamientos convencionales.
10. El desarrollo de una Terapia Celular no es un proceso unidireccional, siendo imprescindible en muchos casos volver a la investigación básica para afrontar y aclarar observaciones clínicas que surgen durante las etapas clínicas.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Diabetes FID. ATLAS de la DIABETES de la FID. Sexta ed. 2013. p. 1–159.
2. Dormandy JA, Rutherford RB. Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). *J Vasc Surg.* 2000 Jan;31(1 Pt 2):S1–296.
3. Faglia E, Favales F, Quarantiello A, Calia P, Clelia P, Brambilla G, et al. 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 Apr;21(4):625–30.
4. Black JH, LaMuraglia GM, Kwolek CJ, Brewster DC, Watkins MT, Cambria RP. Contemporary results of angioplasty-based infrainguinal percutaneous interventions. *J Vasc Surg.* 2005 Nov;42(5):932–9.
5. Isner JM, Rosenfield K. Redefining the treatment of peripheral artery disease. Role of percutaneous revascularization. *Circulation.* 1993 Oct;88(4 Pt 1):1534–57.
6. Golzar JA, Belur A, Carter LI, Choksi N, Safian RD, O'Neill WW. Contemporary percutaneous treatment of infrapopliteal arterial disease: a practical approach. *J Interv Cardiol.* 2007 Jun;20(3):222–30.
7. Campbell WB, St Johnston JA, Kernick VF, Rutter EA. Lower limb amputation: striking the balance. *Ann R Coll Surg Engl.* 1994 May;76(3):205–9.
8. Gu Y, Kokar C, Gooday C, Morrow D, Dhatariya K. A 5-Year Follow-up Study to Assess Clinical Outcomes of Patients with Diabetes Undergoing Lower Limb Angiography for Significant Peripheral Artery Disease. *Diabetes Ther.* 2015 Dec;6(4):481-493
9. Freedman SB, Isner JM. Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *Ann Intern Med.* 2002 Jan 1;136(1):54–71.
10. Heijnen H, van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J Thromb Haemost.* 2015 Sep 22.
11. Domouzoglou EM, Naka KK, Vlahos A, Papafaklis MI, Michalis LK, Tsatsoulis A, et al. Fibroblast Growth Factors in Cardiovascular Disease: The Emerging Role of FGF21. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015 Sep 15;309(6):H1029-38.
12. Novakova V, Sandhu GS, Dragomir-Daescu D, Klabusay M. Apelinergic system in endothelial cells and its role in angiogenesis in myocardial ischemia. *Vascul Pharmacol.* 2015 Aug 5: 1-10.
13. Van Raemdonck K, Van den Steen PE, Liekens S, Van Damme J, Struyf S. CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015 Jun;26(3):311–27.
14. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 2004 Mar 16;109(10):1292–8.

15. Liu L, Gao J, Yuan Y, Chang Q, Liao Y, Lu F. Hypoxia preconditioned human adipose derived mesenchymal stem cells enhance angiogenic potential via secretion of increased VEGF and bFGF. *Cell Biol Int*. 2013 Jun;37(6):551–60.
16. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A, Carmena R, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia*. 2012 Jan;55(1):88–93.
17. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*. 1998 Jul;15(7):539–53.
18. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1997 Jul;20(7):1183–97.
19. Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev*. 1994 Aug;15(4):516–42.
20. Piñero-Piloña A, Litonjua P, Aviles-Santa L, Raskin P. Idiopathic type 1 diabetes in Dallas, Texas: a 5-year experience. *Diabetes Care*. 2001 Jun;24(6):1014–8.
21. Tominaga M, Eguchi H, Manaka H, Igarashi K, Kato T, Sekikawa A. Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care*. 1999 Jun;22(6):920–4.
22. Best CH. Reminiscences of the Researches which Led to the Discovery of Insulin. *Can Med Assoc J*. 1942 Nov;47(5):398–400.
23. Lathief S, Inzucchi SE. Approach to diabetes management in patients with CVD. *Trends Cardiovasc Med*. 2015 May 21.
24. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ*. 2000 Aug 12;321(7258):405–12.
25. Genuth SM. The case for blood glucose control. *Adv Intern Med*. 1995 Jan;40:573–623.
26. Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC, Bigger JT, Buse JB, et al. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008 Jun 12;358(24):2545–59.
27. Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Woodward M, et al. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008 Jun 12;358(24):2560–72.
28. Duckworth W, Abraira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, et al. Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2009 Jan 8;360(2):129–39.
29. Lahoz C, Mostaza JM. La Aterosclerosis como enfermedad sistémica. *Rev Española Cardiol*. 2007;60(2):184–95.

30. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995 Sep 1;92(5):1355-74.
31. Pepine CJ. The effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial dysfunction: potential role in myocardial ischemia. *Am J Cardiol*. 1998 Nov 19;82(10A):23S - 27S.
32. Mostaza JM, Lahoz C. [Risk score for diabetic patients. Is really necessary?]. *Med Clin (Barc)*. 2006 Apr 8;126(13):495-6.
33. Mannarino E, Pirro M. Molecular biology of atherosclerosis. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2008 Jan;5(1):57-62.
34. Neves D. Advanced glycation end-products: a common pathway in diabetes and age-related erectile dysfunction. *Free Radic Res*. 2013 Aug;47 Suppl 1:49-69.
35. Lyons TJ. Glycation, carbonyl stress, EAGLEs, and the vascular complications of diabetes. *Semin Vasc Med*. 2002 May;2(2):175-89.
36. Ramasamy R, Goldberg IJ. Aldose reductase and cardiovascular diseases, creating human-like diabetic complications in an experimental model. *Circ Res*. 2010 May 14;106(9):1449-58.
37. Clarke M, Dodson PM. PKC inhibition and diabetic microvascular complications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2007 Dec;21(4):573-86.
38. Sheikh-Ali M, Chehade JM, Mooradian AD. The antioxidant paradox in diabetes mellitus. *Am J Ther*. 2011 May;18(3):266-78.
39. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):813-20.
40. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. Jan;8(9-10):1865-79.
41. Martín-Gallán P, Carrascosa A, Gussinyé M, Domínguez C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med*. 2003 Jun 15;34(12):1563-74.
42. VanderJagt DJ, Harrison JM, Ratliff DM, Hunsaker LA, Vander Jagt DL. Oxidative stress indices in IDDM subjects with and without long-term diabetic complications. *Clin Biochem*. 2001 Jun;34(4):265-70.
43. Cersosimo E, DeFronzo RA. Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases. *Diabetes Metab Res Rev*. Jan;22(6):423-36.
44. Lee CC, Lorenzo C, Haffner SM, Wagenknecht LE, Festa A, Goodarzi MO, et al. The association of inflammatory and fibrinolytic proteins with 5 year change in insulin clearance: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Diabetologia*. 2013 Jan;56(1):112-20.

45. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 Jan 14;340(2):115–26.
46. Behrendt D, Ganz P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol.* 2002 Nov 21;90(10C):40L – 48L.
47. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002 Mar 5;105(9):1135–43.
48. Yudkin JS. Abnormalities of coagulation and fibrinolysis in insulin resistance. Evidence for a common antecedent? *Diabetes Care.* 1999 Apr;22 Suppl 3:C25–30.
49. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science.* 1996 Feb 2;271(5249):665–8.
50. Nilsson J, Jovinge S, Niemann A, Reneland R, Lithell H. Relation between plasma tumor necrosis factor- α and insulin sensitivity in elderly men with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Aug;18(8):1199–202.
51. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet.* 1996 Nov 16;348(9038):1329–39.
52. Gensler SW, Haimovici H, Hoffert P, Steinman C, Beneventano TC. Study of vascular lesions in diabetic, nondiabetic patients. Clinical, arteriographic, and surgical considerations. *Arch Surg.* 1965 Oct;91(4):617–22.
53. Meijer WT, Hoes AW, Rutgers D, Bots ML, Hofman A, Grobbee DE. Peripheral arterial disease in the elderly: The Rotterdam Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Feb;18(2):185–92.
54. Rutherford RB, Baker JD, Ernst C, Johnston KW, Porter JM, Ahn S, et al. Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: revised version. *J Vasc Surg.* 1997 Sep;26(3):517–38.
55. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy J a, Nehler MR, Harris K a, Fowkes FGR. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg.* 2007 Jan;45 Suppl S(Tasc II):S5–67.
56. Second European Consensus Document on chronic critical leg ischemia. *Eur J Vasc Surg.* 1992 May;6 Suppl A:1–32.
57. Mowla A, Bahrami A, Dastgheib SA. Peripheral arterial disease in patients with diabetes mellitus. *South Med J.* 2006 Jul;99(7):707–8.
58. Bembi V, Singh S, Singh P, Aneja GK, Arya TVS, Arora R. Prevalence of peripheral arterial disease in a cohort of diabetic patients. *South Med J.* 2006 Jun;99(6):564–9.
59. Ciavarella A, Silletti A, Mustacchio A, Gargiulo M, Galaverni MC, Stella A, et al. Angiographic evaluation of the anatomic pattern of arterial obstructions in diabetic patients with critical limb ischaemia. *Diabète & métabolisme.* Jan;19(6):586–9.

