



VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA

**PROGRAMA DE DOCTORADO**

**040-F Cirugía y sus especialidades**

**ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO DE LA ISQUEMIA  
CRÍTICA DE MIEMBROS INFERIORES NO REVASCULARIZABLE  
MEDIANTE TRASPLANTE AUTÓLOGO DE PROGENITORES  
HEMATOPOYÉTICOS**

**TESIS DOCTORAL**

**Doctorando:**

**D. Raúl Lara Hernández**

**Directores :**

**Dr. D. Armando Mena Durán**

**Dr. D. Manuel Miralles Hernández**

**Dra. Dña. Antonia Sampol Mayol**

**Valencia,2015**



**FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA**

**ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO DE LA ISQUEMIA  
CRÍTICA DE MIEMBROS INFERIORES NO REVASCULARIZABLE  
MEDIANTE TRASPLANTE AUTÓLOGO DE PROGENITORES  
HEMATOPOYÉTICOS**

**TESIS DOCTORAL**

**Doctorando:**

**D. Raúl Lara Hernández**

Licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia

Médico Especialista en Angiología y Cirugía Vascular

Fellow of the European Board in Vascular Surgery (UEMS/ESVS)

**Directores :**

**Dr. D. Armando Mena Durán**

**Dr. D. Manuel Miralles Hernández**

**Dra. Dña. Antonia Sampol Mayol**

**Valencia,2015**



Don Armando Mena Durán, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Titular de la Facultad de Medicina de la Universidad Católica de Valencia

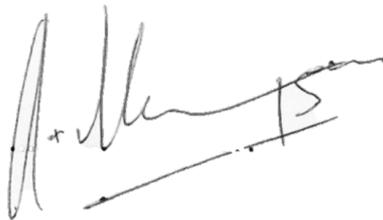
Don Manuel Miralles Hernández , Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Titular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia y Jefe de Servicio de Angiología y Cirugía Vascul ar del Hospital Universitario La Fe ( Valencia )

Doña Antonia Sampol Mayol, Doctora en Medicina y Cirugía, Jefa del Servicio de Hematología del Hospital Universitario Son Espases ( Palma de Mallorca )

#### CERTIFICAN

Que el trabajo titulado “*Análisis y Evaluación de la Isquemia Crítica de Miembros Inferiores No Revascularizable, mediante Trasplante Autólogo de Progenitores Hematopoyéticos* “ , ha sido realizado bajo nuestra dirección por el Licenciado en Medicina y Cirugía Don Raúl Lara Hernández, y que se considera apto para su lectura y defensa pública ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a todos los efectos oportunos, se extiende la presente certificación en Valencia a 1 de Julio de 2015.



Dr. D. Armando Mena Durán  
Codirector de Tesis



Dr. D. Manuel Miralles Hernández  
Codirector de Tesis



Dra. Dña. Antonia Sampol Mayol  
Codirectora de Tesis



A mis padres, Angel y Nelly, *por haberme enseñado a caminar solo a pesar de las adversidades ...*

A Cira, *por darme su amor incondicionalmente y ayudarme cada día ...*

A Marc y a Lluc, *por demostrarme que son los mayores logros de mi vida ...*

*Te quiero no por quien eres, sino por quien soy cuando estoy contigo.*  
*Gabriel García Márquez*



## Agradecimientos

Desde el primer momento en que me preguntaron, tuve clara mi vocación por ayudar a los demás. No sé si esta profesión ha sido la mejor opción, puesto que ha supuesto una gran cantidad de sacrificios por parte de todos los que en las distintas fases de mi crecimiento como estudiante, residente y especialista han permanecido a mi lado. Todo lo que soy, ha sido gracias a ellos:

Mis padres, Nelly y Angel, sin los que con su inestimable apoyo, comprensión y cariño no hubiese podido llegar a ser lo que soy. Os quiero y me siento orgulloso de vosotros. *Papá*, me enseñaste a luchar por un objetivo, de manera incansable, incluso cuando sabías que no tendrías las condiciones favorables para conseguirlo. Me enseñaste muchas cosas a lo largo de todos estos años, pero la mayor lección de vida que me diste fue en los últimos días que pasamos juntos, donde pude comprobar tu fuerza, tesón y capacidad de batalla para conseguir tu objetivo, que no era otro que seguir con nosotros. Me hubiese gustado que hubieses estado hoy aquí, para ver como he luchado y trabajado por mi, nuestro, objetivo y que vieses lo mucho que has influido en mí. Siempre estaré orgulloso de ti, allá donde estés. Te quiero mucho, papa.

*Mis segundos padres*, Mariló y Pepe. Siempre preocupados por mí desde mi más temprana edad. Trabajadores incansables y siempre con una visión positiva a pesar de las adversidades. *No sólo me enseñasteis a caminar solo, sino también a disfrutar de las cosas sencillas de la vida*. Siempre recordaré los veranos junto a la piscina y los inviernos de chimenea. Me siento orgulloso de vosotros.

Cira, la luz que me ha guiado desde el primer día. El amor de mi vida. La que más ha tenido que sacrificar en estos últimos años para que yo pueda llegar hasta aquí. Me siento muy afortunado porque estás a mi lado. Tu fuerza y capacidad de superación y adaptación a los cambios es admirable. Espero poder compartir muchas mas noches de sofá contigo, hasta que el sueño nos venza.

Mis hijos, Marc y Lluç, los que me arrancan una sonrisa desde el primer minuto de su existencia. Cada día aprendo algo más con vuestros juegos, miradas y palabras. Me siento muy orgulloso por teneros junto a mí. Siento mucho los días de juegos perdidos, baños y cenas no compartidos, por haber tenido que dedicarle parte de vuestro tiempo a esta tesis.

Mis hermanas, Teresa y Miryam, y mis *otros hermanos* (Alejandro, Marta y Pablo). Recuerdo con nostalgia las tardes y noches de conversaciones donde compartíamos ilusiones, éxitos, fracasos y proyectos de futuro. Os deseo lo mejor para el vuestro. Gracias por vuestro apoyo.

Mis amigos, los mejores del mundo: Jordi, Peter, C. Garcia, Javi, C. Tarazaga, Antonio, Jacobo, Fernando, Alex, Juan ... Lejos quedan las travesías por los Pirineos, y las vacaciones en Mallorca. Muy distintos, pero muy unidos por un valor común: la amistad. Alegrándonos por los éxitos individuales sentidos como colectivos y apoyándonos en los malos momentos, sintiendo el dolor de otro como propio. Siempre unidos.

Profesor D. Carlos Carbonell Cantí. Gracias por todos tus consejos desde el inicio de mi interés por la Cirugía Vascul ar. Aún recuerdo el primer día que te conocí y como casi sin querer , acabé contagiado por tu pasión por la cirugía. Soy cirujano vascular gracias a tí.

Profesor Juan Martínez-León Bautista. Durante mi época como alumno interno del departamento de C. Cardiovascular del Hospital Clínico Universitario de Valencia, me enseñaste a tener siempre una visión positiva y a no perder la calma en los momentos de estrés. Recuerdo la primera vez que estuve contigo en quirófano: me impactó tu capacidad resolutive ante las adversidades. Gracias por haber depositado en mí tu confianza para un proyecto difícil, y siento haber tenido que marcharme en el peor momento de todos. Te deseo todo lo mejor en todos tus proyectos profesionales.

A todos mis compañeros del Hospital Universitario Son Dureta, pero especialmente a dos personas:

Dr Pascual Lozano Vilardell. Gracias por las críticas (constructivas todas) realizadas durante mi periodo de formación MIR en el Hospital Son Dureta, puesto que me han hecho ser mejor profesional. Gracias por tus consejos, enmascarados en forma de anécdotas y por toda tu paciencia para enseñarme durante las maratónicas sesiones quirúrgicas. En ocasiones me sentí como “un hijo adoptivo”, por la forma en que me trataste y corregiste. Me inculcaste la búsqueda de la perfección en el trabajo y a no dejar nada al azar. Intelectualmente brillante, metódico en el trabajo, un ejemplo a seguir. Años después volvemos a trabajar juntos, y espero que este nuevo proyecto nos traiga muchos éxitos.

Dr. Enrique Manuel-Rimbau Muñoz. Fuiste un tutor ejemplar durante mi periodo de residencia. Metódico, estudioso y dotado de una enorme humanidad; un ejemplo como médico, cirujano y como persona. Siempre preocupado por mí y mi formación. Me demostraste que es posible disfrutar del trabajo incluso en los momentos mas adversos. Siempre dispuesto a escuchar, siempre dispuesto a ayudar. Muchas gracias por todo Quique.

Dr. Jose Luís de Frutos Rincón. Carismático, jovial y alegre. Toda una vida dedicada a la Cirugía Vascul ar. Lleida tuvo mucha suerte de tenerte con Jefe del Servicio de Cirugía Vascul ar. Muchas gracias por tu apoyo en mis primeros años como adjunto, siempre difíciles para un novato. Gracias por acogerme en tu casa y enseñarme a través de tu experiencia. Aprendí mucho de ti. Me enorgullece haber formado parte de tu equipo. Te deseo todo lo mejor en esta nueva etapa de tu vida.

Dr. Manuel Miralles Hernández. Siempre positivo a pesar de las adversidades. Luchador incansable. Confiaste en mí para formar parte del proyecto del Hospital La Fe, donde crecí profesional y personalmente. Inquieto intelectualmente, siempre capaz de ver mas allá de lo establecido. Aún recuerdo las cirugías aórticas complejas “out of IFU”, que siempre acababan de manera exitosa. Me enseñaste a no ceder ante el poder establecido y a defender de manera incansable todo lo referente a nuestra especialidad. Muchas gracias por tu experiencia y por todas tus aportaciones como co-director de esta tesis, que han enriquecido el resultado final.

Dr Armando Mena Durán. Desde el primer momento en que nos conocimos, me di cuenta del enorme director de tesis que eras. Otro ejemplo de esfuerzo y superación. Intelectualmente brillante, humilde a pesar de los méritos que te preceden, siempre atento a cualquier posibilidad de aprender, y siempre dispuesto a ilustrarme con tu experiencia y conocimientos. Espero no haberte defraudado, a pesar de mis preguntas, no siempre interesantes, pero que intentaban poder aprender todo de una persona muy admirada por mí. Iniciamos juntos una relación profesional que “no ha sido más que el principio de una buena amistad”. Gracias por tu esfuerzo e interés en que este proyecto saliera adelante. No hubiese sido posible sin ti.

Dra Antonia Sampol Mayol. Una sonrisa permanente cada vez que nos hemos reunido para sacar adelante este trabajo. Muchas gracias por todos tus comentarios , consejos y aportaciones como co-directora de esta tesis. Siempre dándome ánimos, y empatizando conmigo, ayudándome a visualizar el final del proceso. Una ayuda inestimable para poder finalizar este trabajo.

Dña. Marta Torres. Sin tu ayuda en la recolección de los datos durante el verano de 2013, no hubiese sido posible la finalización de esta tesis. Muchas gracias por tu interés y siento haber sido “el pesado” que te interrumpía en mitad de las lecturas. Te deseo lo mejor en todas las facetas de tu vida.

Dr Enrique Artigues Sánchez de Rojas y Dr. Francisco Guerrero Baena. Amigos y excelentes compañeros durante mi estancia en el Hospital General de Valencia. Os deseo todo lo mejor.

Dra Paula Blanes Ortí. Trabajadora incansable. Cirujana exquisita. Muchas gracias por los datos clínicos recogidos por tí mientras estuve fuera del hospital. Un trocito de esta tesis te pertenece. Ojalá trabajemos juntos otra vez en un futuro.

A todo el personal de enfermería de la 3ª E del Hospital Universitario Son Dureta, por ayudarme durante todo mi periodo de formación, pero especialmente al Sr Pablo Ibañez, por sus *sabios* consejos.



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	15
ISQUEMIA CRÓNICA DE MIEMBROS INFERIORES: UNA ENFERMEDAD CADA VEZ MÁS PREVALENTE	17
1.1 Evolución natural de la isquemia crónica de los miembros inferiores	25
1.2 Procesos implicados en el desarrollo de nuevos vasos	35
1.3 Nuevos tratamientos en la enfermedad arterial periférica oclusiva de miembros inferiores: angiogénesis terapéutica	41
2. CÉLULAS IMPLICADAS EN EL DESARROLLO DE NUEVOS VASOS: DEL HEMANGIOBLASTO A LA CÉLULA ENDOTELIAL.	67
2.1 Definición y características de Célula Madre y Célula Progenitora	67
2.2 Origen de las células endoteliales	69
2.3 Tipos de Células Progenitoras Endoteliales: earlyCPE y lateCPE	72
2.4 Localización de las Células Progenitoras Endoteliales	74
2.5 Movilización, reclutamiento y realojamiento de las CPE	76
2.6 Factores implicados en el número y funcionalidad de las CPE	78
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO	91
3.1 Hipótesis de Trabajo	91
3.2 Objetivos Primarios	91
3.3 Objetivos Secundarios	92
4. MATERIAL Y MÉTODOS	95
4.1 Material: pacientes	95
4.2 Material: fármacos	95
4.3 Métodos: diseño del estudio. Criterios de inclusión y exclusión	97
4.4 Métodos: Procesamiento del inóculo autólogo	99
4.5 Métodos: Aféresis	100
4.6 Métodos: implantación celular	111
4.7 Métodos: control y evaluación de las variables resultado postprocedimiento	116
4.8 Análisis Estadístico	117
5. RESULTADOS	121
5.1 Análisis Población Global	121
5.1.1 Análisis Descriptivo	121
5.1.2 Análisis de la variable resultado Amputación	127
5.1.3 Análisis de la variable resultado Exitus	132
5.1.4 Tablas de Supervivencia (Kaplan-Meier): global y por grupos	137

5.2	Análisis Grupo Control	142
5.2.1	Análisis Univariante y Multivariante sobre variable Amputación	142
5.2.2	Análisis Univariante y Multivariante sobre variable Exitus	147
5.3	Análisis Grupo Tratamiento Médico	152
5.3.1	Análisis Univariante y Multivariante sobre variable Amputación	157
5.3.2	Análisis Univariante y Multivariante sobre variable Exitus	162
5.3.3	Tablas de Supervivencia (Kaplan-Meier)	167
5.4	Análisis Grupo Angiogénesis	172
5.4.1	Datos Clínicos	172
5.4.1.1	Análisis Descriptivo	
5.4.1.2	Análisis Univariante y Multivariante sobre variable Amputación	
5.4.1.3	Análisis Univariante y Multivariante sobre variable Exitus	
5.4.1.4	Tablas de Supervivencia (Kaplan-Meier)	
5.4.1.5	Métodos de control postprocedimiento	
5.4.2	Datos Biológicos	195
5.4.2.1	Análisis de celularidad basal y rendimiento celular	
5.4.2.2	Análisis del Inóculo	
5.4.2.3	Tablas de Supervivencia (Kaplan-Meier)	
6.	DISCUSIÓN	213
7.	CONCLUSIONES	261
8.	BIBLIOGRAFÍA	265
9.	ANEXOS	317
10.	ABREVIATURAS	369

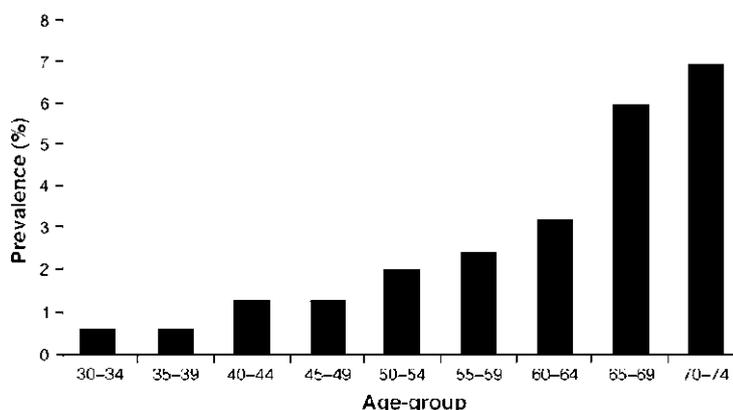
# INTRODUCCIÓN



## 1. ISQUEMIA CRÓNICA DE MIEMBROS INFERIORES: UNA ENFERMEDAD CADA VEZ MÁS PREVALENTE.

La enfermedad arterial oclusiva de miembros inferiores, o enfermedad arterial periférica (EAP), es una de las patologías con mayor impacto en la calidad de vida de los pacientes [1]. Tras ser una enfermedad casi ignorada, fuera del campo de la cirugía vascular, en los últimos años se han visto aumentados los programas de salud orientados a su detección precoz debido a las importantes repercusiones que puede tener sobre el individuo. De acuerdo con los estudios epidemiológicos realizados [2-7], se estima que entre un 3 y un 20% de la población cercana a los 70 años presenta EAP asintomática. La prevalencia de la EAP asintomática sólo se puede determinar mediante estudios hemodinámicos, siendo el Índice Tobillo-Brazo (ITB) el más ampliamente utilizado por su alta sensibilidad e inocuidad para el paciente. Un ITB menor o igual a 0,90 es producido por una estenosis arterial significativa, y es el criterio universalmente aceptado para definir la existencia de la enfermedad arterial periférica [7-8], con una sensibilidad del 95% y una especificidad cercana al 100% [8]. Si hablamos de la Claudicación Intermitente (CI), o EAP sintomática, la prevalencia estimada varía entre el 3 y el 6% en la población entre 40 y 60 años [8,9]. (Fig.1)

**Figura 1: Prevalencia media ponderada de EAP sintomática. Tomado de: Norgren L et al. Eur J Vasc Endovasc Surg 2007; 33: s5-s75. [Referencia Bibliográfica 8]**

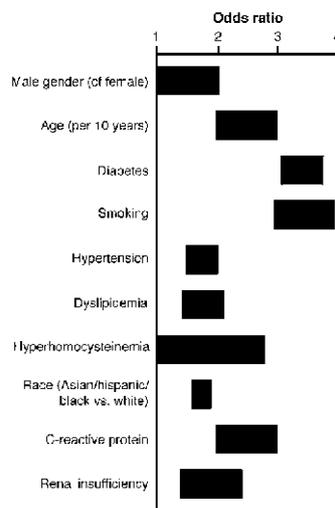


Existen varios factores asociados el desarrollo de EAP.

