



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Centro Médico Nacional 20 de Noviembre ISSSTE

Departamento de Angiología y Cirugía Vascular

**“EVALUACIÓN DE LA INTEGRACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES
PROGENITORAS TRASPLANTADAS EN RATA EN UN MODELO ISQUÉMICO DE
MIEMBROS INFERIORES ”**

**TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN ANGIOLOGÍA Y CIRUGÍA VASCULAR**

PRESENTA:

DR. NELSON ENCARNACIÓN SANTANA

Asesor de Tesis y Profesor Titular del Curso: Juan Miguel Rodríguez Trejo

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. JULIO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. MAURICIO DI SILVIO LÓPEZ
SUB DIRECTOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN CENTRO MÉDICO NACIONAL
20 DE NOVIEMBRE

DR. JUAN MIGUEL RODRÍGUEZ TREJO
ASESOR DE TESIS Y JEFE DEL SERVICIO DE ANGIOLOGÍA Y CIRUGÍA
VASCULAR CENTRO MÉDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE

DR. IGNACIO ESCOTTO SÁNCHEZ
PROFESOR TITULAR DEL CURSO

DR. NELSON ENCARNACIÓN SANTANA
AUTOR

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
JUSTIFICACIÓN	6
HIPÓTESIS.....	7
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
METODOLOGÍA.....	8
ASPECTOS ÉTICOS.....	14
CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD.....	14
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN.....	17
CONCLUSIONES.....	19
BIBLIOGRAFÍA.....	20

INTRODUCCIÓN

El trasplante de Células Mononucleares Progenitoras (CMP) para inducir angiogénesis o neovascularización en extremidades isquémicas ha sido considerada una estrategia eficaz en modelos animales de isquemia y ensayos clínicos, que representa un método seguro y factible para el tratamiento de la isquemia crítica de miembros inferiores. Sin embargo, la evidencia de que varios estados de enfermedad reducen el número y/o función de las CMP, ha impulsado el desarrollo de varias estrategias para superar estas limitaciones, incluyendo la administración de CMP modificadas genéticamente que sobreexpresan factores de crecimiento angiogénico^{3,4,5,6,7,8} Actualmente a nivel mundial existen 47 grupos de investigadores que están trasplantando con éxito CMP autólogas por vía intramuscular, intra-arterial e intravenosa en pacientes con isquemia severa de miembros inferiores, demostrando que el tratamiento refleja mejorías significativas incrementando el índice tobillo-brazo (ITB), la cicatrización de úlceras, disminuyendo el dolor en reposo, dolor a la deambulación y evitando las amputaciones^(7,8)

ANTECEDENTES

En 1997 Asahara demostró que las CMP promueven la angiogénesis en tejidos isquémicos⁴. Tateishi-Yuyama, en 2002, utilizó por primera vez CMP en pacientes con isquemia severa de miembros inferiores, observando mejoría en el ITB y angiográficamente⁽⁹⁾. Utilizando un modelo de isquemia muscular en ratas, nuestro grupo demostró que puede inducirse neovascularización o angiogénesis efectiva al trasplantar CMP derivadas de la médula ósea en túneles musculares fibrocolágenos, utilizados como andamiaje para facilitar la sobrevida y la diferenciación celular⁽¹⁰⁾. En otro estudio experimental en perros con modelo de isquemia muscular en la extremidad inferior, se corroboró que movilizándolo las CMP a la sangre periférica, aplicando el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y trasplantándolas en túneles musculares fibrocolágenos, se incrementaba significativamente la angiogénesis en comparación con el trasplante celular sin G-CSF⁽⁵⁾. Con estos antecedentes experimentales en animales,

se obtuvo la autorización de los Comités de Investigación y Ética del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre para iniciar un ensayo clínico controlado en seres humanos donde se evaluaron 20 extremidades de pacientes con isquemia severa en miembros inferiores (Fontaine II-b y III, Rutherford 3 y 4). El seguimiento promedio fue de 23 meses. En el primer grupo fue necesaria una amputación, la distancia sin dolor mejoró de 62 a 350 m, el ITB mejoró de 0.42 a 0.68 y las unidades de perfusión por láser Doppler (UP) mejoraron de 7.14 a 225.3. En el segundo grupo hubo una amputación, la distancia mejoró de 57 a 450 m, el ITB se incrementó de 0.38 a 0.65 y las UP subieron en un rango de 6.64 a 229.2.6⁽⁶⁾.