60. R ger LJ, Irnich D, Abahji TN, Crispin A, Hoffmann U, Lang PM. Characteristics of chronic ischemic pain in patients with peripheral arterial disease. *Pain*. 2008 Sep 30;139(1):201–8.
61. Blanes JI, Cairols MA, Marrugat J. Prevalence of peripheral artery disease and its associated risk factors in Spain: The ESTIME Study. *Int Angiol*. 2009 Feb;28(1):20–5.
62. Weitz JI, Byrne J, Clagett GP, Farkouh ME, Porter JM, Sackett DL, et al. Diagnosis and Treatment of Chronic Arterial Insufficiency of the Lower Extremities: A Critical Review. *Circulation*. 1996 Dec 1;94(11):3026–49.
63. Nehler MR, Hiatt WR, Taylor LM. Is revascularization and limb salvage always the best treatment for critical limb ischemia? *J Vasc Surg*. 2003 Mar;37(3):704–8.
64. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzler NR, Bakal CW, Creager M a, Halperin JL, et al. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Sur. *Circulation*. 2006 Mar 21;113(11):e463–654.
65. Sontheimer DL. Peripheral vascular disease: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician*. 2006 Jun 1;73(11):1971–6.
66. White C. Clinical practice. Intermittent claudication. *N Engl J Med*. 2007 Mar 22;356(12):1241–50.
67. Hirsch AT, Treat-Jacobson D, Lando HA, Hatsukami DK. The role of tobacco cessation, antiplatelet and lipid-lowering therapies in the treatment of peripheral arterial disease. *Vasc Med*. 1997 Jan;2(3):243–51.
68. Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, et al. Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Ann Intern Med*. 2004 Sep 21;141(6):421–31.
69. Muntner P, Wildman RP, Reynolds K, Desalvo KB, Chen J, Fonseca V. Relationship between HbA1c level and peripheral arterial disease. *Diabetes Care*. 2005 Aug;28(8):1981–7.
70. Criqui MH. Peripheral arterial disease--epidemiological aspects. *Vasc Med*. 2001 Jan;6(3 Suppl):3–7.
71. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation*. 1998 Feb 10;97(5):425–8.
72. Belch JFF, Topol EJ, Agnelli G, Bertrand M, Califf RM, Clement DL, et al. Critical issues in peripheral arterial disease detection and management: a call to action. *Arch Intern Med*. 2003 Apr 28;163(8):884–92.
73. Hirsch AT, Criqui MH, Treat-Jacobson D, Regensteiner JG, Creager MA, Olin JW, et al. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA*. 2001 Sep 19;286(11):1317–24.

74. Andros G. Diagnostic and therapeutic arterial interventions in the ulcerated diabetic foot. *Diabetes Metab Res Rev.* Jan;20 Suppl 1:S29–33.
75. Saha SP, Whayne TF, Mukherjee D. Current evidence for antithrombotic therapy after peripheral vascular interventions. *Curr Vasc Pharmacol.* 2013 Jul;11(4):507–13.
76. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell.* 1997 Feb 7;88(3):287–98.
77. Till JE, McCulloch EA. Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 1980 Nov 26;605(4):431–59.
78. Choi SH, Jung SY, Kwon S-M, Baek SH. Perspectives on stem cell therapy for cardiac regeneration. *Advances and challenges. Circ J.* 2012 Jan;76(6):1307–12.
79. Tan J, Wu W, Xu X, Liao L, Zheng F, Messinger S, et al. Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2012 Mar 21;307(11):1169–77.
80. Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig JA, Martín F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes.* 2000 Feb;49(2):157–62.
81. Soria B. In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells. *Differentiation.* 2001 Oct;68(4-5):205–19.
82. Soria B, Skoudy A, Martín F. From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2001 Apr;44(4):407–15.
83. Ruiz-Salmeron R, de la Cuesta-Diaz A, Constantino-Bermejo M, Pérez-Camacho I, Marcos-Sánchez F, Hmadcha A, et al. Angiographic demonstration of neoangiogenesis after intra-arterial infusion of autologous bone marrow mononuclear cells in diabetic patients with critical limb ischemia. *Cell Transplant.* 2011 Jan;20(10):1629–39.
84. Canzi L, Castellaneta V, Navone S, Nava S, Dossena M, Zucca I, et al. Human skeletal muscle stem cell antiinflammatory activity ameliorates clinical outcome in amyotrophic lateral sclerosis models. *Mol Med.* 2012 Jan;18:401–11.
85. Liang J, Zhang H, Wang D, Feng X, Wang H, Hua B, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in seven patients with refractory inflammatory bowel disease. *Gut.* 2012 Mar;61(3):468–9.
86. Cassaday RD, Gopal AK. Allogeneic hematopoietic cell transplantation in mantle cell lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2012 Jun;25(2):165–74.
87. Escacena N, Quesada-Hernández E, Capilla-Gonzalez V, Soria B, Hmadcha A. Bottlenecks in the Efficient Use of Advanced Therapy Medicinal Products Based on Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Int.* 2015 Jan;2015:895714.