- Sexo: la prevalencia de la EAP es mayor en hombres que en mujeres, con una relación comprendida entre 1:1 y 2:1 (hombres:mujeres). Esta relación puede aumentar hasta 3:1 en estados más avanzados de la enfermedad, como en la isquemia crítica de miembros inferiores [8].
- Tabaco: conocido desde 1911, la EAP es tres veces más frecuente en fumadores [6,8]. La severidad de la EAP aumenta con el volumen de cigarrillos consumidos, de tal forma que, los grandes fumadores (más de 1 paquete/día) tienen cuatro veces más riesgo de desarrollar EAP que los no fumadores. El abandono del hábito tabáquico se asocia con un descenso de la incidencia de síntomas asociados a la EAP [6].
- Diabetes Mellitus: la EAP es dos veces más frecuente en diabéticos, de tal forma que, por cada 1% de incremento de la hemoglobina glicosilada, existe un incremento del 26% en el riesgo de desarrollo de EAP [8,10]. La resistencia insulínica también influye, incluso en pacientes no diabéticos, donde el riesgo de desarrollo de EAP se ve incrementado en un 50% [8,11]. La EAP en pacientes diabéticos es más agresiva, con afectación predominante de los lechos distales, lo que hace que la indicación de amputación mayor sea entre 5 y 10 veces más frecuente que en la población no diabética [8,12].
- Hipertensión Arterial: aunque asociada con todas las formas de enfermedad cardiovascular, el riesgo de desarrollo de EAP determinado por la hipertensión, es menor que el de la diabetes o el tabaco [8].

- Dislipemia: de acuerdo al estudio Framingham [13-15] el índice colesterol total / colesterol HDL está asociado al desarrollo de enfermedad arterial periférica [8].
- Marcadores inflamatorios: se ha demostrado [16,17] que dentro de los marcadores inflamatorios, la Proteína C Reactiva puede estar elevada en pacientes asintomáticos que posteriormente desarrollarán enfermedad arterial periférica, y es considerado marcador de riesgo de muerte cardiovascular [8].
- Hiperviscosidad: se han detectado niveles elevados de hematocrito en pacientes con EAP, probablemente secundario al hábito tabáquico. También se ha asociado a la EAP, niveles elevados de fibrinógeno sérico. Tanto la hipercoagulabilidad como la hiperviscosidad, han demostrado ser factores de mal pronóstico en el desarrollo de EAP [8].
- Hiperhomocisteinemia: la prevalencia de hiperhomocisteinemia es alta en la población con EAP, en comparación con el 1% de la población general. Hasta en un 30% de pacientes con EAP puede detectarse hiperhomocisteinemia [8]

**Figura 2: Rango de Odds Ratio para los factores de riesgo asociados al desarrollo de EAP. Tomado de: Norgren L et al. Eur J Vasc Endovasc Surg 2007; 33: s5-s75. [ref. 8]**



El conocimiento de la fisiopatología arterial ha permitido definir estrategias que disminuyan la progresión de la arteriosclerosis, mediante la instauración de mecanismos de prevención primaria (ejercicio físico y dieta saludable) y el tratamiento de los considerados factores de riesgo vascular (FRV) clásicos como: hipertensión arterial, tabaquismo, dislipemia y diabetes. Sin embargo, la evolución natural de la arteriosclerosis, hace que la aparición de complicaciones derivadas de la enfermedad, en los distintos territorios afectados (cardiológico, neurológico, visceral y locomotor), aumente con el envejecimiento progresivo de la población [1].

Podemos definir la isquemia crónica de miembros inferiores como el conjunto de signos y síntomas derivados de la reducción progresiva del flujo sanguíneo en la extremidad, que puede repercutir tanto en la función, como en la supervivencia de la extremidad [2]

En base al grado de severidad de la enfermedad, existen distintas manifestaciones clínicas que han permitido establecer una clasificación basada en cada una de las fases evolutivas (Tabla 1), que se ha podido correlacionar con una serie de criterios hemodinámicos (Tabla 2 y 3). Estos criterios hemodinámicos se basan en la exploración vascular básica, realizada por cualquier Angiólogo, conocida como Índice Tobillo-Brazo (ITB) (Figura 3). La realización del ITB nos permitirá [8]:

- confirmar el diagnóstico de EAP
- realizar diagnóstico diferencial con otras causas de claudicación
- identificar pacientes con riesgo de mortalidad cardiovascular, de acuerdo con la escala de Framingham [15]

**Tabla 1: Clasificación de Leriche-Fontaine para la isquemia crónica.**

<p><b>Grado I (Asintomáticos)</b></p> <p>- Pacientes con enfermedad arterial periférica presente, determinada por índice tobillo-brazo menor de 0.9, pero sin sintomatología clínica.</p>
<p><b>Grado II (Claudicación Intermitente)</b></p> <p>- Pacientes que presentan enfermedad arterial periférica, evidenciada por la ausencia de pulsos palpables en la exploración física y un índice tobillo-brazo inferior a 0.9, que refieren aparición de dolor muscular a la deambulación a partir de una determinada distancia y que cede con la interrupción del ejercicio. Se subdividen en:</p> <p style="padding-left: 40px;">II A : claudicación intermitente a más de 150 metros.</p> <p style="padding-left: 40px;">II B : claudicación a menos de 150 metros.</p>
<p><b>Grado III (Dolor en reposo persistente)</b></p> <p>- Pacientes con enfermedad arterial periférica, evidenciada por exploración física y hemodinámica, y que presentan dolor de características isquémicas en situación de reposo.</p>
<p><b>Grado IV (Alteraciones tróficas, Úlceras cutáneas y/o gangrena)</b></p> <p>- Pacientes con diagnóstico de enfermedad arterial periférica por los criterios antes establecidos y que presentan alteraciones en la integridad cutánea.</p>

**Tabla 2: Clasificación de Rutherford para la isquemia crónica**

Grados	Categoría	Descripción Clínica	Criterios objetivos
0	0	Enfermedad Asintomática	Normal en test de esfuerzo
I	1	Claudicación leve	Se completa test de esfuerzo: PT tras ejercicio > 50 mmHg, pero 25 mmHg menos que PB
	2	Claudicación moderada	Entre 1 y 3
	3	Claudicación grave	No se completa test de esfuerzo: PT tras ejercicio < 50 mmHg
II	4	Dolor en reposo	PT en reposo < 50 mmHG, RVP en tobillo o metatarsiano plano; PD < 30 mmHg
III	5	Pérdida tisular leve	PT reposo < 70 mmHg; RVP en tobillo o metatarsiano plano ; PD < 50 mmHg
	6	Perdida tisular grave, por encima del nivel transmetatarsiano. Pie no rescatable.	Igual que en categoría 5

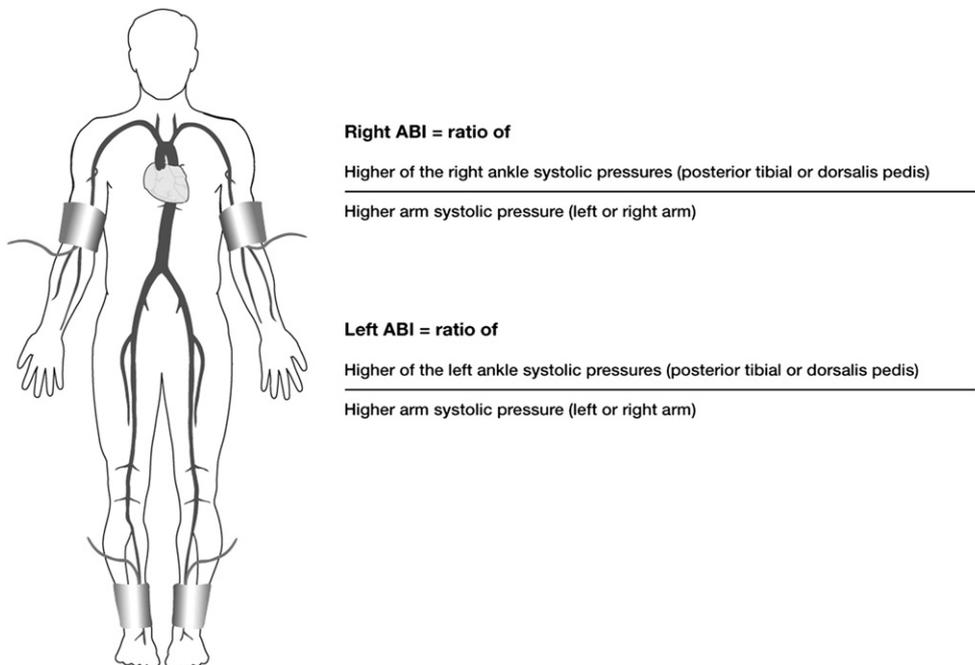
Test de esfuerzo: 5 minutos a 1 km/h con inclinación del 12%

PB: presión braquial; PD: presión digital; PT: presión en tobillo; RVP: registro volumen de pulso; TM: transmetatarsiano

**Tabla 3: Correlación entre Clasificación de Fontaine y Rutherford. Tomado de : Norgren L et al. Eur J Vasc Endovasc Surg 2007; 33: s5-s75. [ref. 8]**

<i>Fontaine</i>		<i>Rutherford</i>		
<i>Stage</i>	<i>Clinical</i>	<i>Grade</i>	<i>Category</i>	<i>Clinical</i>
I	Asymptomatic	0	0	Asymptomatic
IIa	Mild claudication	I	1	Mild claudication
IIb	Moderate to severe claudication	I	2	Moderate claudication
		I	3	Severe claudication
III	Ischemic rest pain	II	4	Ischemic rest pain
IV	Ulceration or gangrene	III	5	Minor tissue loss
		III	6	Major tissue loss

**Figura 3: Medición del Índice Tobillo-Brazo (ITB). Tomado de: Norgren L et al. Eur J Vasc Endovasc Surg 2007; 33: s5-s75. [ref. 8]**



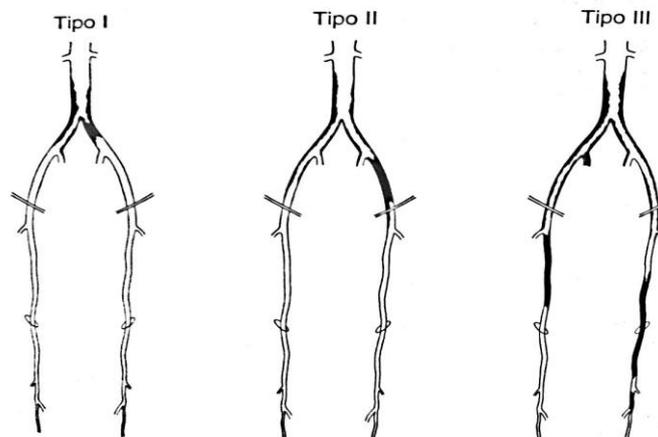
En aquellos pacientes con EAP de miembros inferiores sintomática, la manifestación clínica inicial suele ser la claudicación intermitente. La claudicación intermitente se define como el dolor muscular en la extremidad inferior (a nivel de las pantorrillas, muslos o nalgas) inducido por el ejercicio y que se alivia con periodos de reposo [8]. La claudicación se debe a una obstrucción arterial proximal a los lechos musculares afectados, que limita el flujo arterial durante el ejercicio, lo que produce una hipoxia tisular transitoria que desaparece con el reposo. Los síntomas de la claudicación intermitente varían de manera subjetiva en función de los hábitos de los individuos.

Dependiendo de la topografía de las lesiones, se distinguen 3 patrones de oclusión arterial, que determinarán la forma clínica de presentación:

- Obliteración aorto-femoral
- Obliteración fémoro-poplítea
- Obliteración poplíteo-distal o infrapoplíteo

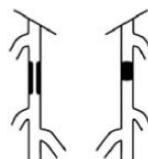
La obliteración fémoro-poplíteo constituye la forma más frecuente de presentación de claudicación intermitente, más del 50% de los casos [18], y determina la aparición de dolor gemelar con la deambulación generalmente secundaria a la oclusión de la arteria femoral superficial. No se debe entender la afectación de los territorios arteriales como aislados sino que podemos encontrar patrones combinados de afectación arterial en múltiples territorios (figuras 4 y 5)

**Figura 4: Topografía de lesiones arterioscleróticas. Tomado de: Brewster D. Reconstrucción directa de la enfermedad oclusiva aortoiliaca. En: Rutherford Cirugía Vascul ar 6ª edición. 2006. cap 79. Pag 1106 [ref. 33]**

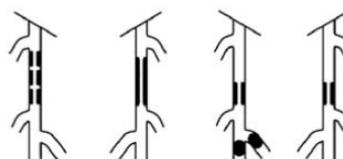


**Figura 5: Clasificación TASC II de lesiones oclusivas arterioscleróticas del sector fémoro-poplíteo-distal. Tomado de: Norgren L et al. Eur J Vasc Endovasc Surg 2007; 33: s5-s75. [ref. 8]**

**Lesiones tipo A**  
 Estenosis única  $\leq 10$  cm de longitud  
 Oclusión única  $\leq 5$  cm de longitud



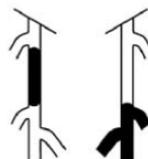
**Lesiones tipo B**  
 Múltiples lesiones, cada una  $\leq 5$  cm  
 Estenosis u oclusión única  $\leq 15$  cm que no incluye la poplítea infragenicular  
 Lesiones únicas o múltiples en ausencia de continuidad con vasos tibiales para mejorar el flujo de entrada a un *bypass* distal  
 Oclusión severamente calcificada  $\leq 5$  cm de longitud



**Lesiones tipo C**  
 Múltiples lesiones  $\geq 15$  cm de longitud total  
 Lesión recurrente que necesita tratamiento después de 2 intervenciones endovasculares



**Lesiones tipo D**  
 Oclusiones de la AFS o AFC  $> 20$  cm que incluyen la poplítea  
 Oclusión crónica de la poplítea que incluye la trifurcación de los vasos distales



### **1.1 Evolución natural de la isquemia crónica de miembros inferiores:**

La enfermedad oclusiva arterial de miembros inferiores (EAP), afecta a más de un 5% de la población mayor de 50 años [19] y presenta el siguiente espectro clínico: la enfermedad asintomática, la claudicación intermitente o la isquemia crítica. La claudicación muestra, generalmente, una evolución natural favorable si se establecen los tratamientos adecuados [8,19] entre los que se incluyen el ejercicio de rehabilitación supervisado basado en la deambulación continua del paciente, que permita valorar de manera objetiva la progresión de la distancia libre de claudicación, y el tratamiento médico y farmacológico de los factores de riesgo vascular.