Por su parte Benoit, en 2013, presentó un metaanálisis sobre la seguridad y eficiencia del autotrasplante de CMP en pacientes con isquemia crítica en miembros inferiores. Detalla los 45 ensayos clínicos recolectados en 10 años (2002/2012). De 1,518 pacientes, 1,272 recibieron trasplante celular y 246 se manejaron como controles, obteniendo 203 amputaciones (16%). En el mismo metaanálisis separó siete ensayos clínicos controlados, pero aleatorizados contra placebo y seguimiento por la FDA (clinical trials). De estos siete estudios sumó 365 pacientes, 195 con trasplante celular y 170 con placebo y reportó 14.4% de amputaciones con trasplante celular y 27% con placebo ($p = 0.0019$) ($OR = 0.36$, $p = 0.0004$) y concluyó que reduce significativamente las tasas de amputación en pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores.⁽⁷⁾

Con fecha 12 de noviembre 2013, la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) otorgó el Aval CAS/01/0R/1934/ 2013 al procedimiento: "Trasplante de células mononucleares progenitoras derivadas de la médula ósea para inducir angiogénesis en pacientes con isquemia severa de miembros inferiores", precisando tres condiciones: • Que los establecimientos en donde se realice este tipo de tratamiento con células progenitoras cuenten con licencia de disposición de órganos, tejidos o células progenitoras o troncales con fines de trasplante, emitida por la autoridad sanitaria competente. • Que un Comité Hospitalario de Bioética avale los casos. • Que el caso se presente en sesión clínica con un grupo de especialistas que consideren los beneficios para el paciente con dicho tratamiento.

Con todos estos antecedentes, el 17 de enero 2014 se llevó a cabo el primer caso como terapéutica consolidada (no como protocolo de investigación) en el CMN 20 de Noviembre⁽¹¹⁾.

No obstante a estos antecedentes, se sabe que un porcentaje alto de la viabilidad celular se pierde por la vía intramuscular, por lo que, es necesario diseñar técnicas de “andamiaje” que protejan y aumenten la proliferación de los componentes celulares. En la actualidad los grupos de investigación en medicina regenerativa se encuentran estudiando técnicas y procedimientos que aumenten la sobrevivencia celular. La ingeniería de tejidos en la medicina regenerativa requiere de tres componentes biológicos; la célula, un andamiaje de soporte y factores de crecimiento y citocinas que estimulen la reproducción y migración celular.

En la actualidad, se están desarrollando estudios para fomentar la neovascularización con matrices o andamiajes de materiales sintéticos para problemas isquémicos o cardiovasculares pero representan un costo elevado e inducen reacciones adversas de tolerancia e interacción con las células que deben proteger.

Un estudio reciente de nuestro grupo de investigación demostró que la promoción de la angiogénesis en las CMP puede ocurrir por dos mecanismos: 1) incorporación directa a la vasculatura existente, facilitando el crecimiento de nuevos capilares (diapédesis, brotes, tubos) y 2) por un efecto parácrino, secreción de citocinas y otros factores de crecimiento pro-angiogénicos que estimulan a las células endoteliales locales proliferando en la pared vascular (mitosis, vacuolas, tubos). Los resultados de este estudio muestran que el uso de CMP incrementa la angiogénesis y que esta mejora utilizando Plasma Rico en Plaquetas (PRP) y Trombina (T), ya que existe una diferencia de tendencia significativa si se utilizan en el trasplante los tres componentes (CMP PRP y T), lo que nos indica que es una buena alternativa en ingeniería de tejidos ⁽²⁾.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La acción de las CMP en la promoción de la vasculogénesis o angiogénesis puede ocurrir por dos mecanismos: incorporación directa a la vasculatura existente, facilitando el crecimiento de nuevos capilares (diapédesis, brotes, tubos) y/o efecto paracrino, secreción de citosinas y otros factores de crecimiento pro-angiogénicos que estimulan a las células endoteliales locales proliferando en la pared vascular (mitosis, vacuolas, tubos). Como parte de una línea de investigación, el proyecto consiste en evaluar por medio de un registro microfotográfico la integración de las CMP implantadas en un modelo de isquemia en la extremidad inferior de rata mediante el autotrasplante intramuscular para aumentar la sobrevivencia celular⁽²⁾. La idea fundamental es en hacer cortes histológicos para identificar por medio de marcadores específicos el comportamiento de las CMP durante el proceso de angiogénesis evaluando por microfotografía. Esperamos resultados favorables que completen la evidencia que respalda este trabajo de investigación.