88. Gálvez P, Clares B, Hmadcha A, Ruiz A, Soria B. Development of a cell-based medicinal product: regulatory structures in the European Union. *Br Med Bull.* 2013 Jan;105:85–105.
89. Hmadcha A, Abdelkrim H, Domínguez-Bendala J, Juan D-B, Wakeman J, Jane W, et al. The immune boundaries for stem cell based therapies: problems and prospective solutions. *J Cell Mol Med.* 2009 Aug;13(8A):1464–75.
90. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981 Jul 9;292(5819):154–6.
91. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Dec;78(12):7634–8.
92. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998 Nov 6;282(5391):1145–7.
93. Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2007 Jun 7;1(1):39–49.
94. Llevadot J, Asahara T. [Effects of statins on angiogenesis and vasculogenesis]. *Rev española Cardiol.* 2002 Aug;55(8):838–44.
95. Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res.* 2010 May 1;86(2):236–42.
96. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999 Aug 6;85(3):221–8.
97. Coats P. Marriage of resistance and conduit arteries breeds critical limb ischemia. *AJP Hear Circ Physiol.* 2004 Nov 4;288(3):H1044–50.
98. Soria B. Terapia celular en la Diabetes Mellitus. Monografía XXVII: Células Madre y Terapia regenerativa. Real Academia Nacional de Farmacia. 1:277–300.
99. Höckel M, Schlenger K, Doctrow S, Kissel T, Vaupel P. Therapeutic angiogenesis. *Arch Surg.* 1993 Apr;128(4):423–9.
100. Bronckaers A, Hilkens P, Martens W, Gervois P, Ratajczak J, Struys T, et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. *Pharmacol Ther.* 2014 Aug;143(2):181–96.
101. Cuende N, Rico L, Herrera C. Concise review: bone marrow mononuclear cells for the treatment of ischemic syndromes: medicinal product or cell transplantation? *Stem Cells Transl Med.* 2012 May;1(5):403–8.
102. Schatteman GC, Dunnwald M, Jiao C. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Jan;292(1):H1–18.

103. Sieveking DP, Ng MKC. Cell therapies for therapeutic angiogenesis: back to the bench. *Vasc Med*. 2009 May;14(2):153–66.
104. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest*. 2006 May;116(5):1195–201.
105. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997 Feb 14;275(5302):964–7.
106. Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, Martin PJ, Raines EW, Seifert RA, et al. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res*. 2000 Oct 27;87(9):728–30.
107. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 28;97(7):3422–7.
108. Van Royen N, Schirmer SH, Atasever B, Behrens CYH, Ubbink D, Buschmann EE, et al. START Trial: a pilot study on STimulation of ARTeriogenesis using subcutaneous application of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as a new treatment for peripheral vascular disease. *Circulation*. 2005 Aug 16;112(7):1040–6.
109. Kawamoto A, Katayama M, Handa N, Kinoshita M, Takano H, Horii M, et al. Intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34(+) cells in patients with critical limb ischemia: a phase I/IIa, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial. *Stem Cells*. 2009 Nov;27(11):2857–64.
110. Burt RK, Testori A, Oyama Y, Rodriguez HE, Yaung K, Villa M, et al. Autologous peripheral blood CD133+ cell implantation for limb salvage in patients with critical limb ischemia. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Jan;45(1):111–6.
111. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002 Aug 10;360(9331):427–35.
112. Friedenstein AJ, Petrakova K V, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968 Mar;6(2):230–47.
113. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 14;96(19):10711–6.
114. Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo J-M, Moonen G, Rogister B. Plasticity of Cultured Mesenchymal Stem Cells: Switch from Nestin-Positive to Excitable Neuron-Like Phenotype. *Stem Cells*. 2005 Mar;23(3):392–402.
115. Lee K-D, Kuo TK-C, Whang-Peng J, Chung Y-F, Lin C-T, Chou S-H, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*. 2004 Dec;40(6):1275–84.

116. Chen L-B, Jiang X-B, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol*. 2004 Oct 15;10(20):3016–20.
117. Chao KC, Chao KF, Fu YS, Liu SH. Islet-Like Clusters Derived from Mesenchymal Stem Cells in Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord for Transplantation to Control Type 1 Diabetes. Maedler K, editor. *PLoS One*. 2008 Jan 16;3(1):e1451.
118. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991 Sep;9(5):641–50.
119. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006 Jan;8(4):315–7.
120. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008 Apr 10;2(4):313–9.
121. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007 Oct 19;131(2):324–36.
122. Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum*. 2002 Dec;46(12):3349–60.
123. Hoogduijn MJ, Popp F, Verbeek R, Masoodi M, Nicolaou A, Baan C, et al. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *Int Immunopharmacol*. Elsevier B.V.; 2010 Dec;10(12):1496–500.
124. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 2003 Jan;5(6):485–9.
125. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*. 1999 Oct;181(1):67–73.
126. Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol Ther*. Nature Publishing Group; 2012 Jan;20(1):14–20.
127. Petrie RJ, Doyle AD, Yamada KM. Random versus directionally persistent cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Aug;10(8):538–49.
128. Rytlewski JA, Alejandra Aldon M, Lewis EW, Suggs LJ. Mechanisms of tubulogenesis and endothelial phenotype expression by MSCs. *Microvasc Res*. 2015 May;99:26–35.
129. Duffy GP, Ahsan T, O'Brien T, Barry F, Nerem RM. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote angiogenic processes in a time- and dose-dependent manner in vitro. *Tissue Eng Part A*. 2009 Sep;15(9):2459–70.
130. Potapova I a, Gaudette GR, Brink PR, Robinson RB, Rosen MR, Cohen IS, et al. Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. 2007 Jul;25(7):1761–8.