En los pacientes con EAP sintomática (Claudicación intermitente), el ejercicio supervisado ha demostrado una mejoría en términos de distancia libre de claudicación [8,18]. El ejercicio supervisado se basa en sesiones controladas de duración inicial de 30 minutos hasta 1 hora en las fases más avanzadas debiendo realizarse un mínimo de 3 veces por semana. La sesión supervisada consta de un test de esfuerzo en cinta “sin fin” a una velocidad y grado de inclinación que induzca la claudicación al cabo de 5 minutos (de acuerdo con los criterios de Strandness: velocidad de 3km/h, pendiente del 10% [20,21]). El paciente debe parar cuando el dolor isquémico sea considerado moderado, descansando hasta la desaparición de los síntomas, reiniciando un nuevo ciclo hasta la reaparición de la sintomatología. Este bucle será repetido en la sesión supervisada durante un mínimo de 35 minutos. En visitas sucesivas, la velocidad y el grado de inclinación se verán aumentadas si el paciente puede caminar sin claudicar durante más de 10 minutos. El beneficio de la rehabilitación ha sido ampliamente demostrado [8], con mejoras publicadas en la distancia de claudicación de más de 200 metros respecto a los controles[22].

El tratamiento farmacológico de la EAP debe incluir el uso de antiagregantes como prevención secundaria de eventos cardiovasculares, dada la coexistencia de enfermedad arterial en distintos territorios [8]. Si embargo no han demostrado cambios significativos en la distancia de claudicación. Dentro de los fármacos antiagregantes, el más ampliamente utilizado es el ácido acetilsalicílico (AAS), a dosis de 75-150 mg/día, por su mayor seguridad en términos de sangrado digestivo frente a dosis más altas [8]. Otros fármacos antiagregantes utilizados han sido las tienopiridinas. Inicialmente valorada por su mayor eficacia antitrombótica, la ticlopidina fue ampliamente utilizada, sin embargo las neutropenias asociadas a su uso han restringido su utilización, que es prácticamente anecdótica en la actualidad. Otro antiagregante, también derivado de las tienopiridinas, que ha sido utilizado como alternativa o en asociación con el AAS, es el Clopidogrel. Tras ser evaluado en el estudio CAPRIE [23], donde se comparó el uso de Clopidogrel frente a AAS en pacientes con enfermedades cardiovasculares conocidas, se concluyó que su uso reducía mejor el riesgo de accidente cerebrovascular, infarto de miocardio y muerte de etiología vascular, siendo este efecto más acentuado en el subgrupo de pacientes con EAP conocida [18].

La abstinencia del hábito tabáquico constituye la base del tratamiento médico de la EAP. Los efectos nocivos del tabaco se basan en las alteraciones del endotelio vascular, el metabolismo de las prostaglandinas, la función plaquetaria y el metabolismo lipídico [8,18]. Asimismo se ha visto una disminución en la capacidad de formación de nuevos vasos durante los procedimientos de reparación vascular [24]. El hábito tabáquico se relaciona con un mayor riesgo de progresión de EAP, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y muerte [18].

El tratamiento farmacológico de la hiperlipemia se basa en el uso de las estatinas [18], no solo por sus efectos estabilizadores de la placa de ateroma, sino también por los

denominados efectos pleotrópicos. Inicialmente indicadas para el tratamiento de la hipercolesterolemia pura, vieron incrementadas sus indicaciones con la aparición de las primeras publicaciones donde se informaba del incremento de la distancia de claudicación en aquellos pacientes con arteriopatía periférica, tratados mediante la asociación de estatina, hemorreológico y antiagregante convencional [25]. Asimismo, se ha comprobado un efecto de estabilización de la placa de ateroma en aquellos pacientes tributarios de procedimientos revascularizadores, recomendando el tratamiento pre y postoperatorio independientemente de los niveles plasmáticos de colesterol [26, 27].

El control glucémico de los pacientes diabéticos es fundamental para evitar las complicaciones asociadas con la enfermedad. La diabetes se asocia a neuropatía periférica y a inmunodepresión, que aumenta el riesgo de úlceras plantares e infecciones del pie [8]. Y aunque se recomienda que los niveles de hemoglobina glicada sean lo más próximos a 6%, todavía no se ha demostrado que el control estricto de la enfermedad diabética consiga evitar el desarrollo de EAP y prevenir la incidencia de amputación de extremidad [8, 18].

Respecto a la hipertensión, se sabe que es un factor de riesgo para EAP, sin embargo, su control eficaz no altera la progresión de la enfermedad [8] pero sí ejerce un efecto cardioprotector. Entre los fármacos utilizados, los diuréticos tiazídicos y los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) deberán ser considerados como fármacos de primera línea [18]. Por otra parte, los betabloqueantes, no están contraindicados en el tratamiento de la hipertensión arterial en los pacientes con EAP.

Por último, la hiperhomocisteinemia se ha asociado con mayor frecuencia en pacientes con EAP, en comparación con la población normal [8], y se asocia a un aumento de la proliferación de la célula muscular lisa, acelerando el proceso de aterosclerosis. Sin

embargo, no se ha demostrado que la normalización de la homocisteína sérica, mediante suplementos de vitamina B o folatos, estabilice la progresión de la enfermedad [18].

Otros tratamientos farmacológicos utilizados en la EAP sintomática son los denominados hemorreológicos, cuya función es disminuir la viscosidad sanguínea al aumentar la flexibilidad de la pared de los hematíes. De entre todos ellos, la pentoxifilina ha sido el fármaco más ampliamente utilizado, al ser el primero aprobado por la FDA americana (Food and Drug Administration) como tratamiento eficaz de claudicación intermitente [18]. Sin embargo, hoy en día su eficacia es cuestionada [8]. El Cilostazol es un inhibidor de la fosfodiesterasa III que presenta efecto antiagregante, hemorreológico y vasodilatador. A pesar de sus posibles efectos adversos, que incluyen diarreas, palpitaciones y cefaleas, su uso se asocia con un aumento de la distancia de claudicación y mejoría de la calidad de vida, avalado por distintos metanálisis donde se ha comparado el uso de Cilostazol frente a Pentoxifilina [8,18]. Otros fármacos como el Buflomedilo (Alfa 1-2 adrenolítico) o el Nafthidrofurilo (antagonista serotoninérgico), han mostrado resultados similares al Cilostazol, al mejorar el metabolismo muscular e inhibir la agregación eritrocitaria y plaquetaria.

Alrededor de un 25 % de los pacientes con claudicación intermitente presentan una progresión de los síntomas con el tiempo siendo necesaria la revascularización de la extremidad, sobre todo si el índice de presión arterial tobillo-brazo (ITB) es bajo, y se asocia a la presencia de lesiones tróficas que no curan y/o dolor crónico de la extremidad [1, 19]. Casi todos los trabajos publicados sobre prevalencia de EAP hacen referencia a estudios basados en población anglosajona siendo muy escasos los estudios realizados en nuestro país [28-31]. Entre los primeros realizados sobre la prevalencia de la enfermedad en el territorio español destaca el publicado en el año 2006 por Puras y colaboradores [28, 30], en el que tras la medición del índice tobillo-brazo en pacientes

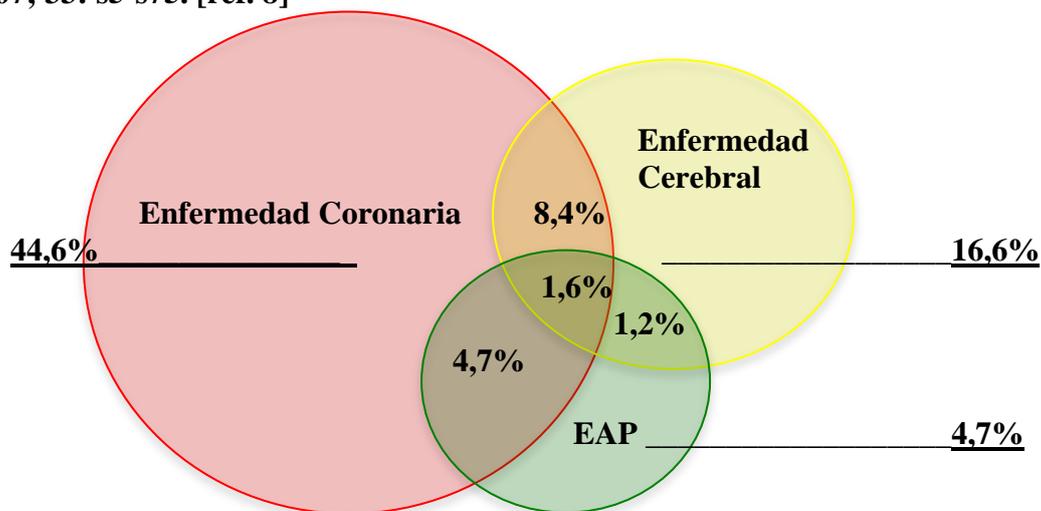
de distintos centros de atención primaria, se objetivó que la prevalencia de la EAP era superior al 20 % en pacientes mayores de 50 años. Si bien no se han realizado estudios de prevalencia de isquemia crítica de miembros inferiores (ICMI) en nuestra población, la incidencia estimada de ICMI es, aproximadamente, un paciente por cada 100 diagnosticado de Enfermedad Arterial Periférica [31].

La isquemia crítica de miembros inferiores es el estadio terminal de la enfermedad arterial oclusiva, con una incidencia estimada de 30 pacientes por 100.000 habitantes/año [19]. Tiene una importante repercusión en la calidad de vida del paciente y sus familiares, a causa de la gravedad de los síntomas y de las posibles complicaciones asociadas, entre las que se incluyen manifestaciones isquémicas de territorios tan diversos como el cerebral, cardíaco, renal y gastrointestinal, que pueden suponer el exitus del paciente. En el 20-30% de los casos de isquemia crítica, no existe posibilidad de tratamiento revascularizador [1], por las características de las lesiones o porque ya han sido agotadas las distintas opciones quirúrgicas, y el tratamiento farmacológico basado en el control del dolor constituye la principal terapia. Sin embargo, a pesar de las terapias analgésicas y el control de las lesiones tróficas, la amputación de la extremidad suele ser la única alternativa, con tasas anuales de pérdida de extremidad que varían entre un 70 y un 95 % [8-32].

La Isquemia Crítica de Miembros Inferiores (ICMI), se define como la manifestación clínica de la EAP en forma de dolor en reposo isquémico, persistente y recidivante, que exige analgesia con opiáceos; o pacientes que presentan lesiones isquémicas de la piel en forma de úlceras o gangrena [8]. Implica cronicidad, definida por la persistencia de los síntomas durante un periodo no inferior a 2 semanas. El diagnóstico de ICMI se completa con unos criterios hemodinámicos, definidos por una presión arterial sistólica en el tobillo menor de 50 mm Hg o una presión arterial sistólica en el dedo del pie

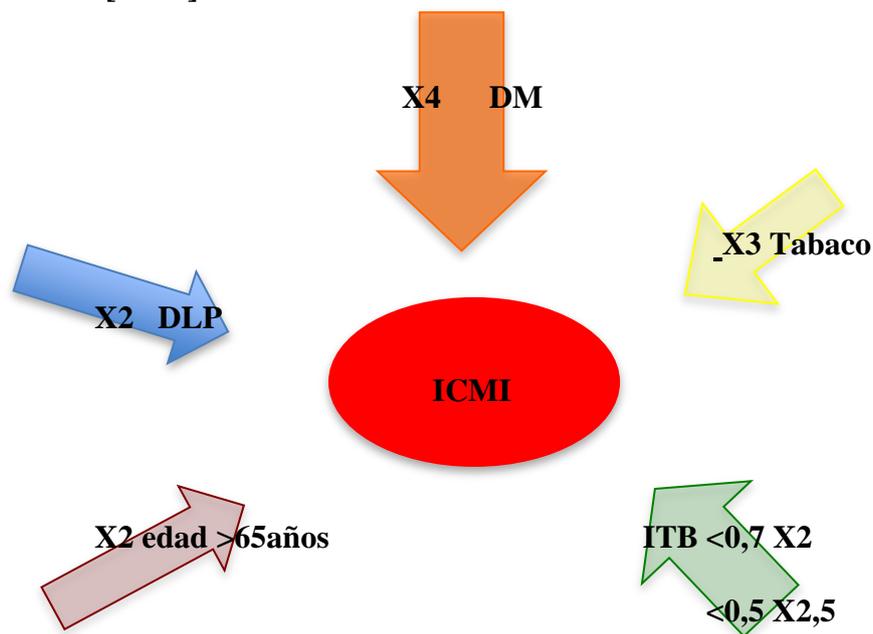
menor de 30 mm Hg. Si el paciente presenta lesiones isquémicas, los criterios hemodinámicos se vuelven más estrictos, confirmando el diagnóstico de ICMI con presiones maleolares inferiores a 70mmHg o digitales inferiores a 50 mmHg [8]. El diagnóstico de ICMI se corresponde con los estadios III-IV de Leriche-Fontaine y los grados 4,5 y 6 de Rutherford (tablas 1 y 2). La incidencia de ICMI no se conoce con certeza [1, 2, 8]. En muchos de los casos, la isquemia crítica progresa directamente desde un estadio asintomático a la presencia de dolor isquémico en reposo o gangrena [19]. Esto puede explicarse por las comorbilidades asociadas de los pacientes (artropatías, neuropatías, cirugías traumatológicas, demencias o encamamiento prolongado) que pueden causar confusión respecto al origen del dolor, y hacer que el diagnóstico de ICMI se establezca en fases avanzadas, donde las lesiones cutáneas están evolucionadas. El diagnóstico de ICMI supone un factor pronóstico de alto riesgo para la pérdida de extremidad y la aparición de complicaciones cardiovasculares con riesgo vital. De acuerdo con los estudios observacionales utilizados para la redacción del documento de consenso TASC II [8], aquellos pacientes que con diagnóstico de ICMI que no sean tributarios de cirugía de revascularización presentarán una mortalidad del 50% al año, debido a complicaciones derivadas de la afectación de otros territorios arteriales, o a complicaciones derivadas de las lesiones de la extremidad afectada.

**Figura 6: solapamiento de la afectación de los distintos territorios afectados por enfermedad vascular. Tomado de: Norgren L et al. Eur J Vasc Endovasc Surg 2007; 33: s5-s75. [ref. 8]**



Por lo tanto, aquellos pacientes con diagnóstico de ICMI no sólo deberán ver modificados los factores de riesgo vascular, asociando al tratamiento el uso de medicación antiagregante [1, 2, 8, 19], sino que deberán ser sometidos a cirugía de revascularización temprana con el fin de evitar la pérdida de la extremidad. Los principales factores de riesgo para el desarrollo de la ICMI son la edad, el tabaco y la diabetes [18], y de todos, la diabetes sigue siendo el factor pronóstico más importante implicado en la pérdida de la extremidad. La amputación puede ser hasta 10 veces más frecuente en pacientes diabéticos que en los no diabéticos con el mismo patrón de enfermedad, independientemente del hábito tabáquico y la edad del paciente. Pero si un paciente diabético tiene hábito tabáquico, requerirá de amputación mayor antes que un diabético no fumador [18, 33, 34].

**Figura 7: Efecto de los factores de riesgo en el desarrollo de Isquemia Crítica de Miembros Inferiores (ICMI). Abreviaturas: DLP (dislipemia), DM (diabetes), ITB (Índice Tobillo-Brazo). Tomado de: Norgren L et al. Eur J Vasc Endovasc Surg 2007; 33: s5-s75. [ref. 8]**



Los objetivos del tratamiento de la ICMI son [8]:

- eliminar el dolor en reposo, conseguir la curación de las heridas, y evitar la pérdida de la extremidad.
- mejorar la funcionalidad y la calidad de vida del paciente.
- prolongar la supervivencia.