JUSTIFICACIÓN

Gracias a la línea de investigación que hemos llevado a cabo por más de 25 años, la terapéutica consolidada del trasplante de CMP en miembros inferiores que sufren isquemia crítica se está llevando a cabo de manera exitosa e por el servicio de Angiología a Cirugía Vascular del CMN 20 de Noviembre; sin embargo, consideramos que la actualización de la técnica de trasplante celular es de vital importancia para mantener la viabilidad de la terapia celular. Los avances científicos de acuerdo a la ingeniería de tejidos demuestran la necesidad de buscar mejoras para el tratamiento enfocados en la selección de las células a trasplantar así como garantizar la integración y funcionalidad de las mismas. Es por esto que estudio pretende demostrar por medio de microfotografía y a través de marcadores específicos la integración de las CMP para generar neo-angiogénesis terapéutica en modelo de miembros inferiores isquémicos; así como

identificar la especialización de dichas células a través de proteínas transmembranales de microvasculatura.

HIPÓTESIS

Ho: El análisis Inmunohistoquímico demostrará la integración de las CMP para generar neo-angiogénesis terapéutica en modelo de miembros inferiores isquémicos; así como la especialización celular en microvasculatura

OBJETIVO GENERAL

- Realizar un registro microfotográfico de la expresión de marcadores histológicos en las células mononucleares progenitoras trasplantadas en rata en un modelo isquémico de miembros inferiores

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar por medio de inmunohistoquímica la expresión del receptor vWF en dos etapas durante el tratamiento de isquemia
- Evaluar por medio de inmunohistoquímica la expresión del receptor KDR en dos etapas durante el tratamiento de isquemia
- Evaluar por medio de inmunohistoquímica la expresión del receptor HIF en dos etapas durante el tratamiento de isquemia
- Evaluar por medio de inmunohistoquímica la expresión del antígeno CD34+ en dos etapas durante el tratamiento de isquemia

METODOLOGÍA

Diseño y tipo de estudio.

Ser realizó un estudio de intervención experimental, con muestreo aleatorio, comparativo concurrente, de seguimiento longitudinal y dirección prospectiva

Población de estudio.

20 ratas wistar macho de 300gr de peso

Universo de trabajo

20 ratas wistar macho de 300gr de peso, manejados de acuerdo a la NOM 062-ZOO-1999, referente al uso y cuidado de los animales de laboratorio y la Ley de Protección a los Animal de Ditrto Federal 2002.

Tiempo de ejecución. Un año

Esquema de selección.

Definición del grupo control.

10 ratas wistar macho a las que se les provocara isquemia de miembros inferiores bajo un modelo quirúrgico estandarizado (padilla 2014).

Definición del grupo a intervenir.

10 ratas wistar macho a las que se les provocó isquemia de miembros inferiores bajo un modelo quirúrgico estandarizado (padilla 2014).

Criterios de inclusión.

20 ratas wistar, machos, isogénicas, peso de 300 g, con certificado de salud.

Criterios de exclusión.

Patología evidenciable evaluada por el equipo veterinario del servicio, incluyendo hematomas e infecciones situados en las extremidades inferiores, pared abdominal o intracavitarios.

Criterios de eliminación.

Muerte del sujeto de experimentación antes de la evaluación prevista en 15 o 30 días.
Adquisición de alguna enfermedad metabólica que afecte la reproducción celular.

Tipo de muestreo.

Muestreo probabilístico.

Muestreo no probabilístico.

Metodología para el cálculo del tamaño de la muestra y tamaño de la muestra.

Los experimentos que se realizan en investigación con animales a pesar de ser de los más poderosos, por el rigor que se le puede dar a las variables, utilizan pocos sujetos de estudio. En este tipo de diseños a medida que las repeticiones aumentan las estimaciones de las medias observadas se hacen más precisas. Ambas influyen mutuamente, de forma tal que, a mayor número de repeticiones mayor grado de precisión.

Para el cálculo del tamaño de muestra, se consideró la variable dependiente “isquemia de miembros inferiores”. De acuerdo a información de estudios previos relacionados (Dormandy JP, Rutherford RB. Transatlantic interconsensus (TASC) management of peripheral arterial disease. J Vasc Surg 2000; 31: S1-S278.)⁽¹²⁾, la prevalencia esperada de esta variable es 3%; considerando un error alfa 0.05 y un error aceptable de 30%, se obtuvo una $n=4.9$.

$$n = \frac{4(Z_{crt})^2 p(1-p)}{D^2}$$

$$n = \frac{4(1.96)^2 0.03(0.97)}{0.01}$$

$$n = 4.9$$

Dónde: Zcrt= 1.96 (valor de Z en tablas), p=3% (Prevalencia esperada), D= 30%(Error aceptable).