131. Aguirre A, Planell JA, Engel E. Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Sep 17;400(2):284–91.
132. Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006 Jun 1;119(Pt 11):2204–13.
133. Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell.* 2008 Sep 11;3(3):229–30.
134. Kim Y, Kim H, Cho H, Bae Y, Suh K, Jung J. Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Cell Physiol Biochem.* 2007 Jan;20(6):867–76.
135. Hoffmann J, Glassford AJ, Doyle TC, Robbins RC, Schrepfer S, Pelletier MP. Angiogenic effects despite limited cell survival of bone marrow-derived mesenchymal stem cells under ischemia. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2010 Apr;58(3):136–42.
136. Leroux L, Descamps B, Tojais NF, Séguy B, Osés P, Moreau C, et al. Hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells improve vascular and skeletal muscle fiber regeneration after ischemia through a Wnt4-dependent pathway. *Mol Ther.* 2010 Aug;18(8):1545–52.
137. Rosová I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolte J a. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008 Aug;26(8):2173–82.
138. Huang W-H, Chen H-L, Huang P-H, Yew T-L, Lin M-W, Lin S-J, et al. Hypoxic mesenchymal stem cells engraft and ameliorate limb ischaemia in allogeneic recipients. *Cardiovasc Res.* 2014 Feb 1;101(2):266–76.
139. Park I-S, Chung P-S, Ahn JC. Enhanced angiogenic effect of adipose-derived stromal cell spheroid with low-level light therapy in hind limb ischemia mice. *Biomaterials.* 2014 Nov;35(34):9280–9.
140. Moon MH, Kim SY, Kim YJ, Kim SJ, Lee JB, Bae YC, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem.* 2006 Jan;17(5-6):279–90.
141. Saigawa T, Kato K, Ozawa T, Toba K, Makiyama Y, Minagawa S, et al. Clinical application of bone marrow implantation in patients with arteriosclerosis obliterans, and the association between efficacy and the number of implanted bone marrow cells. *Circ J.* 2004 Dec;68(12):1189–93.
142. Miyamoto K, Nishigami K, Nagaya N, Akutsu K, Chiku M, Kamei M, et al. Unblinded pilot study of autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with thromboangiitis obliterans. *Circulation.* 2006 Dec 12;114(24):2679–84.

143. Kim S-W, Han H, Chae G-T, Lee S-H, Bo S, Yoon J-H, et al. Successful stem cell therapy using umbilical cord blood-derived multipotent stem cells for Buerger's disease and ischemic limb disease animal model. *Stem Cells*. 2006 Jun;24(6):1620-6.
144. Lu D, Chen B, Liang Z, Deng W, Jiang Y, Li S, et al. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 Apr;92(1):26-36.
145. Lee HC, An SG, Lee HW, Park J-S, Cha KS, Hong TJ, et al. Safety and effect of adipose tissue-derived stem cell implantation in patients with critical limb ischemia: a pilot study. *Circ J*. 2012 Jan;76(7):1750-60.
146. Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol*. 2012 Jan;5:19.
147. Ruiter MS, van Golde JM, Schaper NC, Stehouwer CD, Huijberts MS. Diabetes impairs arteriogenesis in the peripheral circulation: review of molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)*. 2010 Sep;119(6):225-38.
148. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*. 2002 Nov 26;106(22):2781-6.
149. Rosso A, Balsamo A, Gambino R, Dentelli P, Falcioni R, Cassader M, et al. p53 Mediates the accelerated onset of senescence of endothelial progenitor cells in diabetes. *J Biol Chem*. 2006 Feb 17;281(7):4339-47.
150. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991 Apr;40(4):405-12.
151. Schatteman GC, Hanlon HD, Jiao C, Dodds SG, Christy BA. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest*. 2000 Aug;106(4):571-8.
152. Fadini GP, Sartore S, Albiero M, Baesso I, Murphy E, Menegolo M, et al. Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Sep;26(9):2140-6.
153. Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 1999 May;103(9):1231-6.
154. Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*. 2003 Jan;5(5):362-9.
155. Pries AR, Reglin B, Secomb TW. Remodeling of Blood Vessels: Responses of Diameter and Wall Thickness to Hemodynamic and Metabolic Stimuli. *Hypertension*. 2005 Sep 19;46(4):725-31.

156. Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension*. 1993 Apr;21(4):391-7.
157. Nathan DM, Cleary PA, Backlund J-YC, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, et al. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2005 Dec 22;353(25):2643-53.
158. Martin A, Komada MR, Sane DC. Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Med Res Rev*. 2003 Mar;23(2):117-45.
159. Keymel S, Heinen Y, Balzer J, Rassaf T, Kelm M, Lauer T, et al. Characterization of macro- and microvascular function and structure in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiovasc Dis*. 2011 Jan;1(1):68-75.
160. Atkinson JB, Swift LL, Virmani R. Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. Familial hypercholesterolemia. *Am J Pathol*. 1992 Mar;140(3):749-53.
161. Van Belle E, Bauters C, Bertrand ME. [From the angiogenic response to ischemia to the validation of the concept of "therapeutic angiogenesis"]. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1998 Sep;91(9):1159-70.
162. Chavakis E, Dimmeler S. Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Jun 1;22(6):887-93.
163. Isakson M, de Blacam C, Whelan D, McArdle a., Clover a. JP. Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential. *Stem Cells Int*. Hindawi Publishing Corporation; 2015;2015:1-12.
164. Blumberg SN, Berger A, Hwang L, Pastar I, Warren SM, Chen W. The role of stem cells in the treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Res Clin Pract*. 2012 Apr;96(1):1-9.
165. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*. 2007 Oct;25(10):2648-59.
166. Neuss S, Schneider RKM, Tietze L, Knüchel R, Jahnen-Dechent W. Secretion of fibrinolytic enzymes facilitates human mesenchymal stem cell invasion into fibrin clots. *Cells Tissues Organs*. 2010 Jan;191(1):36-46.
167. Acosta L, Hmadcha A, Escacena N, Pérez-Camacho I, de la Cuesta A, Ruiz-Salmeron R, et al. Adipose mesenchymal stromal cells isolated from type 2 diabetic patients display reduced fibrinolytic activity. *Diabetes*. 2013 Dec;62(12):4266-9.
168. Minteer DM, Young MT, Lin Y-C, Over PJ, Rubin JP, Gerlach JC, et al. Analysis of type II diabetes mellitus adipose-derived stem cells for tissue engineering applications. *J Tissue Eng*. 2015 Jan;6:2041731415579215.
169. Rennert RC, Sorkin M, Januszyk M, Duscher D, Kosaraju R, Chung MT, et al. Diabetes impairs the angiogenic potential of adipose-derived stem cells by selectively depleting cellular subpopulations. *Stem Cell Res Ther*. 2014 Jan;5(3):79.

170. Ferrer-Lorente R, Bejar MT, Tous M, Vilahur G, Badimon L. Systems biology approach to identify alterations in the stem cell reservoir of subcutaneous adipose tissue in a rat model of diabetes: effects on differentiation potential and function. *Diabetologia*. 2014 Jan;57(1):246–56.
171. Wang B, Wu S-M, Wang T, Liu K, Zhang G, Zhang X-Q, et al. Pre-treatment with bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibits systemic intravascular coagulation and attenuates organ dysfunction in lipopolysaccharide-induced disseminated intravascular coagulation rat model. *Chin Med J (Engl)*. 2012 May;125(10):1753–9.
172. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A. Coagulation and cancer: biological and clinical aspects. *J Thromb Haemost*. 2013 Mar;11(2):223–33.
173. Furlani D, Ugurlucan M, Ong L, Bieback K, Pittermann E, Westien I, et al. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. *Microvasc Res*. Elsevier Inc.; 2009 May;77(3):370–6.
174. Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science*. 2004 Nov 26;306(5701):1568–71.
175. Mohseny AB, Szuhai K, Romeo S, Buddingh EP, Briaire-de Bruijn I, de Jong D, et al. Osteosarcoma originates from mesenchymal stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of Cdkn2. *J Pathol*. 2009 Nov;219(3):294–305.
176. De la Fuente R, Bernad A, Garcia-Castro J, Martín MC, Cigudosa JC. Retraction: Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*. 2010 Aug 15;70(16):6682.
177. Røslund GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, et al. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res*. 2009 Jul 1;69(13):5331–9.
178. Garcia S, Bernad a, Martín MC, Cigudosa JC, Garcia-Castro J, de la Fuente R. Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*. Elsevier B.V.; 2010 May 15;316(9):1648–50.
179. Torsvik A, Røslund G V, Svendsen A, Molven A, Immervoll H, McCormack E, et al. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. *Cancer Res*. 2010 Aug 1;70(15):6393–6.
180. Pittenger MF. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science (80-)*. 1999 Apr 2;284(5411):143–7.
181. Tarte K, Gaillard J, Lataillade J-J, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, et al. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*. 2010 Feb 25;115(8):1549–53.