El tratamiento de la ICMI se basa en los siguientes puntos:

- Control del dolor: es fundamental conseguir un correcto control del dolor para mejorar la calidad de vida de los pacientes. El tratamiento analgésico permitirá controlar los síntomas hasta la realización de la cirugía de revascularización. En aquellos pacientes que no sean tributarios de cirugía de revascularización, puede ser necesario el bloqueo epidural hasta la realización de cirugía de amputación mayor.

- Cirugía de revascularización: el tipo de técnica de revascularización dependerá de la condición general del paciente, de la longitud y localización del territorio vascular afectado, y de la extensión de las lesiones cutáneas asociadas. De acuerdo con las recomendaciones TASC II [8], las lesiones A y B son tributarias de tratamiento endovascular, mientras que las lesiones C y D son tributarias de tratamiento quirúrgico abierto. Sin embargo, la individualización de los pacientes es la base del éxito del procedimiento. Existe mucha bibliografía respecto a tipo de tratamiento revascularizador que debe indicarse en el tratamiento de la isquemia crítica de miembros inferiores. En el año 2005, se publicaron los resultados del estudio BASIL [35], ensayo con intención de tratar, multicéntrico y aleatorizado, donde se comparaba el tratamiento endovascular (angioplastia) frente al vascular convencional (bypass) de la isquemia crítica de miembros inferiores. Se incluyeron 452 pacientes durante un periodo de seguimiento de 2 años. El objetivo primario del estudio fue valorar la tasa de supervivencia libre de amputación. Los objetivos secundarios fueron mortalidad de cualquier causa, morbimortalidad a los 30 días del procedimiento, mejora de la calidad de vida mediante cuestionario validado, y necesidad de reintervención y/o reingreso. Al final del seguimiento, el 55% de los pacientes tratados estaban vivos sin amputación de la extremidad revascularizada, un 8% sufrió amputación de la extremidad, un 8% había fallecido tras la amputación, y un 29% había fallecido sin amputación de la extremidad. En el análisis por grupos, se objetivó un mayor fracaso inmediato de los procedimientos endovasculares (20%) frente a la revascularización mediante bypass (3%). A 6 meses no se apreciaron diferencias entre grupos en cuanto a tasa de supervivencia libre de amputación. La morbilidad asociada al procedimiento, con necesidad de reingreso en el hospital, fue mayor en el grupo de pacientes tratados mediante bypass (53%) que en el grupo de pacientes tratados mediante angioplastia (41%), siendo las causas más

frecuentes de morbilidad las complicaciones de herida quirúrgica, infecciones y complicaciones cardiovasculares. No se apreciaron diferencias en los resultados de los cuestionarios de calidad de vida entre ambos grupos, y tampoco hubo diferencias en cuanto mortalidad a 30 días. Durante el primer año, los costes hospitalarios relacionados con el procedimiento, fueron mayores en el grupo de pacientes tratados mediante bypass; Sin embargo, a los 2 años, la cirugía de bypass se asoció con una reducción significativa del riesgo de amputación y muerte (independientes o asociadas). Con posterioridad, se han publicado resultados con mayor número de pacientes y seguimientos más prolongados [36-38], recomendando la cirugía endovascular como primera línea de tratamiento para aquellos pacientes con supervivencias estimadas inferiores a 2 años y alto riesgo quirúrgico asociado a su comorbilidad, reservando el tratamiento quirúrgico convencional (bypass) para aquellos pacientes con pronóstico estimado de vida superior a 2 años.

En el tratamiento endovascular, la permeabilidad de los procedimientos realizados dependerá de: [39]

1. Las propiedades mecánicas del material utilizado
2. La extensión de la lesión en el vaso a tratar
3. Las características de la placa
4. Del número de vasos de salida distal permeables
5. Del número de stents necesarios para tratar la lesión
6. Del solapamiento entre stents
7. Del control de los factores de riesgo vascular y su tratamiento farmacológico.

Entre los factores pronósticos de permeabilidad de la cirugía derivativa de bypass, destacan [40]:

1. Naturaleza del conducto elegido (autólogos, homoinjertos, protésicos)
2. Longitud del bypass
3. Tamaño del vaso receptor
4. Número de vasos de salida distales a la derivación

La necesidad de revascularización de los pacientes con isquemia crónica de miembros inferiores, vendrá determinada por el grado de severidad de los síntomas, que a su vez dependerá de la capacidad del organismo para desarrollar vasos colaterales. Esta circulación colateral, o neovascularización, será la responsable de mantener la viabilidad de las áreas isquémicas dependientes del territorio vascular obstruido. La capacidad de neovascularización del sujeto afecto por un proceso aterosclerótico será el que determinará la severidad de los síntomas, y por lo tanto influirá en la indicación de tratamiento revascularizador.

### **1.2 Procesos implicados en la formación de nuevos vasos**

El término angiogénesis, hace referencia al proceso fisiológico por el cual se forman nuevos vasos a partir de un lecho vascular ya existente, con el fin de satisfacer las necesidades de nutrición de los tejidos que se están desarrollando activamente. Esto ocurre tanto en procesos fisiológicos (desarrollo embrionario, cicatrización tisular, procesos inflamatorios), como en procesos patológicos (crecimiento tumoral). En todos ellos, el proceso angiogénico ocurre como un proceso regulado y transitorio. El estudio de la angiogénesis y de los mecanismos que intervienen en su regulación puede contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, bien sea mediante su inhibición, como es el caso de enfermedades en las que esté implicada una angiogénesis

mantenida y persistente (cáncer), como mediante su estimulación en el tratamiento de patologías asociadas a un proceso isquémico (necrosis o infarto). En este último caso hablamos de la angiogénesis terapéutica.

La formación de una red vascular estructurada y madura se produce a través de tres procesos biológicos [41-49]: Angiogénesis, Vasculogénesis y Arteriogénesis (Figuras 8 y 9).

- La Angiogénesis se define como el crecimiento de nuevos vasos a partir de una red capilar pre-existente. Este proceso se desencadena a través de la activación de las células endoteliales locales.

- La Vasculogénesis se define por la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de progenitores celulares angioblásticos que, tras ser movilizados desde distintas localizaciones, se diferencian “in situ” hacia células con fenotipo endotelial formando estructuras tubulares.

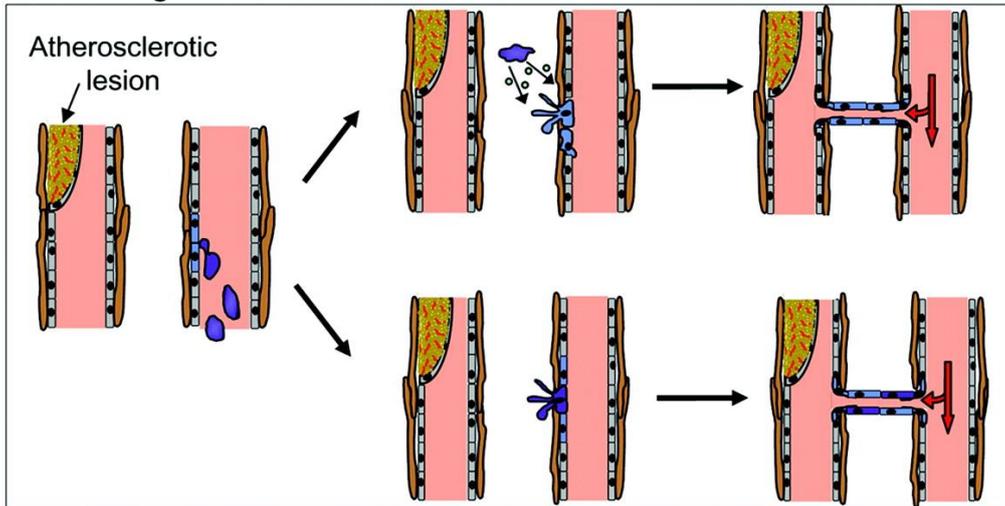
- La Arteriogénesis se define por la maduración de las nuevas estructuras creadas mediante el reclutamiento de células musculares lisas perivasculares (pericitos), que determinarán un incremento en el grosor del vaso, dotándolo de funcionalidad y resistencia a la presión intraluminal.

Angiogénesis y Vasculogénesis son dos procesos relacionados, con distintas implicaciones según la fase evolutiva en la que nos encontremos. Mientras que la Vasculogénesis, clásicamente se ha relacionado con el proceso de desarrollo embrionario, la Angiogénesis se ha relacionado con los procesos de reparación tisular y crecimiento tumoral en los tejidos adultos [50-53]. Sin embargo, y como se comentará en el punto 1.3 (*Nuevos tratamientos en la enfermedad arterial periférica oclusiva no revascularizable: angiogénesis terapéutica*), diversos estudios han demostrado la existencia de los dos procesos en el adulto. Esto es necesario para entender los

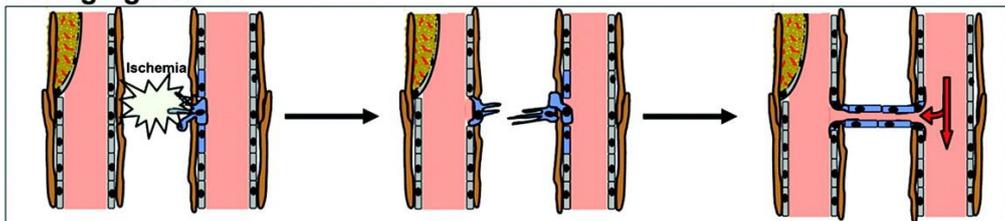
procedimientos de neovascularización adulta en los procesos de cicatrización de los tejidos, y durante los procesos de isquemia tisular.

**Figura 8: procesos implicados en neovascularización. Tomado de: Van Oostrom et al. J Leukoc Biol 2008; 84: 1379-1391. Abreviaturas: Célula Endotelial (EC), Pericito (PC), Célula Progenitora Endotelial (EPC)**

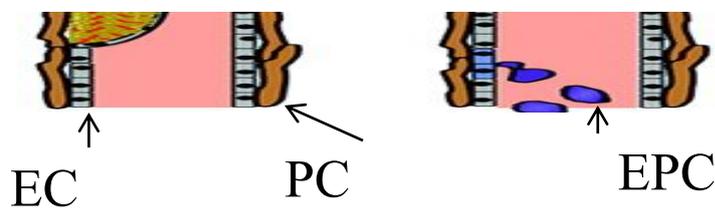
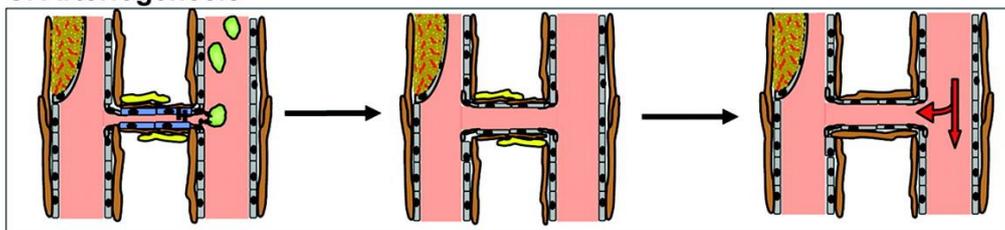
**A. Vasculogenesis**



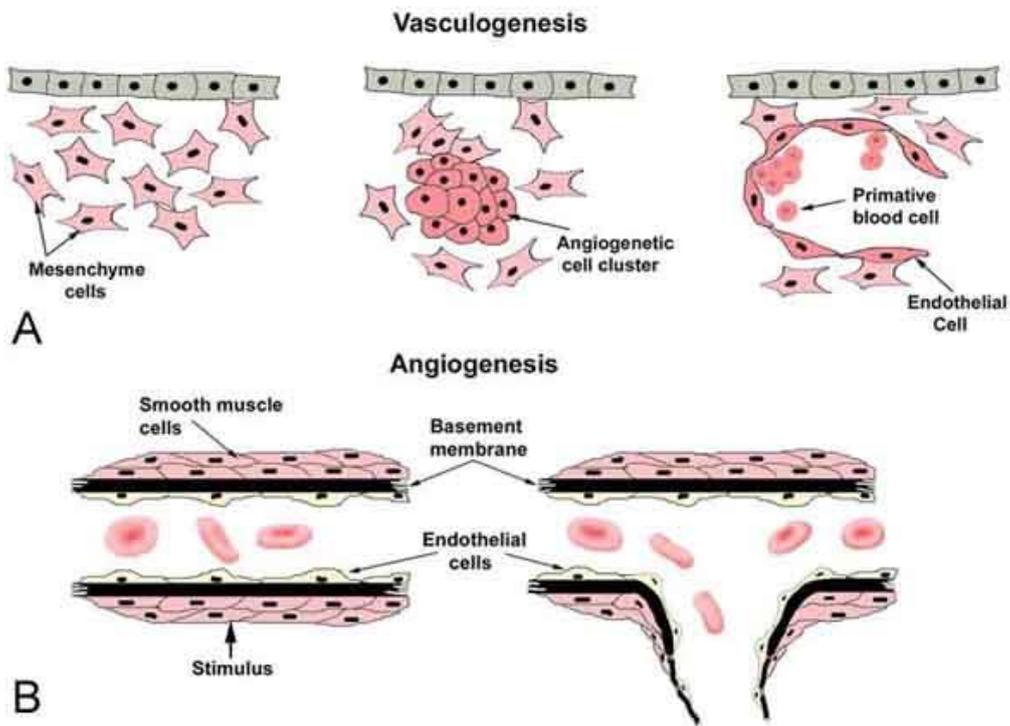
**B. Angiogenesis**



**C. Arteriogenesis**



**Figura 9: procesos implicados en neovascularización. Tomado de: Chinoy MR. Front Biosci 2003; 8: 392-415 [ref. 48]**



Existen seis pasos básicos en la Angiogénesis [54]:

1. Vasodilatación de los vasos preexistentes, reduciendo el contacto entre células endoteliales adyacentes.
2. Degradación de la membrana basal del vaso matriz a través de la secreción y activación de una amplia gama de enzimas proteolíticas.
3. Migración y proliferación de las células endoteliales que formarán una nueva estructura cordonal que constituirá la estructura vascular incipiente (capilar).
4. Formación de la luz del capilar y estructuración en forma de tubo.
5. Síntesis de la membrana basal
6. Reclutamiento de células musculares lisas ( pericitos )

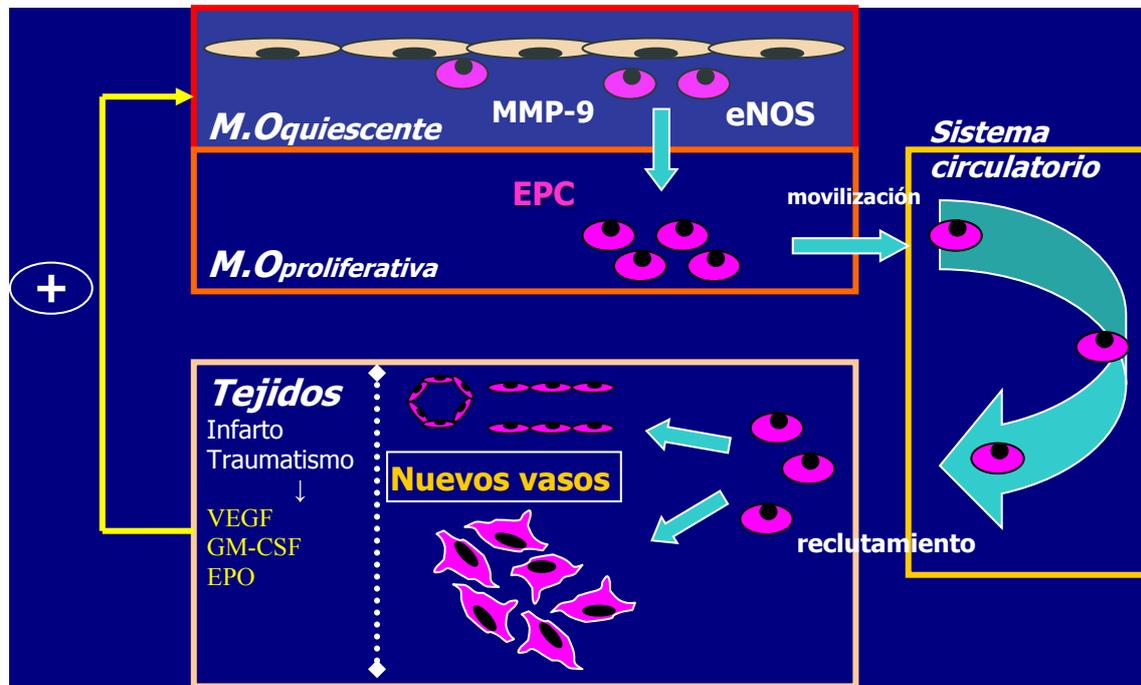
Por otra parte, el proceso vasculogénico se puede dividir en 5 pasos consecutivos [55]:

1. Las células endoteliales se diferencian a partir de células precursoras denominadas angioblastos.
2. Las células endoteliales, forman los vasos incipientes, constituidos por agregados celulares, que no tiene lumen.
3. Un tubo endotelial se constituye a través de células endoteliales, mediante un proceso de vacuolización.
4. Una red vascular capilar se forma a través de la asociación de múltiples estructuras tubulares nacientes.
5. Se produce el reclutamiento de los pericitos que dan capacidad funcional a los vasos.