Tomando en cuenta este cálculo determinamos que 2 grupos de 10 ratas cada uno incrementará la posibilidad de obtener resultados significativos en la evaluación del curso temporal.

Descripción operacional de las variables.

Definimos como variables controladas: la alimentación, temperatura y estrés generados en el bioterio, procurando que estas sean constantes para todos los sujetos de investigación.

La evaluación histológica será establecida como unidad de medida al existir o no cambios tisulares con la aplicación de la prueba en estudio (S.S o CMP+PRP+T)

Los Marcadores histológicos que se evaluarán son:

Marcador Histológico	Características principales	Sintetizadores
Factor de von Willebrand (vWF) ⁽¹³⁾	Induce la adhesión de las plaquetas al endotelio vascular y la agregación de las mismas cuando en el organismo hay una lesión (melo nava)	Es sintetizado por células endoteliales, megacariocitos y plaquetas

Receptor de dominio de inserción de quinasa (KDR) ⁽¹⁴⁾	Mitogénicos para células vasculares endoteliales y que juegan un papel esencial en la angiogénesis	Activación mediante transfosforilación, en región transmembrana, y una región intracelular que contiene un dominio escindido. VEGFR-2
Factor Inducible por Hipoxia (HIF) ⁽¹⁵⁾	Es esencial en el mantenimiento de la homeostasis del oxígeno. Sus genes blanco incluyen al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Pertenecen a la familia de los factores de transcripción con dominios bHLH/PAS (basic helix–loop–helix/PerArnt-Sim homology) que son determinantes para la unión al ADN
Antígeno CD34+ ⁽¹⁶⁾	Antígeno de células precursoras del sistema hematopoyético, cuya detección a través de la inmunohistoquímica puede ser útil para identificar células angiogénicas (Jorge García Tamayo y Cathy Hernández)	Es una proteína transmembranosa, inicialmente detectada en las células del sistema linfohematopoyético, precursoras de la serie mieloide y presentes en la médula ósea (6, 7); este antígeno se observa también en el endotelio vascular (8)

Técnicas y procedimientos empleados.

MODELO ISQUÉMICO DE MIEMBRO INFERIOR. Se utilizó un modelo de isquemia muscular en dos tiempos, primero con ligadura inicial por vía abdominal de la arteria iliaca externa y a los ocho días se practicó la extirpación total de la arteria femoral (técnica estandarizada de un modelo que simula la isquemia crónica).⁽¹⁾

Posterior al segundo tiempo operatorio se aplicó el tratamiento correspondiente según el grupo de investigación

GRUPO I:

Solución salina (S.S.) Se aplicó 1ml de solución salina vía intramuscular posterior al segundo tiempo operatorio.

GRUPO II:

Las CMP, el PRP y la T se concentraron en 1ml total para la aplicación del tratamiento vía intramuscular.

Células Mononucleares Progenitoras (CMP). Se anestesió una rata donadora, y se realizó laparotomía exploratoria exponiendo grandes vasos; puncionando la vena cava con jeringa bañada en heparina, extrayendo poco a poco la sangre periférica hasta obtener 3ml. Para realizar el aislamiento de CMP, en un tubo cónico de 15 ml, se adicionaron 6 ml de Histopaque y 3 ml de sangre centrifugando a 400 xg por 30 min., se retiró el sobrenadante, obteniendo un halo de células mononucleares las cuales fueron colocadas en otro tubo cónico nuevo agregándole 5 ml de PBS (buffer de fosfato) con repetición de tres lavados. Se descartó el sobrenadante y con pipeta extraemos el líquido restante. Finalmente resuspendemos el botón de células ajustando a 50µl obteniendo un promedio de 1.5×10^6 CMP para el trasplante celular ⁽⁸⁾. Se realizó el conteo y viabilidad celular.