182. Li H-C, Stoicov C, Rogers AB, Houghton J. Stem cells and cancer: evidence for bone marrow stem cells in epithelial cancers. *World J Gastroenterol*. 2006 Jan 21;12(3):363-71.
183. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 1974 Jan;2(2):83-92.
184. Lund P, Pilgaard L, Duroux M, Fink T, Zachar V. Effect of growth media and serum replacements on the proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells. *Cytotherapy*. 2009 Jan;11(2):189-97.
185. Spees JL, Gregory CA, Singh H, Tucker HA, Peister A, Lynch PJ, et al. Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol Ther*. 2004 May;9(5):747-56.
186. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jun 25;99(13):8932-7.
187. Gálvez P, Clares B, Bermejo M, Hmadcha A, Soria B. Standard Requirement of a Microbiological Quality Control Program for the Manufacture of Human Mesenchymal Stem Cells for Clinical Use. *Stem Cells Dev*. 2014 May 15; 23(10):1074-83
188. Lavery LA, Armstrong DG, Harkless LB. Classification of diabetic foot wounds. *J Foot Ankle Surg*. Jan;35(6):528-31.
189. Shaw J, Hughes CM, Lagan KM, Bell PM, Stevenson MR. An evaluation of three wound measurement techniques in diabetic foot wounds. *Diabetes Care*. 2007 Oct;30(10):2641-2.
190. Yanagisawa-Miwa A, Uchida Y, Nakamura F, Tomaru T, Kido H, Kamijo T, et al. Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science*. 1992 Sep 4;257(5075):1401-3.
191. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*. 1994 Feb;93(2):662-70.
192. Isner JM, Walsh K, Symes J, Pieczek A, Takeshita S, Lowry J, et al. Arterial gene transfer for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Hum Gene Ther*. 1996 May 20;7(8):959-88.
193. Ho H-K V, Jang JJ, Kaji S, Spektor G, Fong A, Yang P, et al. Developmental endothelial locus-1 (Del-1), a novel angiogenic protein: its role in ischemia. *Circulation*. 2004 Mar 16;109(10):1314-9.
194. Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, Saucedo JF, Tenaglia AN, Hermiller JB, et al. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for

- intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet* (London, England). 2002 Jun 15;359(9323):2053–8.
195. Rajagopalan S, Mohler ER, Lederman RJ, Mendelsohn FO, Saucedo JF, Goldman CK, et al. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent cl. *Circulation*. 2003 Oct 21;108(16):1933–8.
 196. Simons M, Bonow RO, Chronos NA, Cohen DJ, Giordano FJ, Hammond HK, et al. Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary. *Circulation*. 2000 Sep 12;102(11):E73–86.
 197. Epstein SE, Kornowski R, Fuchs S, Dvorak HF. Angiogenesis therapy: amidst the hype, the neglected potential for serious side effects. *Circulation*. 2001 Jul 3;104(1):115–9.
 198. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999 Apr;5(4):434–8.
 199. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Epstein SE. Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences. *Circ Res*. 2004 Aug 20;95(4):354–63.
 200. Sneider EB, Nowicki PT, Messina LM. Regenerative medicine in the treatment of peripheral arterial disease. *J Cell Biochem*. 2009 Nov 1;108(4):753–61.
 201. Stem HA, Tucker HA, Bunnell BA. Adipose-Derived Stem Cells. Gimble JM, Bunnell BA, editors. *Methods*. Totowa, NJ: Humana Press; 2011;702:121–31.
 202. Fadini GP, Madeddu P, Waltenberger J, Fiorina P. Vascular stem and progenitor cells in diabetic complications. *Exp Diabetes Res*. 2012 Jan;2012:580343.
 203. Fadini GP, Albiero M, Menegazzo L, Boscaro E, Agostini C, de Kreutzenberg SV, et al. Procalcific phenotypic drift of circulating progenitor cells in type 2 diabetes with coronary artery disease. *Exp Diabetes Res*. 2012 Jan;2012:921685.
 204. Fadini GP. An underlying principle for the study of circulating progenitor cells in diabetes and its complications. *Diabetologia*. 2008 Jul;51(7):1091–4.
 205. Iafrati MD, Hallett JW, Geils G, Pearl G, Lumsden A, Peden E, et al. Early results and lessons learned from a multicenter, randomized, double-blind trial of bone marrow aspirate concentrate in critical limb ischemia. *J Vasc Surg*. 2011 Dec;54(6):1650–8.
 206. Losordo DW, Kibbe MR, Mendelsohn F, Marston W, Driver VR, Sharafuddin M, et al. A randomized, controlled pilot study of autologous CD34+ cell therapy for critical limb ischemia. *Circ Cardiovasc Interv*. 2012 Dec;5(6):821–30.
 207. Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M, Oyamada A, Nakamori S, Nishimura H, et al. Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation*. 2006 Mar 14;113(10):1311–25.