La formación de una red vascular normofuncionante se entiende como un proceso dinámico, en el que intervienen distintos tipos celulares y múltiples factores reguladores [49, 56]. El principal estímulo para el proceso de neovascularización es la isquemia tisular [57-61]. Esta señal determina la activación de las células endoteliales residentes en el tejido isquémico, lo que se traduce en la producción de diferentes proteínas (citoquinas) que actúan como señales de activación para las células progenitoras de la médula ósea. Tras esta activación, se produce un proceso de maduración celular y liberación a sangre periférica, desde donde son movilizadas hacia los territorios isquémicos, donde son alojadas pudiendo formar parte del proceso de neovascularización de dos maneras: a) formando nuevos vasos tras diferenciación "in situ" o, b) formando parte del estroma celular encargado de dar soporte madurativo al proceso de neovascularización, mediante la secreción de distintos factores de crecimiento. Es esencial entender que todos estos mecanismos están interrelacionados

para poder formar nuevos vasos, tanto a nivel miocárdico, como en las extremidades [41-43, 49, 62-64]. (Figura 10)

**Figura 10: mecanismos de activación y movilización de progenitores endoteliales.** Tomado y adaptado de : Zammaretti et al. *Int J Biochem Biol* 2005; 37: 493-503 [ref. 64]



MO : médula ósea; MMP : metaloproteinasas; eNOS: óxido nítrico; EPC: célula progenitora endotelial; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial; GM-CSF: factor estimulante de crecimiento granulo-monocitario ; EPO : eritropoyetina

### **1.3 Nuevos tratamientos en la enfermedad arterial periférica oclusiva no revascularizable: angiogénesis terapéutica**

La formación de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización), es un mecanismo de adaptación fisiológica a la situación de isquemia tisular [1, 19]. En los pacientes en situación de isquemia crónica, la capacidad de desarrollo de circulación colateral influirá en la severidad de los síntomas. Clásicamente, la angiogénesis se creía el único medio de neovascularización adulta, mientras que la vasculogénesis era interpretado como un proceso exclusivo del desarrollo embrionario. Sin embargo, el descubrimiento de las células progenitoras endoteliales (CPE) en la médula ósea del adulto, supuso la demostración de que la vasculogénesis también era posible en tejidos adultos [42, 44, 46, 49, 51].

Distintas investigaciones han establecido que es posible utilizar factores de crecimiento, o células con capacidad de diferenciación endotelial, para aumentar el desarrollo de vasos colaterales en los tejidos isquémicos. Sin embargo, la forma de aplicar el tratamiento (Transferencia Génica, Terapia Recombinante mediante implante de Factores de Crecimiento, o Terapia Celular), la dosis, la posología y la vía de administración, para una máxima eficacia junto a un rango de seguridad óptimo, están todavía por determinar. Existen muchos factores implicados en este proceso, lo que demuestra que los mecanismos de regulación son complejos. [49, 65]

Los factores de crecimiento están implicados en todas las fases de la angiogénesis, y quizá por ello fueron los que inicialmente se estudiaron para su posible aplicación clínica [1] (Tabla 4). El proceso de neovascularización está regulado por factores proangiogénicos y antiangiogénicos, que pueden coexistir en el mismo tejido, y que pueden encontrarse en la circulación sistémica, o actuar como factores paracrinos [66]

**Tabla 4: Factores reguladores de la Angiogénesis. Tomado de: Mauriz JL et al. Tratamiento antiangiogénico del Cáncer. Cir. Esp 2005; 78(1): 3-11 [ref. 66]**

Factores proangiogénicos		Factores antiangiogénicos	
Factor	Función biológica	Factor	Función biológica
VEGF	↑ permeabilidad, ↑ activadores del plasminógeno, ↑ colagenasas intersticiales, proliferación y migración de las CE, ↓ apoptosis CE	Angiostatina	↓ proliferación y migración CE, ↓ formación tubo vascular, ↑ apoptosis CE
FGF	↑ proliferación y migración de las CE, ↑ activadores del plasminógeno, ↑ integrinas $\alpha, \beta_3$ y otras moléculas de adhesión	Endostatina	↓ proliferación y migración CE, ↑ apoptosis CE
Ang-1	Formación de los brotes vasculares y estabilización de los vasos	Ang-2	Desestabilización de los vasos, ↑ apoptosis CE
Ang-2	↑ proliferación y migración de las CE, formación de los brotes vasculares en presencia del VEGF	TGF $\beta$	↓ proliferación y migración CE, ↓ activadores del plasminógeno, ↑ TIMP, ↑ apoptosis CE
PDGF	Estabilización de los vasos	TNF $\alpha$	Inhibición de la proliferación de la CE inducida por el FGF, ↑ apoptosis CE
TGF $\beta$	Estabilización de los vasos	TSP-1 y TSP-2	↓ migración y ↑ apoptosis CE
TNF $\alpha$	Migración CE	MMP	Generación de angiostatina
EGF	Proliferación CE	PEDF	↓ proliferación, migración CE
CSFs	Proliferación y migración CE		
Angiogenina	Proliferación CE		
Angiotropina	Migración CE, formación del tubo		
IGF-1	Proliferación CE, ↓ apoptosis CE, inducción del VEGF, ↑ activadores del plasminógeno		
HGF	Proliferación y migración CE		
PECAM-1	Agregación CE, formación tubo, migración CE, estabilización tubo, angiogénesis inducida por FGF		
Integrinas	Adhesión CE, migración CE, ↓ apoptosis CE, angiogénesis inducida por FGF		
Óxido nítrico	↑ permeabilidad, proliferación CE, liberación FGF		

MMP: degradación de la matriz extracelular; MEC: matriz extracelular; FGF: factores de crecimiento de fibroblastos; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; CE: célula endotelial.

Entre los factores proangiogénicos, se distinguen: factores específicos (liberados por numerosos tipos celulares, que se unen de manera específica a receptores endoteliales), y factores inespecíficos (que se unen no solo a receptores endoteliales, sino a otros tipos celulares). De entre los específicos, destaca el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (en inglés, VEGF), y entre los inespecíficos, destaca el Factor de Crecimiento Fibroblástico (en inglés, FGF) [66].

Del VEGF se han descrito más de 5 isoformas, con distintas funciones y propiedades [67] (tabla 5), y al menos tres receptores: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1), VEGFR-3 (KDR/Flt-1). Los receptores Flt-1 y KDR, se expresan en las células endoteliales. La unión del VEGF a sus receptores endoteliales determina la vasodilatación inicial mediada por óxido nítrico y aumenta la permeabilidad endotelial, estimulando la proliferación y migración de nuevas células endoteliales y disminuyendo la apoptosis celular [66].

**Tabla 5: isoformas del VEGF. Tomado de: Khosravi Shahi P et al. Angiogénesis Neoplásica. An. Med. Interna (Madrid) 2008; 25: 366-369 [ref. 67]**

<i>Subtipo de VEGF</i>	<i>Mecanismo de acción</i>
VEGF-A	Angiogénesis tumoral y fisiológica
VEGF-B	Vasculogénesis y activación de enzimas invasivas en células endoteliales
VEGF-C	Linfangiogénesis y angiogénesis tumoral
VEGF-D	Angiogénesis
VEGF-E	Mitosis de células endoteliales y angiogénesis

El VEGF presenta una serie de cualidades muy útiles a la hora de realizar transferencia génica [68]. Presenta secuencia de señal secretora, lo que le permite que sea secretada por células no dañadas, determinando efectos paracrinos adicionales durante el periodo de angiogénesis. Sus receptores son exclusivos para las células endoteliales y son de alta afinidad, lo que hace que sus efectos mitóticos se vean limitados a las células endoteliales. Por otra parte ejerce una función autocrina, al modular el comportamiento de las células endoteliales en condiciones de hipoxia tisular, amplificando y prolongando la respuesta de las células endoteliales activadas por el VEGF administrado exógenamente. Por otra parte, los miocitos de los tejidos hipóxicos favorecen la expresión de receptores del VEGF en las células endoteliales de los tejidos isquémicos, lo que justifica que la angiogénesis no se produzca de manera indiscriminada. Por último, el VEGF favorece el aumento de las EPC circulantes [68].

El Factor de Crecimiento Fibroblástico, (en inglés, FGF), es uno de los factores de crecimiento no específicos, que son liberados cuando se produce daño o muerte celular. Están descritas 9 isoformas, y aunque ejercen capacidad mitógena sobre las células endoteliales, no son específicas de las células endoteliales y sirven como ligandos a otros tipos celulares, como son pericitos y fibroblastos. Se han descrito al menos 4 receptores de alta afinidad para el FGF, y al igual que el VEGF, activan la síntesis de

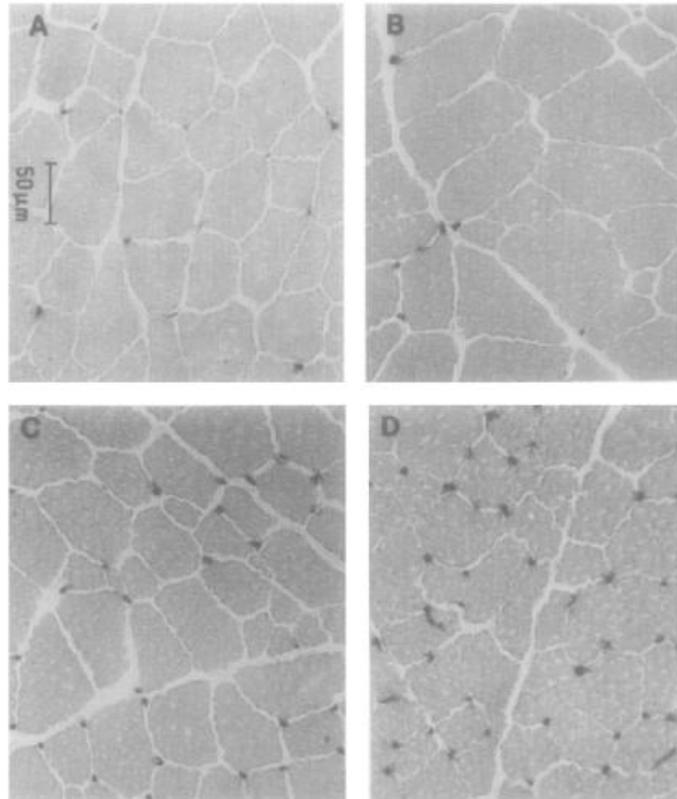
proteasas de las células endoteliales, incluidas las metaloproteinasas (MMP), importantes en la degradación de la matriz extracelular durante el proceso de angiogénesis. Sin embargo, y a diferencia del VEGF, no todas las formas de FGF tienen secuencia de señal que active la secreción de esta proteína, por lo que en los ensayos clínicos de transferencia génica han sido requeridos modificaciones del gen o bien el uso de otras familias que tengan secuencia de señal. [68]

Distintos trabajos han demostrado que la administración de factores de crecimiento en forma de proteínas recombinantes aumenta la formación de nuevos vasos, aunque en la mayoría de los casos este efecto viene determinado por una eficacia dosis-dependiente [68]. El hecho de poder administrar los factores de crecimiento, de manera directa en forma de proteína recombinante, ha hecho que algunos investigadores consideren esta técnica como la más próxima a ser utilizada en la práctica [68]. Las principales ventajas de su uso son la facilidad de administración, y la posibilidad de administrar dosis precisas [69-72]. Los primeros estudios realizados in vitro, sobre modelos animales, demostraron la capacidad de mejoría de la perfusión tisular tras la administración de VEGF. En el estudio publicado por Bauters y colaboradores [73] se realizó infusión intravenosa directa de VEGF en modelos de isquemia de extremidad sobre roedores, a los que se les practicaba ligadura de arteria ilíaca externa. Fueron estudiados 41 roedores divididos en tres grupos: grupo control, grupo VEGF y grupo VEGF + heparina. Tras la administración de VEGF (sola y en combinación con heparina), se apreció aumento de la vascularización tisular objetivada por biopsia, arteriografía y doppler, en comparación con los individuos del grupo control, lo que demostraba la eficiencia del tratamiento y su facilidad de administración. (Figuras 11 y 12)

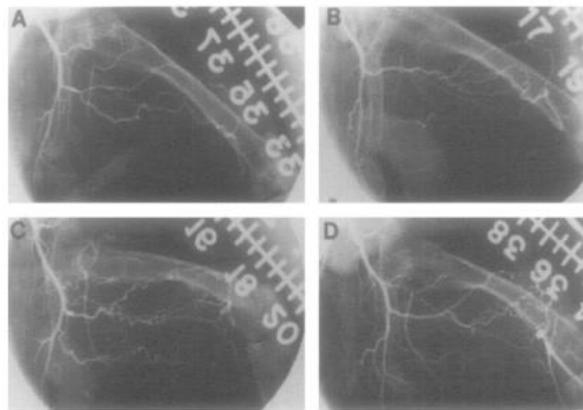
**Figuras 11 y 12: estudios en modelo animal de Terapia Recombinante. Tomado de: Bauters C, et al. J Vasc Surg 1995; 21: 315-325 [ref. 73]**

Figura 11: Biopsias en animal control (A), animal tratado con heparina (B), en animal tratado con VEGF (C), y en animal tratado con VEGF+heparina (D). Los puntos representan capilares detectados por tinción eosinofílica.

Figura 12: angiografía realizada a los 30 días en animal control (A), tratado con heparina (B), tratado con VEGF (C), y tratado con VEGF+heparina (D)



11



12

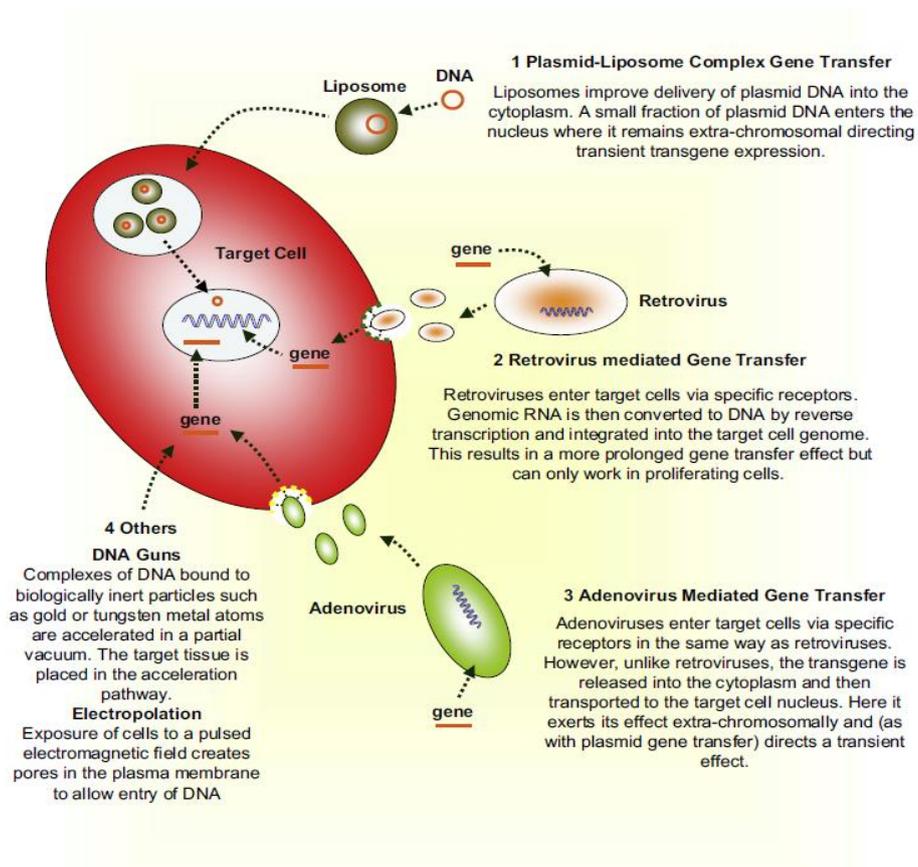
Tras los resultados de los primeros estudios en modelos animales, se iniciaron los estudios en humanos. La mayoría están referidos a pacientes con claudicación intermitente, y son pocos los trabajos referidos a la isquemia crítica. El estudio TRAFFIC [74] es un estudio doble ciego, casos-control (placebo), realizado sobre una población de 190 individuos con claudicación intermitente, a los que se les administraron dosis intra-arteriales de Factor recombinante de Crecimiento Fibroblástico 2 ( rFGF-2 ). Los pacientes fueron aleatorizados en 2 grupos: dosis única, y doble dosis (la segunda dosis, administrada a los 30 días de la primera). Los resultados se evaluaron mediante test de Strandness (claudicometría), apreciando una mejoría en la distancia de claudicación en todos los pacientes sometidos a estudio (incluidos los del grupo control), sin que las diferencias halladas tuvieran significación estadística. Estos resultados hicieron concluir a los autores que, el control estricto de los factores de riesgo vascular (hipertensión, dislipemia, diabetes y tabaquismo) y el ejercicio físico guiado conseguía controlar la evolución de la enfermedad y mejorar la clínica del paciente, por lo que no se podía afirmar que el tratamiento con terapia recombinante aportara mejoras respecto al tratamiento médico convencional [8,22].