Plasma Rico en Plaquetas (PRP). Se realizó laparotomía exploratoria en rata donadora exponiendo grandes vasos, se puncionó la vena cava con jeringa bañada en heparina hasta obtener 3ml de sangre, la cual se colocaron en tubos vacoutainer con citrato de Ca⁺. La muestra se centrifugó a 2000rpm por 10 min. Extrayendo el PRP y se activaron con Gluconato de Calcio.⁽⁸⁾

Trombina (T). Se utilizaró 0.5ml de Tissucol Trombina 8U/5ml

INCLUSION EN PARAFINA E INMUNOHISTOQUÍMICA

Previo al sacrificio de los biológicos, se realizaron biopsias a los 15 días y a los 30 días posteriores al tratamiento para ambos grupos. Se fijaron con Sefefix.

	Día 15	Día 30
Grupo I	Toma de muestra (5 ratas)	Toma de muestra (5 ratas)
Grupo II	Toma de muestra (5 ratas)	Toma de muestra (5 ratas)

Las muestras deshidratadas por medio de un tren de alcohol fueron incluidas en parafina. Realizamos cortes histológicos con micrótopo de 5µm de grosor. Posterior a su rehidratación y se colocaron en portaobjetos.

Para el análisis inmunohistoquímico, se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos con una solución compuesta por 5% de suero de cabra en PBS sin Ca ni Mg, por 30min a temperatura ambiente. Realizamos dos lavados a cada muestra con PBS sin Ca ni Mg, cada uno durante 5 min. El exceso de líquido se retiró del portaobjetos, secando los bordes cuidadosamente.

Posterior a los lavados, se realizó un bloqueo de la actividad de peroxidasas endógenas con 0.3% de H₂O₂ en PBS sin Ca ni Mg por 10 min a temperatura ambiente. Llevamos a cabo una segunda ronda de lavados con PBS sin Ca ni Mg. La incubación se empleó con los siguientes anticuerpos: Factor de von Willebrand (vWF), factor del receptor de crecimiento vascular endotelial (KDR), factor inducible por hipoxia (HIF) y antígeno CD34.

Una vez obtenidos los resultados se llevó a cabo una evaluación por medio de microfotografía y se analizaron los resultados obtenidos.

Procesamiento y análisis estadístico

Vaciamos los datos obtenidos en tablas, plasmando las mediciones a los 15 días y a los 30 días posteriores al tratamiento para poder evaluar las diferencias en el tiempo desde el punto de vista histológico.

ASPECTOS ÉTICOS

La atención para los modelos biológicos de la experimentación se realizó de acuerdo a lo previsto en la Ley General de Salud Mexicana en la NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, en el apartado 5.1 (roedores) referente a los estudios experimentales en animales, publicada en el Diario Oficial de la Federación.

Los investigadores confirmamos que la revisión de los antecedentes científicos del proyecto justifican su realización, que contamos con la capacidad para llevarlo a buen término, nos comprometemos a mantener un estándar científico elevado que permita obtener información útil para la sociedad, y nos conduciremos de acuerdo a los estándares éticos aceptados nacional e internacionalmente.

CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD

El presente trabajo se realizó con animales de experimentación y todos los procedimientos se realizaron bajo las disposiciones contenidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y La Ley General de Salud.

La investigación se considera de riesgo mínimo. En la fase experimental los animales fueron manipulados por personal con experiencia en el área, manteniendo medidas de seguridad respecto al manejo de animales y uso de sustancias para la anestesia. El investigador principal pudo suspender y modificar el curso la investigación al advertir algún riesgo o daño adicional en los animales de experimentación.

Obtención de animales. Todos los animales fueron adquiridos conforme a los preceptos jurídicos en la institución. Las transacciones que involucraron la adquisición de los animales se condujeron legalmente. Los animales fueron protegidos contra condiciones climáticas extremas o sofocación debido al transporte. Se evitó el hacinamiento, se brindó agua y alimento “ad libitum” y fueron protegidos contra traumatismos, (supervisado por el Médico Veterinario Zootecnista), con el fin de comprobar el cumplimiento de las especificaciones de adquisición y la ausencia de signos clínicos de enfermedad, debiéndose establecer a juicio profesional los procedimientos de cuarentena y estabilización de acuerdo a las circunstancias. Todos contaban con Certificado de salud y calidad para establecer las condiciones en que se produjeron, criaron y mantuvieron hasta antes de la fase experimental.

RESULTADOS

Se realizó un modelo de isquemia crítica estandarizado (Padilla 2014) a 20 ratas wistar en dos tiempos, en el primer tiempo se ligó la arteria iliaca externa derecha y en el segundo tiempo (8 días después del primero tiempo), se extirpó la arteria femoral. Se dividieron en dos grupos de 10 ratas cada uno, al primer grupo (grupo control) se le administró solución salina en el segundo tiempo y al segundo grupo (grupo de estudio) se le administró por vía intramuscular PRP, CMP y Trombina.