208. Matri M, Lin H, Lee T. Enhancing the efficacy of mesenchymal stem cell therapy. *World J Stem Cells*. 2014 Apr 26;6(2):82–93.
209. Moll G, Rasmusson-Duprez I, von Bahr L, Connolly-Andersen A-M, Elgue G, Funke L, et al. Are therapeutic human mesenchymal stromal cells compatible with human blood? *Stem Cells*. 2012 Jul;30(7):1565–74.
210. American Diabetes Association. Peripheral arterial disease in people with diabetes. *Diabetes Care*. 2003 Dec;26(12):3333–41.
211. Yan J, Tie G, Xu TY, Cecchini K, Messina LM. Mesenchymal Stem Cells as a Treatment for Peripheral Arterial Disease: Current Status and Potential Impact of Type II Diabetes on Their Therapeutic Efficacy. *Stem Cell Rev*. 2013 Jun;9(3):360–72.
212. Moll G, Hult A, von Bahr L, Alm JJ, Heldring N, Hamad OA, et al. Do ABO blood group antigens hamper the therapeutic efficacy of mesenchymal stromal cells? *PLoS One*. 2014 Jan;9(1):e85040.
213. Amann B, Luedemann C, Ratei R, Schmidt-Lucke JA. Autologous bone marrow cell transplantation increases leg perfusion and reduces amputations in patients with advanced critical limb ischemia due to peripheral artery disease. *Cell Transplant*. 2009 Jan;18(3):371–80.
214. Van Huyen J-PD, Smadja DM, Bruneval P, Gaussem P, Dal-Cortivo L, Julia P, et al. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy induces distal angiogenesis after local injection in critical leg ischemia. *Mod Pathol*. 2008 May 16;21(7):837–46.
215. Blacher S, Devy L, Burbidge MF, Roland G, Tucker G, Noël A, et al. Improved quantification of angiogenesis in the rat aortic ring assay. *Angiogenesis*. 2001 Jan;4(2):133–42.
216. Dace DS, Khan AA, Kelly J, Apte RS. Interleukin-10 promotes pathological angiogenesis by regulating macrophage response to hypoxia during development. *PLoS One*. 2008 Jan;3(10):e3381.
217. Blatt RJ, Clark AN, Courtney J, Tully C, Tucker AL. Automated quantitative analysis of angiogenesis in the rat aorta model using Image-Pro Plus 4.1. *Comput Methods Programs Biomed*. 2004;75(1):75–9.
218. Bura A, Planat-Benard V, Bourin P, Silvestre J-S, Gross F, Grolleau J-L, et al. Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytotherapy*. Elsevier Inc; 2014 Feb;16(2):245–57.
219. Stalc M, Poredos P. The usefulness of transcutaneous oximetry in assessing the success of percutaneous transluminal angioplasty. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2002 Dec;24(6):528–32.
220. Ray SA, Buckenham TM, Belli AM, Taylor RS, Dormandy JA. The predictive value of laser Doppler fluxmetry and transcutaneous oximetry for clinical outcome in patients undergoing revascularisation for severe leg ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1997 Jan;13(1):54–9.

221. Wyss CR, Harrington RM, Burgess EM, Matsen FA. Transcutaneous oxygen tension as a predictor of success after an amputation. *J Bone Joint Surg Am.* 1988 Feb;70(2):203-7.
222. Carter SA, Tate RB. The relationship of the transcutaneous oxygen tension, pulse waves and systolic pressures to the risk for limb amputation in patients with peripheral arterial disease and skin ulcers or gangrene. *Int Angiol.* 2006 Mar;25(1):67-72.
223. Guan L-X, Guan H, Li H-B, Ren C-A, Liu L, Chu J-J, et al. Therapeutic efficacy of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in patients with type 2 diabetes. *Exp Ther Med.* 2015 May;9(5):1623-30.
224. Bhansali A, Upreti V, Khandelwal N, Marwaha N, Gupta V, Sachdeva N, et al. Efficacy of autologous bone marrow-derived stem cell transplantation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Stem Cells Dev.* 2009;18(10):1407-16.
225. Domínguez-Bendala J, Lanzoni G, Inverardi L, Ricordi C. Concise review: mesenchymal stem cells for diabetes. *Stem Cells Transl Med.* 2012 Jan;1(1):59-63.
226. Urbán VS, Kiss J, Kovács J, Gócza E, Vas V, Monostori E, et al. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells.* 2008 Jan;26(1):244-53.
227. Cutler AJ, Limbani V, Girdlestone J, Navarrete C V. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells modulate monocyte function to suppress T cell proliferation. *J Immunol.* 2010 Dec 1;185(11):6617-23.
228. Mohty M, Duarte RF, Croockewit S, Hübel K, Kvalheim G, Russell N. The role of plerixafor in optimizing peripheral blood stem cell mobilization for autologous stem cell transplantation. *Leukemia.* 2011 Jan;25(1):1-6.
229. Shabbir A, Zisa D, Suzuki G, Lee T. Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 Jun;296(6):H1888-97.
230. Matri M, Shah Z, McLaughlin T, Greene CJ, Baum L, Suzuki G, et al. Activation of Toll-like receptor 3 amplifies mesenchymal stem cell trophic factors and enhances therapeutic potency. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012 Nov 15;303(10):C1021-33.
231. Jiang R, Han Z, Zhuo G, Qu X, Li X, Wang X, et al. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells in type 2 diabetes: a pilot study. *Front Med.* 2011 Mar;5(1):94-100.
232. Lee T. Host tissue response in stem cell therapy. *World J Stem Cells.* 2010 Aug 26;2(4):61-6.