Resultados similares se han obtenido con otros estudios [69-71], lo que ha hecho que las investigaciones con terapia proteica hayan disminuido en los últimos años, a pesar de sus potenciales ventajas prácticas. La formación de una red capilar es un proceso demasiado complejo como para ser estimulado mediante la administración de un único factor [1]. Además, hay que tener en cuenta que esta terapia puede presentar una serie de inconvenientes como son: alto coste en la producción farmacológica de las proteínas recombinantes, efecto fugaz por la corta vida media de la molécula y, por tanto, necesidad de altas concentraciones plasmáticas, para alcanzar la captación tisular adecuada, lo que puede limitar su uso por los potenciales efectos adversos derivados de

las altas dosis sistémicas [68]. También hay que tener en cuenta que, determinados factores de crecimiento son reguladores de la angiogénesis tumoral, por lo que existe un riesgo añadido de producir neoformaciones patológicas. Este hecho es posible, y difícil de excluir, aunque hasta el momento no se han comunicado complicaciones relacionadas con el desarrollo de tumores por el uso de estos factores [68]

Otra forma de aumentar la producción local de factores de crecimiento es mediante el uso de la Terapia Génica. La transferencia génica es la introducción de material genético dentro de las células de un organismo, con el objetivo de alcanzar altos niveles de una expresión génica sostenida sin provocar reacciones adversas en el huésped [68]. En este proceso, el gen que expresa un determinado factor de crecimiento es aislado en forma de plásmido (ADN libre) o es insertado en la secuencia genética de un vector viral (adenovirus o retrovirus). Esta secuencia génica es introducida en el tejido isquémico del paciente mediante aplicación intramuscular o inyección intra-arterial, integrándose en el ADN del individuo y expresando el factor de crecimiento en cuestión [59]. El éxito de la técnica depende tanto de la eficiencia con la que se introduce la secuencia génica, como de la duración de la expresión de esta secuencia en la población celular manipulada [75-77]. Los músculos cardíacos y estriados, captan y expresan ADN desnudo en forma de plásmido, así como transgenes incorporados en vectores virales. Y en aquellas situaciones de isquemia muscular, la transfección intramuscular está aumentada más de 5 veces [68] (figura 13)

**Figura 13: mecanismos de transferencia génica. Tomado de: Akhavani et al. Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery 2008 ; 61 : 1425-1437 [ref. 77]**



El primer estudio con Terapia Génica fue publicado por Isner et al, en 1998 [78]. En él, se realizaron inyecciones intramusculares en 6 pacientes con Enfermedad de Buerger, de vectores virales (adenovirus) que expresaban Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF). Se consiguió mejorar el dolor de reposo en 2 pacientes y curar las lesiones tróficas en 3. Existen otros estudios en los que se realiza la misma técnica, con resultados similares. En el año 2003, Shyu y colaboradores publicaron los resultados de un estudio realizado en 24 extremidades en situación de isquemia crítica [79]. La diferencia de este trabajo con respecto a otros, radicó en el uso de dos inyecciones intramusculares separadas por un intervalo de 4 semanas. El estudio reveló mejoría de la

situación clínica en el 83 % de los pacientes, y tan solo fue necesaria la amputación de la extremidad en 2 pacientes. Se apreció aumento en el índice tobillo-brazo, y desarrollo de circulación colateral a nivel de los estudios angiográficos. Estos resultados son opuestos a los publicados en el estudio RAVE [69, 80] (aleatorizado, multicéntrico, doble ciego, placebo-control) en el que se utilizó un vector viral para producir Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF). Un total de 105 pacientes con claudicación intermitente, fueron aleatorizados en tres grupos (placebo, dosis baja, y dosis alta) a los que se les administraba 20 inyecciones intramusculares en la pierna sintomática en una única sesión. Tras 3 meses de seguimiento no se apreciaron cambios en las claudicometrías de los tres grupos, sin que tampoco se hallasen diferencias en cuanto a mejoría de la situación basal de los pacientes. Esta variabilidad entre resultados de distintos trabajos, llevó a la conclusión de realizar estudios con mayor número de pacientes y plantear la utilización de ADN desnudo o plásmidos como herramientas para conseguir la transfección génica.

En el año 2008, fueron publicados los resultados del estudio TALISMAN [81]. Este fue un estudio fase II, multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, placebo-control, donde fueron incluidos 125 pacientes en situación de isquemia crítica, con lesiones tróficas no cicatrizadas (o gangrena), sin opciones de revascularización. A estos pacientes se les administró 4 dosis de Riferminogen, plásmido codificador de FGF1, (en adelante NV1FGF), en dosis de 4mg, a intervalos de dos semanas, y administrados por vía intramuscular. Los resultados publicados, indicaban una reducción del 46,3% del riesgo de amputación mayor ( $p=0,01$ ) y un 53% de reducción de la tasa combinada de amputación-exitus en comparación con los pacientes tratados con placebo, a los 12 meses de seguimiento [81, 82]. Con el fin de confirmar los resultados del estudio TALISMAN, se diseñó el estudio TAMARIS [83]. El estudio TAMARIS es un estudio

fase III multinacional, doble ciego, control-placebo, en el que se incluyeron pacientes con diagnóstico de isquemia crítica de miembros inferiores, de entre 171 hospitales de 30 países. La aleatorización fue realizada en relación 1:1, asignando al paciente al grupo de NV1FGF o al grupo placebo. Se administraron 4 sesiones de tratamiento con NV1FGF, separadas por un intervalo de 2 semanas. En cada sesión se administraron 8 inyecciones intramusculares de 0,5mg de NV1FGF, administradas en la musculatura isquémica. Todos los pacientes fueron controlados a las 2, 4 y 6 semanas de la implantación, y a los 3, 6, 9 y 12 meses del procedimiento. Los objetivos primarios fueron determinar la tasa de amputación mayor desde el inicio del tratamiento, y la tasa de mortalidad por cualquier causa, durante el periodo de estudio de los 12 meses. Fueron aleatorizados 525 pacientes, con una media de edad de 70 años. Los resultados obtenidos no demostraron evidencia de una mayor eficacia de la terapia génica frente a placebo. La tasa combinada de amputación mayor/exitus fue del 36% en el grupo tratado y del 33% en el grupo placebo (OR 1,11 IC95% 0,83-1,49; p=0,48). No se apreciaron diferencias en las tasas de amputación mayor (placebo 21% frente a NV1FGF 25%; OR 1,2 IC95% 0,84-1,72 p=0,31), ni en las tasas de exitus (placebo 15% frente a NV1FGF 17% ; OR 1,15 IC95% 0,75-1,76 p=0,53). No se documentaron efectos adversos significativos del tratamiento, a excepción de dolor o molestias inespecíficas de carácter osteomuscular a nivel de la pierna. Hasta el momento, el estudio TAMARIS es el que mayor número de pacientes aleatorizados ha presentado de todos los publicados, y los resultados contradictorios respecto a su predecesor (el estudio TALISMAN) ha hecho que se replantee la terapia génica como método para conseguir la formación de nuevos vasos [84].

Por otra parte, esta terapia no está exenta de riesgos. El uso de la terapia génica determina que no siempre la población inicialmente manipulada sea la única que

expresión del gen, debido a la posibilidad de transfección a otras poblaciones celulares. Esto conlleva un riesgo añadido de crecimiento tumoral o procesos autoinmunes, más frecuentes con el uso de vectores virales que con los plásmidos, por su menor incorporación al núcleo celular (inferior al 10%) [80]. También ha sido descrita la aparición de una respuesta inflamatoria sistémica frente al vector viral [68], con desarrollo de anticuerpos, lo que hace limitado su uso en caso de tratamientos repetidos. Por otra parte, hay que tener en cuenta que no se dispone de mecanismos para controlar la expresión de distintos factores de crecimiento mediante el uso de la terapia génica, puesto que una vez el vector transfiere la carga genética, ésta se incorpora al genoma de la célula huésped, lo que teóricamente determina una expresión indefinida del mismo. Por último, también se ha descrito una relación entre Terapia Génica y trombosis arterial, derivada de la hemorragia intraplaca producida por la neovascularización a nivel de la placa de ateroma. [65, 68].

En los últimos años, las nuevas vías de investigación se han centrado en el uso de la Terapia Celular. La Terapia Celular consiste en la administración de células con capacidad de diferenciación endotelial, con el objetivo de formar nuevas redes vasculares. Para ello, es necesario contar con células inmaduras, capaces de diferenciarse hacia células que tengan la capacidad de formar estructuras tubulares funcionales, que posteriormente determinen la formación de los nuevos vasos. Estas células inmaduras, es lo que se ha venido a llamar "células madre adultas" [85]. Hasta el descubrimiento de las "células madre adultas", se creía que el único tejido que poseía "células madre" era el tejido embrionario, con las limitaciones ético-legales que suponía su uso [85, 86]. Clásicamente se han reconocido 4 líneas celulares adultas con capacidad pluripotencial: células neuronales, células hematopoyéticas, células

epiteliales y células mesenquimales [56, 87-92]. La primera evidencia científica de la existencia de células pluripotenciales fue publicada en 1961, en referencia a las "células madre" hematopoyéticas, capaces de diferenciarse hacia cualquier forma celular madura presente en la sangre periférica [93]: eritrocitos, granulocitos, células mieloides y células linfoides. Desde entonces, multitud de trabajos han exhibido las capacidades pluripotenciales de multitud de células de distintos tejidos [93-103].

Los primeros trabajos publicados dentro del sistema cardiovascular, se realizaron en modelos cardiológicos [104]. En estos trabajos, los distintos autores apreciaron un aumento de la fracción de eyección, y una disminución del área de necrosis tisular (daño miocárdico), en pacientes que habían sufrido isquemia miocárdica y a los que se les administró inyecciones transendocárdicas o intracoronarias de células mononucleadas derivadas de médula ósea [104-108]. Estos resultados sugerían que la terapia celular ejercía un efecto de remodelación miocárdica, al disminuir el área isquémica mediante la formación de nuevos vasos y al disminuir el área de infarto tisular por la incorporación de células pluripotentes con capacidad de diferenciación en células musculares miocárdicas [105, 108].

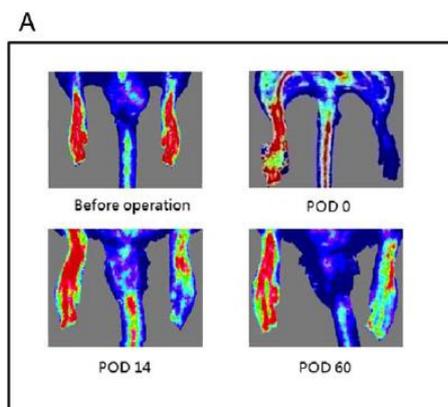
Las células troncales (*stem cells*) del adulto, son células con capacidad de diferenciación hacia células especializadas de distintos tejidos u órganos. La mayor concentración de éstas células está en la médula ósea, y se encuentran en fase de quiescencia, hasta que son activadas por distintos estímulos, momento en el cual se liberan a sangre periférica en forma de "células progenitoras", siendo reclutadas por aquellos tejidos que las necesiten. Su número y actividad descienden con la edad [109]. Las Células Progenitoras Endoteliales (CPE) son células con capacidad angioblástica y constituyen un pequeño subgrupo (menor al 0,05%) dentro de la población de células mononucleadas de la médula ósea. En pacientes sanos, el número de progenitores

endoteliales circulantes en sangre periférica es muy bajo, menor al 0,01%. [109]. Las CPE intervienen en la vasculogénesis y en la reparación del lecho vascular, evitando la hiperplasia fibromuscular y regulando el balance lipídico [110]. La liberación de estas células desde médula ósea a la circulación sistémica es un proceso inducible. Distintas señales endógenas (factor estimulante de colonias granulocitarias (G-CSF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), niveles de óxido nítrico (ON), metaloproteinasas (MMP) producidas por las células estromales...), y exógenas (traumatismos, toma de estatinas...) determinan la movilización de estos progenitores a sangre periférica como células inmaduras circulantes, desde donde pueden dirigirse a distintos tejidos para iniciar el proceso de vasculogénesis. Aquellas situaciones que produzcan elevación local de factores angiogénicos (isquemia transitoria o infarto tisular, traumatismos locales, procesos inflamatorios ...) activan la señal necesaria para que se recluten estas células, que una vez incorporadas en los tejidos comenzarán su diferenciación “in-situ” formando: 1) estructuras cordonales que tras un periodo de maduración constituirán una nueva red vascular, ó 2) células estromales que, integrándose en la matriz extracelular, sintetizarán nuevos factores de crecimiento que regularán el proceso de formación de la nueva red vascular [63, 64, 111] (Figura 10).

Los distintos estudios con terapia celular en animales han demostrado buenos resultados [104, 111-113]. La mayoría de ellos fueron realizados en roedores, a los que se les realizaba ligadura de arteria ilíaca con el fin de establecer un modelo de isquemia de extremidad. En el trabajo publicado por Yang y colaboradores [112] se apreció un aumento de la perfusión de la extremidad tras la infusión intramuscular de células mononucleadas. El incremento en la perfusión se objetivó por láser doppler y por los cortes histológicos de los tejidos (figuras 14 y 15).

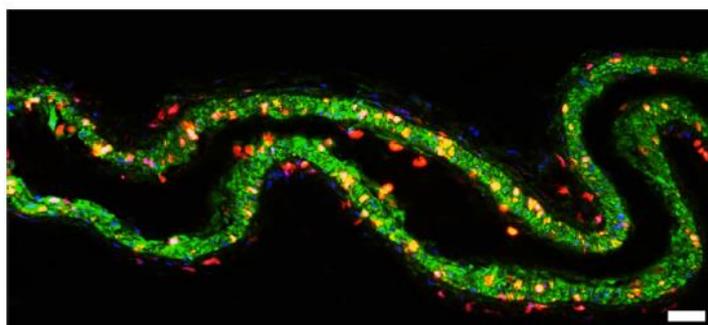
**Figura 14: estudios animales de terapia celular. Tomado de: Yang Z et al. Vascular Pharmacology 2009; 51: 268-274 [ref. 112]**

Figura 14: medición por láser doppler del incremento de la perfusión de la extremidad izquierda tras ligadura de arteria iliaca izquierda (POD 0), a los 14 días de la implantación (POD 14) y a los 60 días de la implantación (POD 60)



**Figura 15: estudios animales de terapia celular. Tomado de: Van Royen et al. J Am Coll Cardiol 2010; 55: 17-25 [ref. 104]**

Figura 15: estudio por microscopía confocal de vaso neoformado. En amarillo las zonas de proliferación celular endotelial. En verde las zonas de proliferación en células musculares lisas. La barra blanca corresponde a 20 micras.