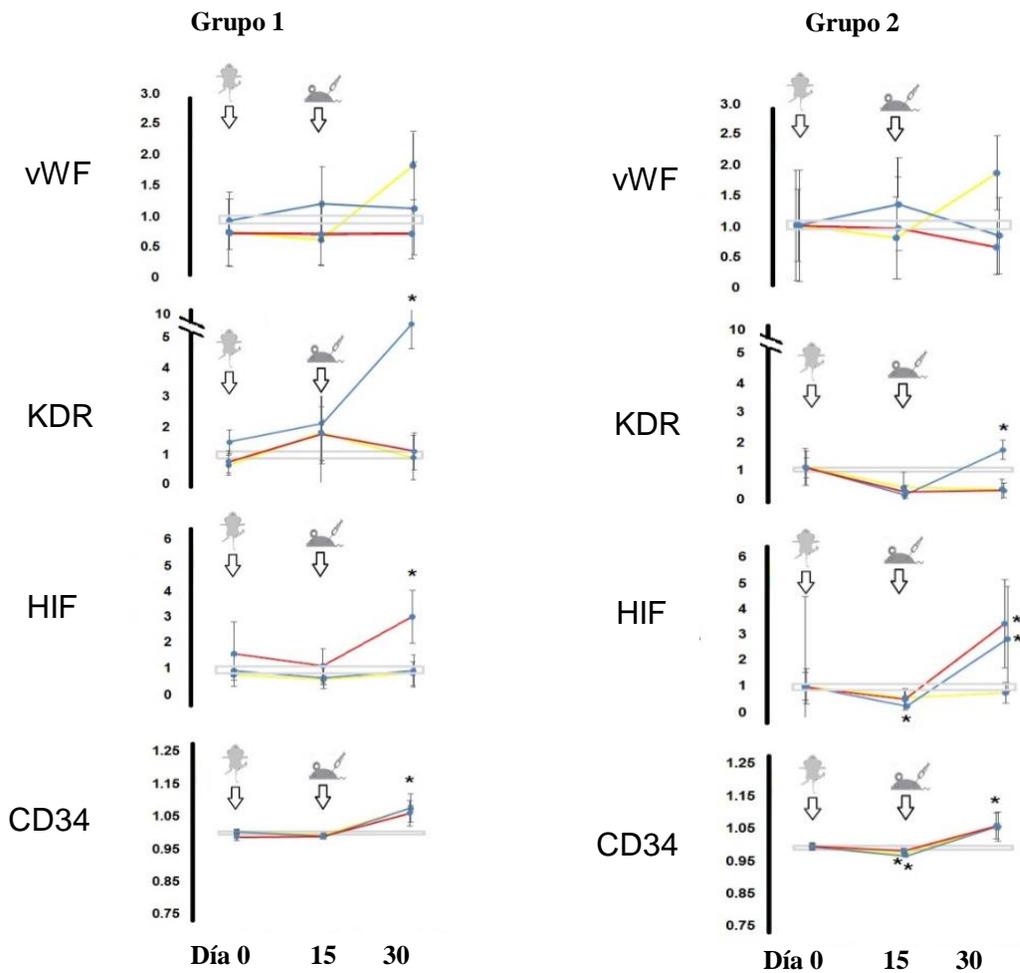


Figura 1. Efecto de CMP, PRP y tratamientos de trombina sobre mediadores angiogénicos durante la revascularización. Comparamos el efecto de PRP (línea amarilla), CMP + PRP (línea azul) y CMP + PRP + trombina (línea roja) sobre mediadores pro-angiogénicos a los 15 y 30 días de revascularización en el modelo experimental. El efecto del control salino se representa como un rectángulo gris. (*) = $p < 0.05$, prueba T independiente de dos colas.

Medimos el efecto de los diferentes tratamientos: PRP, CMP y trombina sobre mediadores proangiogénicos bien conocidos, durante la revascularización experimental de la isquemia de la extremidad inferior y su efecto en los receptores angiogénicos.

PRP solo parece estimular el vWF. La combinación de CMP + PRP + Trombina indujo significativamente KDR, efecto que se evitó mediante la adición de trombina. Asimismo, la combinación que contiene trombina también incrementó el HIF. CD34 mostró una inducción sensible a todos los mediadores pro-angiogénicos. (**figura 1**).