Tras los resultados esperanzadores obtenidos en modelos animales, aparecen los primeros estudios en humanos [114-125]. Tateishi-Yuyama y colaboradores [114] publicaron en 2002 el resultado del estudio TACT ( Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation ) realizado sobre 47 pacientes con isquemia crónica de miembros inferiores (grados II-III de Leriche-Fontaine), a los que sometió a tratamiento mediante inyecciones intramusculares de progenitores hematopoyéticos. El objetivo del estudio fue valorar la eficacia y seguridad de la terapia celular basada en la evolución clínica de los pacientes, la mejoría hemodinámica medida por el Índice Tobillo-Brazo ( ITB ) y la

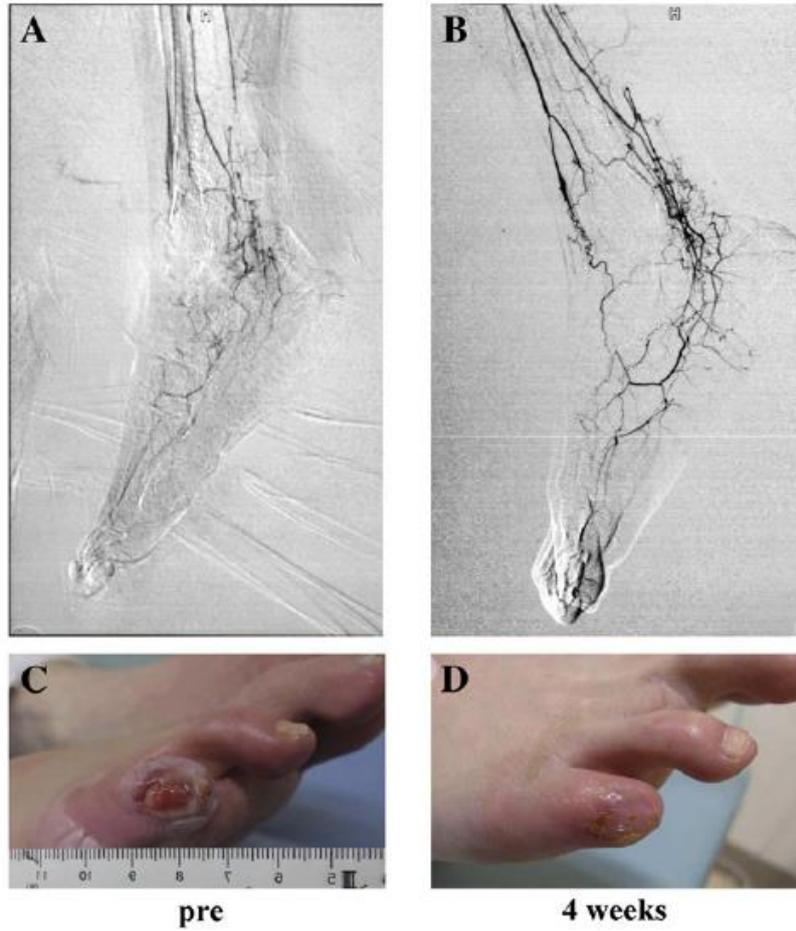
mejoría del dolor en reposo. Los pacientes fueron divididos en dos grupos: 25 pacientes presentaban isquemia sintomática de extremidad unilateral y 22 pacientes presentaban isquemia de ambas extremidades inferiores. En los 25 pacientes con afectación unilateral de extremidad, se administraron inyecciones intramusculares a nivel de musculatura gemelar de células mononucleadas obtenidas directamente de médula ósea (aspirado medular). Los 22 pacientes con afectación de ambos miembros inferiores, fueron tratados con células monocleadas de médula ósea en la extremidad con mayor severidad de la enfermedad, y con células mononucleadas obtenidas de sangre periférica en la extremidad con menor sintomatología. A las 4 semanas del tratamiento, se apreció mejoría de la distancia de claudicación, disminución del dolor en reposo, y mejoría de la presión transcutánea de oxígeno en las extremidades tratadas con células obtenidas directamente de médula ósea. Aquellas extremidades tratadas con células mononucleadas de sangre periférica, también presentaron mejoría de los parámetros analizados, pero en menor proporción en comparación con las extremidades tratadas con aspirado medular. Esta mejoría de los síntomas se mantuvo durante 24 semanas. En el año 2008 fueron publicados los resultados a largo plazo del estudio TACT [115]. Fueron analizados los resultados obtenidos en 115 pacientes tratados, con un seguimiento medio de 25 meses. De los 115 pacientes, 41 presentaban diagnóstico de Enfermedad de Buerger (Tromboangeitis Obliterante). Se obtuvo una tasa de salvamento de extremidad del 60% en pacientes con enfermedad arteriosclerótica, y del 91% en pacientes con Enfermedad de Buerger. Sin embargo, al carecer de grupo control, no se pudo concluir la superioridad del tratamiento celular respecto al conservador, indicando la necesidad de realizar estudios aleatorizados. Otros trabajos publicados con posterioridad, inician el mismo protocolo, pero minimizan la agresión producida por el aspirado medular, al obtener los progenitores hematopoyéticos de

sangre periférica tras su movilización desde médula ósea [116-119]. Kawamura y colaboradores [119], publicaron en 2006 los resultados de un estudio realizado sobre 92 pacientes en situación de isquemia crítica de extremidad inferior, con al menos un diagnóstico asociado de diabetes mellitus y/o insuficiencia renal en situación de hemodiálisis. Las extremidades afectadas fueron tratadas con infusión intramuscular de progenitores hematopoyéticos, obtenidos de sangre periférica tras ser movilizados desde médula ósea mediante el uso de factor estimulante de colonias granulocitarias (G-CSF). De todos los pacientes tratados, el 35% sufrieron la amputación de la extremidad. Los autores concluyen que la asociación entre diabetes mellitus, hemodiálisis y estadio IV de Fontaine, determina un mayor riesgo de amputación, probablemente debido a una menor capacidad de proliferación y diferenciación de estas células progenitoras, hecho ya apuntado con anterioridad por otros autores [126]. Estos resultados clínicos, (apoyados por los estudios angiográficos realizados a los pacientes en los que se demostraba el aumento de la vascularización en las zonas tratadas), ha hecho que otros investigadores hayan extendido la indicación de esta terapia a la patología oclusiva arterial de miembros superiores [127], con buenos resultados.(Figuras 16, 17, 18)

**Figura 16: estudios de imagen en pacientes tratados con terapia celular. Tomado de: Oda et al. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 2010; 49: 347–353 [ref. 125]**

A y C: arteriografía y lesión digital previo al tratamiento celular

B y D: arteriografía a las 4 semanas, mostrando el aumento de vascularización. Fotografía que demuestra la cicatrización de la lesión.



**Figura 17: estudios de imagen en paciente sometido a terapia celular: Tomado de: Eton D, Yu H. J Vasc Surg 2010;52:199-204 [ref. 121]**

A,B,C,D: Angiografía realizada previamente al tratamiento

E,F,G,H: Angiografía realizada a los 6 meses del tratamiento, donde se aprecia aumento de vascularización.



**Figura 18: evolución de lesión talar en paciente tratado con terapia celular. Tomado de: Eton D, Yu H. J Vasc Surg 2010;52:199-204 [ref. 121]**

A: basal

B: 5 meses postratamiento

C: 12 meses postratamiento



Los estudios posteriormente publicados han presentado mayor número de pacientes estudiados y criterios metodológicos más estrictos. En el año 2010 se publicó el diseño del estudio JUVENTAS [128]. Se trata de un estudio aleatorizado, doble ciego, control-placebo, diseñado para evaluar la eficacia del tratamiento mediante la infusión intrarterial de células mononucleadas aspiradas de médula ósea en pacientes con diagnóstico de isquemia crítica de miembros inferiores. El objetivo primario del estudio es evaluar la incidencia de amputación mayor a los 6 meses del tratamiento. La técnica consiste en aspirar 100 ml de médula ósea de la cresta ilíaca, de la que se obtienen 3 dosis. La primera se implanta a las 4 horas de la extracción, por punción de la arteria femoral común de la extremidad afectada. El resto de dosis (2), se implantan en intervalos de 3 semanas. La evaluación clínica se realiza a los 2 y 6 meses, analizando: incidencia de amputación mayor y menor, control del dolor en reposo, extensión de lesiones tróficas, mejoría de distancia de claudicación, mejoría del ITB, mejoría de la presión transcutánea de oxígeno, y mejoría de la calidad de vida. La extensión de la red colateral formada se objetiva por resonancia magnética. Desde el inicio del estudio en 2006 y hasta la fecha de publicación del diseño del estudio, fueron incluidos 60

pacientes, estimando concluir el reclutamiento calculado de 160 pacientes a finales de 2012. El objetivo primario del estudio es reducir el riesgo de amputación mayor en un 50%. Hasta el momento, han sido publicados resultados parciales [129-130], sin hacer referencia al objetivo primario, por lo que los resultados de este estudio arrojarán datos relativos a la eficacia de la obtención celular, dosis y vía de administración.

El estudio RESTORE-CLI [131], publicado en el año 2011, aportó nuevos datos sobre la terapia celular, y un nuevo concepto: las células de reparación tisular (en adelante TRC, de la traducción en inglés, Tissue Repair Cells). Estas TRC son células obtenidas de la médula ósea, constituidas por una "mezcla" de células mesenquimales (CD90+) y células hematopoyéticas (CD45+). Fue un estudio aleatorizado, multicéntrico, doble ciego, en fase II, donde se comparaba la inyección intramuscular de TRC frente a placebo en pacientes mayores de edad, con diagnóstico de isquemia crítica de miembros inferiores (ICMI) según criterios TASC II [8], y sin posibilidades de revascularización. Fueron excluidos aquellos pacientes con diabetes mal controlada (HbA1c mayor del 10%), estenosis aortoiliaca del 50%, exposición ósea o tendinosa, intento de revascularización fallido en las dos semanas previas al ingreso en el estudio, o con infección de la extremidad. El proceso de aleatorización se inició en 2007 y participaron 22 hospitales de Estados Unidos. El método de obtención celular consistía en aspirar 50ml de médula ósea, para ser sometido a cultivo ex vivo durante 12 días. El objetivo era conseguir la expansión celular, para obtener un concentrado de TRC con una viabilidad celular mayor al 70%. El rango de volumen final post-procesado osciló entre 5,8ml y 8,4ml, siendo repartido en inyecciones intramusculares de 0,5ml, implantadas en la musculatura isquémica. Los objetivos a estudio fueron de seguridad (efectos adversos y toxicidad) y eficacia (salvamento de extremidad, incidencia de amputación mayor, cicatrización de herida). El fracaso del tratamiento se definió por la necesidad de

amputación mayor, exitus o incremento en la extensión de la lesión trófica. Inicialmente se publicaron los resultados obtenidos sobre 46 pacientes reclutados (32 casos y 14 controles), con una tasa de amputación mayor a 6 y 12 meses en el grupo de pacientes tratados, del 19% y del 18% respectivamente, frente al 43% y el 36% en el grupo control, sin que estos resultados tuviesen significación estadística. La tasa de salvamento de extremidad fue mayor en el grupo de tratamiento frente al control ( $p=0,038$ ), sin reportar efectos adversos del tratamiento. La conclusión final de los autores del estudio, es que el uso de TRC es segura y bien tolerada, mejorando la tasa de salvamento de la extremidad. En el año 2012 fueron publicados los datos del estudio con un mayor número de pacientes ( $n=77$ ), y resultados similares [132].

Se han publicado meta-análisis, con el fin de determinar la verdadera utilidad de la terapia celular en la isquemia crítica [133-136]. Teraa y colaboradores [133] analizaron las tasas de amputación mayor y tasa de salvamento de extremidad, de 12 estudios aleatorizados, en los que fueron tratados 510 pacientes mediante terapia celular derivada de médula ósea. Todos los estudios analizados demostraron una disminución de las tasas de amputación en los brazos sometidos a tratamiento, con un riesgo relativo de amputación mayor del 0,58 (IC95% 0,4-0,84  $p=0,004$ ). Sin embargo, cuando sólo fueron analizados los estudios aleatorizados en los que se utilizó controles placebo, el efecto beneficioso en las tasas de amputación mayor disminuía y carecía de significación estadística (RR 0,78 IC95% 0,4-1,51  $p=0,46$ ) así como, tampoco se apreciaban diferencias estadísticamente significativas en las tasas de salvamento de extremidad. En 2013, Benoit y colaboradores [134] publicaron una revisión de todos los estudios con terapia celular, (incluidos los observacionales), donde fueron tratados 5 o más pacientes.

Los parámetros de seguridad analizados fueron: 1) exitus, 2) procesos oncológicos, 3) angiogénesis no regulada, 4) efectos adversos derivados de la técnica ( por ejemplo, sangrado postpunción). Los parámetros de eficacia analizados fueron: 1) tasa de amputación mayor, 2) tasa de exitus.

Se identificaron 45 estudios, con 1272 pacientes tratados, entre los que se incluyeron 7 estudios aleatorizados. La tasa de efectos adversos detectados fue del 4,2%. Los pacientes sometidos a tratamiento, no presentaron una tasa de mortalidad mayor que los pacientes controles, y no presentaron un aumento de la incidencia de procesos oncológicos en comparación con la población control. Los pacientes sometidos a terapia celular presentaron una menor tasa de amputación ( $p = 0,004$ ). Las conclusiones finales del estudio fueron: 1) la terapia celular tiene un perfil de seguridad óptimo, con una baja tasa de efectos adversos, 2) al disminuir las tasas de amputación mayor, sin incrementar la mortalidad derivada de los procesos oncológicos, la terapia celular debe ser considerada como una alternativa en aquellos pacientes con ICMI sin posibilidades de reconstrucción arterial, al tener un balance positivo beneficio/riesgo.

El principal atractivo de la terapia celular consiste en la posibilidad de administrar células inmaduras con capacidad de diferenciación endotelial, y con capacidad paracrina de diferentes factores reguladores del proceso de neovascularización. Esto lleva a que, en respuesta al estímulo isquémico, se produzca una acción coordinada que determine la formación de nuevos vasos. Han sido descritos la posibilidad de efectos adversos derivados de la técnica de aspirado medular [114], o de la técnica de movilización e implantación celular [116], entre los que se incluyen: infección de las zonas de punción, trombosis arterial, síndrome compartimental derivado de la implantación intramuscular, edema y trombosis venosa. Por otra parte, existe la posibilidad de neovascularización

patológica en los territorios tratados: sin embargo, este hecho no ha sido descrito en la bibliografía publicada hasta el momento. Las principales cuestiones no resueltas de la terapia celular se centran en el fenotipo celular específico que es necesario utilizar, la vía de administración (intrarterial o intramuscular), la dosis necesaria, y las interacciones celulares implicadas en la formación de nuevos vasos.



**CÉLULAS IMPLICADAS EN EL DESARROLLO DE  
NUEVOS VASOS: DEL HEMANGIOBLASTO A LA  
CÉLULA ENDOTELIAL.**



## **2. CÉLULAS IMPLICADAS EN EL DESARROLLO DE NUEVOS VASOS: DEL HEMANGIOBLASTO A LA CÉLULA ENDOTELIAL.**

Las investigaciones de los procesos de desarrollo de vasos colaterales, que atenúen las secuelas clínicas de los procesos isquémicos, no son nuevas y se han venido realizando desde el conocimiento de los procesos de neoangiogénesis tumoral a principios de los años 70 [59]. Las poblaciones celulares implicadas en la formación de nuevos vasos han constituido la base de muchos estudios, siendo las células progenitoras endoteliales, y otras poblaciones de células progenitoras, las que han centrado el grueso de las investigaciones. Actualmente las poblaciones celulares estudiadas como fuente de células progenitoras son: células mononucleadas, células estromales y células adiposas [136]

### **2.1 Definición y características de Célula Madre y Célula Progenitora:**

La primera cuestión que debe establecerse es saber cuál es la diferencia entre Célula Madre (en inglés, Stem Cell) y Célula Progenitora .