Aunque todos los tratamientos estimularon significativamente la revascularización, se observó un efecto mayor con el tratamiento con CMP + PRP.

DISCUSIÓN

El principal hallazgo del presente estudio fue que el trasplante autólogo de CMP, PRP y Trombina, estimula concomitantemente mediadores pro-angiogénicos y afecta diferencialmente a los mediadores fibrinolíticos. A pesar de tales efectos, la estimulación de estos factores en la revascularización durante la isquemia crítica experimental de la extremidad inferior fue similar.

PRP puede estimular la angiogénesis por diferentes mecanismos. PRP contiene un alto nivel de plaquetas y factores de crecimiento producidos por las plaquetas que poseen efectos angiogénicos potenciales. En el presente estudio, el PRP aumentó particularmente los niveles plasmáticos de vWF, lo que podría inducir a la angiogénesis debido a su interacción mutua con el factor de activación plaquetaria (PAF) presente en el PRP, o debido a la inducción de mediadores como LRG1 que promueve la angiogénesis y el mesénquima. Migración de células madre. Además, PRP también aumentó KDR. Consistentemente, la producción de KDR se ha descrito en sobrenadantes de PRP in vitro y en tenocitos cultivados estimulados con PRP.

En el presente estudio, el aumento mediado por PRP de vWF fue prevenido por CMP y trombina. A la inversa, se ha descrito una mayor inducción de HIF en sobrenadantes durante la activación de PRP en presencia de trombina. Estos efectos pueden explicarse por las diferencias con el presente estudio con respecto al modelo in vivo utilizado aquí y la inducción de la isquemia experimental de la extremidad. Sin embargo, creemos que el modelo in vivo refleja un escenario más realista de mediadores pro-angiogénicos dentro de la enfermedad humana.

En general, el PRP, CMP Y T, estimularon significativamente la revascularización en el presente estudio, lo que puede explicarse debido a las citoquinas, así como a proteínas como la fibrina y la trombina, contenidas en el PRP, que facilitan la adhesión celular, la migración, la angiogénesis y promueven la reparación y / o regeneración de tejidos.

Evaluamos el papel angiogénico de las CMP porque contienen efectos angiogénicos significativos y debido a las aplicaciones potenciales dentro de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa. Del mismo modo, exploramos el papel de la trombina, ya que varios estudios habían sugerido su relación con la supervivencia más prolongada de los trasplantes de CMP y la formación de redes colaterales en la isquemia experimental de miembros inferiores.

Observamos que las CMP aumentaron la producción de vWF, efecto que se evitó mediante la adición de trombina. La promoción de la angiogénesis por CMP + PRP puede ocurrir facilitando su diferenciación o aumentando su supervivencia, debido al contenido de VEGF en PRP. Además, las PBMC y MPC pueden regular la angiogénesis y la trombolisis por sus interacciones con el coágulo de fibrina. Las CMP pueden sintetizar activadores de plasminógeno, tras la activación de vWF, lo que resulta en la degradación de la red de fibrina; pero las CMP también pueden inhibir la fibrinólisis y la estabilización de la fibrina mediante la producción de HIF. En nuestro modelo, el tratamiento con CMP aumentó el HIF, lo que sugiere un efecto de estabilización de la fibrina, mientras que la adición de trombina contrarrestó la expresión de HIF, y probablemente indujo activadores locales del plasminógeno en las CMP, que se sabe que responden a la trombina.

Por otro lado, las CMP aumentaron el CD34, ya sea solo o cuando se combinó con trombina. Este efecto puede aumentar la angiogénesis al inducir la migración de células endoteliales, la proliferación y la inhibición de la apoptosis; así como la formación de tubos capilares y la expresión de integrinas que modulan las funciones endoteliales. El efecto pro-angiogénico final de la trombina observado en este estudio puede apoyar las aplicaciones potenciales de la trombina en la angiogénesis terapéutica.

Algunas limitaciones del presente estudio incluyen: 1) el tratamiento con CMP consistió en la administración de la preparación de células mononucleares, donde solo el 4% correspondió a CD34 + CMP, pero las células mononucleares restantes no se caracterizaron. Dicha porción de MPC se ha descrito previamente como suficiente para estimular significativamente la angiogénesis en el mismo modelo experimental; sin embargo, el efecto de factores adicionales presentes en la preparación celular no se evaluó en el presente estudio, y 2) La falta de un grupo con PBMC solo y trombina sola.

CONCLUSIONES

En conclusión, el trasplante autólogo de CMP + PRP Y Trombina estimula la revascularización durante la isquemia crítica experimental de la extremidad inferior; mientras que los efectos particulares sobre los mediadores angiogénicos y fibrinolíticos pueden atribuirse a las CMP y su combinación con la trombina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Padilla SL, Rdríguez-Trejo JM, Gasca O, Carranza PH, Martínez LA, Mota E, Díaz X, Landero TY, Polaco J, Mondragón-Terán P. **Técnica para evaluar neovascularización o angiogénesis experimental en la extremidad isquémica de la rata** *Angiología*. Vol. 42 Núm. 3 Julio-Septiembre 2014 pp 115-118
2. Padilla SL, Tapia-Jurado J, Rodriguez-Trejo J, Carranza PH, Mondragón-Terán P, *et al* **Effect of self-transplanted, peripheral blood derived mononuclear progenitor cells and angiogenic factors during neovascularization in the rat model of lower limb ischemia**. En prensa 2018
3. Masaki H, Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, *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):427-3
4. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Van Der Zee R, Li T, Schatteman G, *et al*. **Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis**. *Science* 1997; 275: 964-7
5. Padilla L, Kröttsch E, De La Garza A, Figueroa S, Rodríguez-Trejo J, Ávila G, *et al*. **Bone marrow mononuclear cells stimulate angiogenesis when transplanted into surgically induced fibrocollagenous tunnels: Results from a canine ischemic hind limb model**. *Microsurgery* 2007; 27: 91-7.
6. Padilla L, Rodríguez-Trejo J, Escotto I, De Diego J, Landero T, Carranza P, *et al*. **Long-term effect of autologous progenitor cell therapy to induce neo-angiogenesis in patients with critical limb ischemia transplanted via intramuscular vs. combined intramuscular and distal retrograde intravenous**. *Stem Cell Disc* 2012; 2: 155-62.
7. Benoit, O'Donnell TF, Patel AN. **Safety and efficacy of autologous cell therapy in critical limb Ischemia: a systematic review**. *Cell Transplant* 2013; 22(3): 545-62
8. Padilla SL, Rodríguez Trejo J, Escotto SI, De Diego J, Landero YT, Carranza, *et al*. **Trasplante de células mononucleares progenitoras derivadas de médula**

ósea por vía endovenosa retrógrada distal para inducir angiogénesis en miembros inferiores con isquemia. Cir Gen 2009; 31: 213-8

9. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. **Therapeutic angiogenesis using cells transplantation (TACT) Study Investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemic by autologous. Transplantation of bone-marrow cells: A pilot study and a randomized controlled trial.** Lancet 2002; 360: 427-35.
10. Padilla SL, Kröttsch E, Schalch P, Figueroa BS, Miranda A, Rojas E, et al. **Administration of bone marrow cells into surgically induced Fibrocollagenous tunnels induces angiogenesis in ischemic rat hind limb model.** Microsurgery 2003; 23: 568-74.
11. Rodríguez-Trejo JM, Padilla SL, Carranza PH, Landero TY, Alba-Garduño V, Mondragón-Terán P. **Primer caso de trasplante de células progenitoras derivadas de la médula ósea en isquemia crítica de miembros inferiores como terapéutica consolidada** Angiología. Vol. 42 Núm. 4 Octubre-Diciembre 2014 pp 163-169.
12. Dormandy JP, Rutherford RB. **Transatlantic interconsensus (TASC) management of peripheral arterial disease.** J Vasc Surg 2000; 31: S1-S278.
13. Bowen D, Collins P. **An amino acid polymorphism in von Willebrand factor correlates with increased susceptibility to proteolysis by ADAMTS-13.** Blood 2004; 103: 941-7
14. Shimizu T., Jiang J., Iijima K., Miyabayashi K., Ogawa Y., Sasada H., and Sato E., **Induction of Follicular Development by Direct Single Injection of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Fragments into the Ovary of Miniature Gilts,** Biology of Reproduction, 69:1388-1393, 2003.
15. Aquino-Gálvez A, González-Ávila G. **El papel del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) en la fibrosis pulmonar idiopática** Neumol Cir Torax Vol. 69 - Núm. 3:170-177 Julio-septiembre 2010
16. Schilgemann RO, Rietveld FJ, de Wall RM y col. **Leucocyte antigen CD34 is expressed by a subset of cultured endothelial cells and on endothelial abluminal microprocesses in the tumor stroma.** Lab Invest 1990, 62: 690-696