Las características de la célula madre son [137]:

- Células Inmaduras (Indiferenciadas)
- Capacidad de autorenovación (clonación)
- Células con capacidad para dar lugar a cualquier tipo celular (diferenciada o no) de características morfológicas y funcionales adaptadas a los tejidos a los que se incorporen.

Las características de la célula progenitora son [137]:

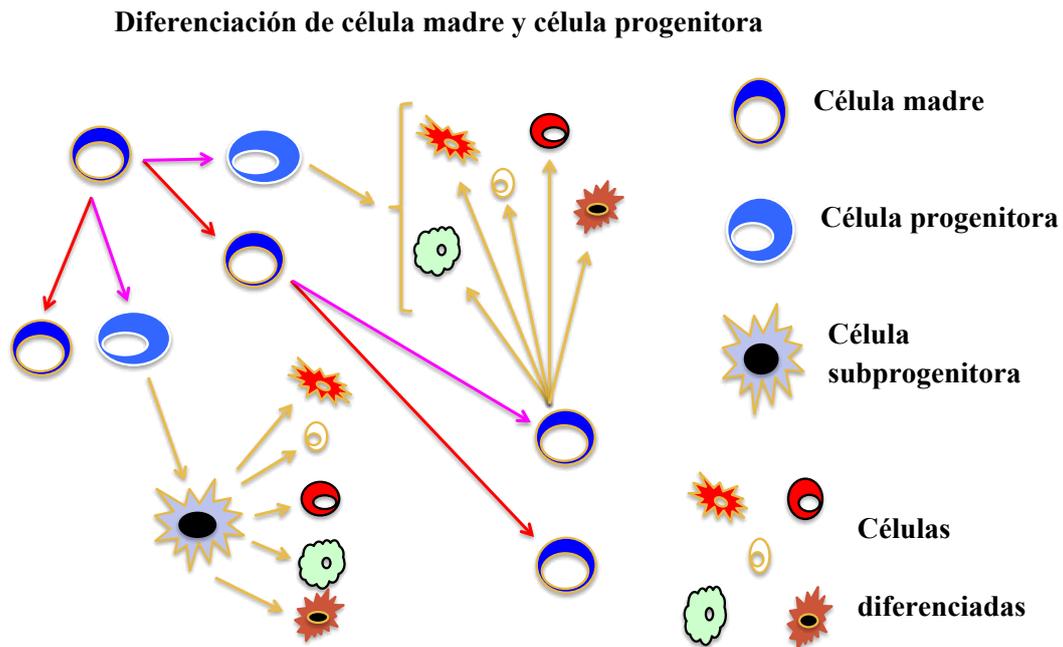
- Células parcialmente diferenciadas con capacidad para dar lugar a una o varias líneas celulares
- Células con capacidad de autorenovación ( clonación )

Estas diferencias son importantes puesto que en muchos trabajos, y de manera indistinta, se aplica el término "*célula madre/célula progenitora*" bajo la definición de "Célula Pluripotencial". De acuerdo con la bibliografía consultada, el término célula madre sería equivalente a Célula Totipotente, mientras que el término célula progenitora sería equivalente a célula pluri/multipotente.

Las células madre hematopoyéticas representan menos del 0,01% de las células de la médula ósea [137, 138], lo que supone que las células madre verdaderas son escasas y se clonan de manera relativamente infrecuente. En aquellos tejidos sometidos a un rápido y constante recambio celular (como en el caso de la piel y la sangre), éste se produce por la división de las células progenitoras, y de manera extraordinaria por las células madre [137, 139]. Por tanto, si el número de células madre hematopoyéticas es tan escaso, ¿su número es suficiente para mantener toda la homeostasis del sistema sanguíneo? La respuesta a esta pregunta puede ser en el mecanismo asimétrico de división celular [137, 140], por el cual una célula madre da lugar a una copia idéntica de si misma y a una célula más diferenciada (célula progenitora), que en función de la orientación o del nicho celular en el que se encuentre dará lugar a una estirpe celular. Dicho de otra manera, una célula madre puede dar lugar a varias células progenitoras antes de que se genere la célula diferenciada final. Distintos trabajos [93-102, 137] han demostrado la posibilidad de encontrar células madre en cualquier tejido del organismo, fuera de la médula ósea (tejido neuronal, tejido muscular...), capaces de dar lugar a células de estirpe hematopoyética. De la misma manera, células madre de la médula ósea pueden dar lugar a otras células de estirpe distinta a la hematopoyética (células neuronales, células hepáticas, células musculares cardíacas... ). La posibilidad de encontrar células madre en múltiples territorios del organismo, nos debe llevar a la

conclusión de la existencia de un complejo mecanismo de regulación celular que mantenga el equilibrio fisiológico (Figura 19).

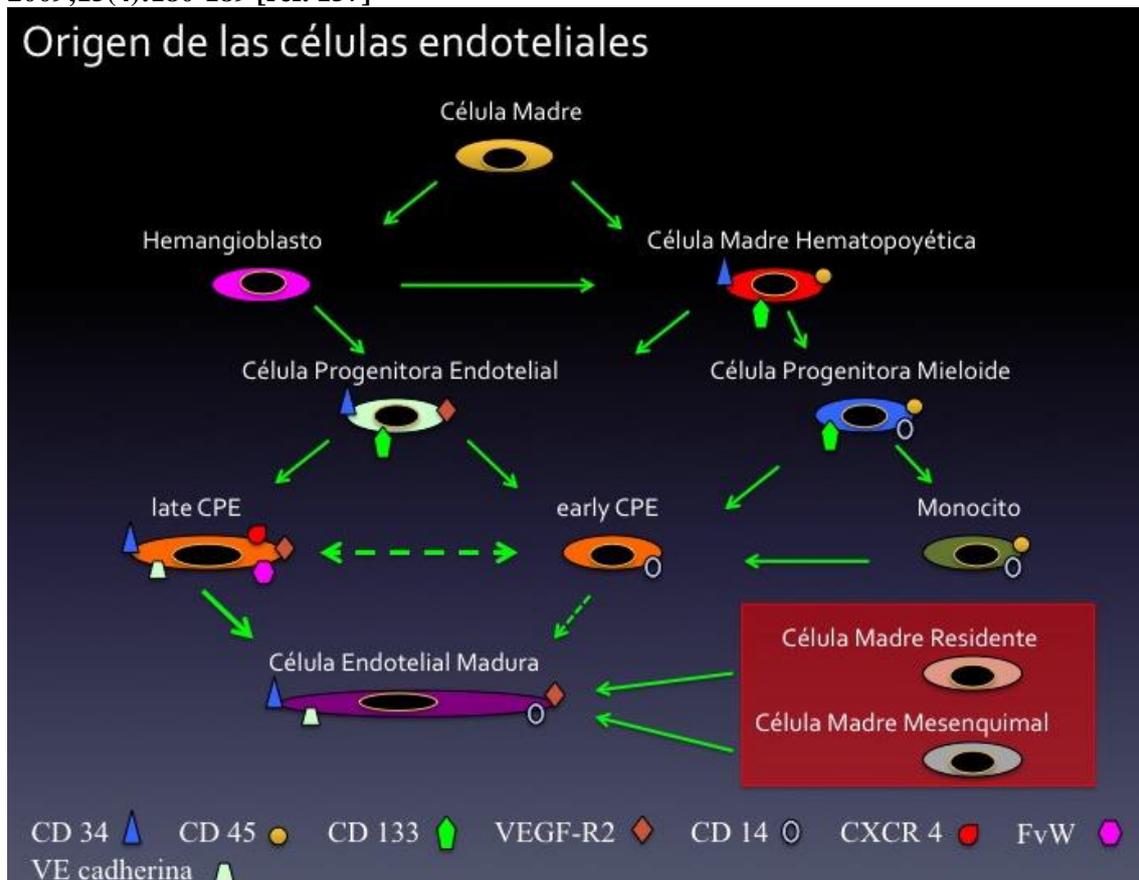
**Figura 19: vías de diferenciación de célula madre y célula progenitora. Adaptado de: Schatteman C et al. Currents topics in Developmental Biology 2004; 64:141-180 [ref. 137]**



## **2.2 Origen de las Células Endoteliales:**

La primera evidencia científica de células con capacidad pluripotencial dentro del sistema hematopoyético se realiza en el año 1961 [93]. A partir de ese momento distintos trabajos identifican células hematopoyéticas, con capacidad para diferenciarse en cualquier célula madura de la sangre circulante. En el año 1997 se demuestra la existencia del hemangioblasto adulto [56], identificándolo como célula precursora común para las células de estirpe hematopoyética y endotelial. [56, 137]

**Figura 20: origen de las células endoteliales.** Adaptado de : 1) Magri et al. *J Surg Res.* 2011; 167:140-150 [ref. 158] y 2) Krenning G et al. *Trends in Molecular Medicine* 2009;15(4):180-189 [ref. 157]



El hemangioblasto es inicialmente considerado como una célula embrionaria, a pesar de las primeras referencias datadas de 1930 [141] y 1950 [142] en donde se le identifica en individuos adultos de modelos animales. Con los estudios de las prótesis vasculares, se obtienen nuevas evidencias de la existencia de células adultas con capacidad angioblástica, al demostrarse la capacidad de endotelización de las derivaciones protésicas mediante un mecanismo de adherencia celular y migración, originado en las anastomosis arterio-protésicas [137, 143, 144]. Esta endotelización era producida incluso en los pacientes en los que se inhibía la capacidad de migración celular y se producía de manera más rápida en aquellos materiales sometidos a infiltración con células obtenidas de aspirado medular, observándose no solo endotelización, sino también colonización por células musculares lisas, macrófagos y monocitos. Asumiendo

la existencia de estas células, el siguiente objetivo de las investigaciones fue identificarlas a través de sus marcadores de superficie.

La médula ósea del adulto es una gran reserva de células madre (con capacidad para diferenciarse en cualquier tejido), y de células progenitoras multipotentes. Muchos tipos celulares pueden jugar un papel en la regeneración de los vasos y mostrar gran cantidad de marcadores de superficie, siendo la tipificación específica de las CPE uno de los desafíos en el estudio biológico de estas células. El CD34 es el antígeno expresado en las células mononucleadas y constituye una proteína estructural de la membrana celular, que regula la adhesión de las células madre hematopoyéticas [145]. La población de células CD34<sup>+</sup> incluye una amplia variedad de células, dentro y fuera de la médula ósea, y su expresión en las células hematopoyéticas está regulada durante su proceso de diferenciación. Las células mononucleadas constituyen la reserva celular de la médula ósea, con capacidad para modular su fenotipo de acuerdo a condiciones locales y necesidades fisiológicas. Las células mononucleadas de la médula ósea es el término por el que se definen todas las células presentes en la médula ósea de núcleo unilobulado o redondeado, carentes de gránulos en el citoplasma [146]. Estas características permiten que sean identificables y fácilmente separables por métodos físicos. Entre las células mononucleadas adultas están las células progenitoras hematopoyéticas, en diferentes estados de maduración. Multitud de células de estirpe no hematopoyética, o que puedan diferenciarse hacia células no hematopoyéticas, forman parte de la fracción mononuclear de la médula ósea del adulto. Entre estas células encontramos células mesenquimales, células progenitoras endoteliales, hemangioblastos y otras células progenitoras adultas con capacidad multipotencial [146]. En las condiciones de cultivo adecuadas, las células mononucleadas han demostrado su capacidad para diferenciarse en células endoteliales, capaces de producir óxido nítrico

en respuesta a acetilcolina, absorber lipoproteínas de baja densidad, y formar estructuras vasculares, lo que ha llevado a la conclusión que las células mononucleares forman parte de una población celular adulta con capacidad angioblástica. [147-155]

### **2.3 Tipos de Células Progenitoras Endoteliales: early y late CPE:**

Las células progenitoras endoteliales fueron definidas en 1999 por Isner y colaboradores [56, 57] y engloban a aquellas células mononucleares, de sangre periférica o de médula ósea, que cultivadas en fibronectina o gelatina, son capaces de diferenciarse en células endoteliales maduras definidas por la expresión en superficie de sus antígenos fenotípicos (VE-cadherina +, CD34+, CD31+, VEGF-R2, P1H1). [137]

Hay que diferenciar entre 2 tipos de células progenitoras endoteliales (CPE). [137, 156-164]

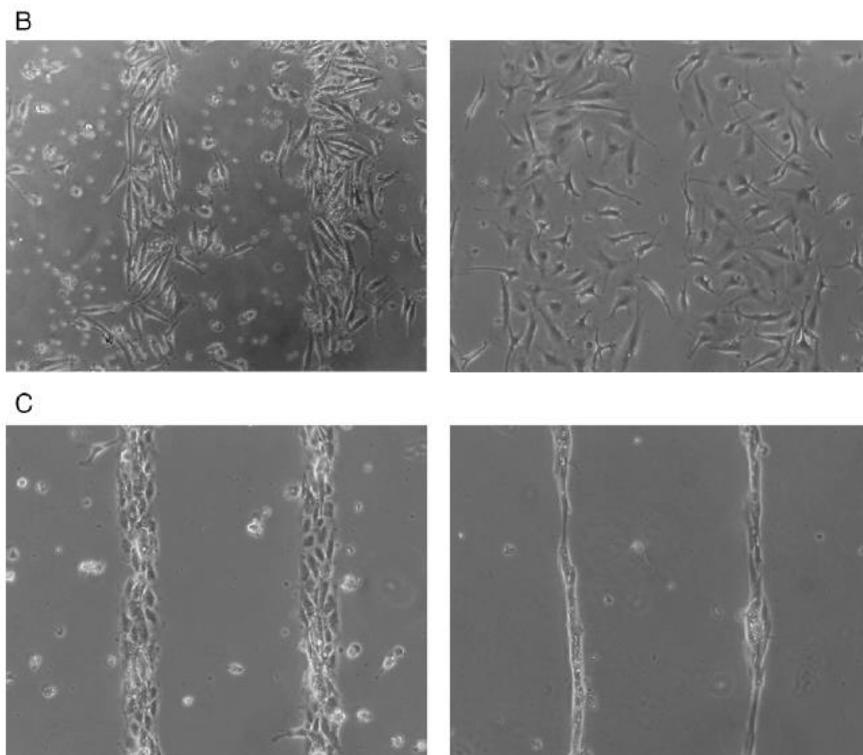
- Early Outgrowth CPE (colony forming unit-endothelial cells, Endothelial-like cell, o CD14+ CPE).
- Late Outgrowth CPE (endothelial colony forming cells; CD34+ CPE)

Las *early CPE* derivan de la fracción mieloide de las células mononucleadas, aunque también pueden originarse de células de estirpe hematopoyética. Se identifican por su marcador de superficie CD14+ y CD 133+. Suelen obtenerse tras 4-10 días de cultivo, y tienen funciones comunes con las células macrofágicas: actividad fagocítica, actividad antitrombótica y de producción de sustancias vasoactivas. Tienen una proliferación lenta y aunque presentan menor capacidad para formar nuevos vasos, pueden incorporarse a los vasos ya formados. Contribuyen a la creación de los nuevos vasos mediante la liberación de factores moduladores angiogénicos.

Las *late CPE* se originan exclusivamente de la línea hematopoyética y expresan marcadores de la línea endotelial (CD34+ y CD144+). Aparecen tras 2-4 semanas de cultivo y no muestran funciones solapadas con otras líneas celulares. Son las células que se diferencian propiamente en células endoteliales maduras, con gran capacidad de proliferación y alta capacidad de formación tubular "in vitro", determinando la construcción del esqueleto sobre el que se desarrollará el nuevo vaso. Estudios in vitro han demostrado este proceso, realizando cultivos celulares de earlyCPE y lateCPE por separado. [162] (figura 21)

**Figura 21: diferencias entre earlyCPE y lateCPE. Tomado de: Mukalla et al. Experimental Cell Research 2008; 314: 430-440. [ref. 162]**

Cultivos celulares trasplantados en matrigel, de earlyCPE (B derecha e izquierda) y lateCPE (C derecha e izquierda). Columnas derechas, a las 18h del cultivo. Columnas izquierdas a las 24h del cultivo. No se aprecia formación de estructuras tubulares en los cultivos de earlyCPE (B derecha e izquierda). Formación de estructuras tubulares en los cultivos de lateCPE (C derecha e izquierda)



El endotelio vascular mantiene y regula el tono vascular, la estructura, el crecimiento, la fibrinólisis y la homeostasis, protegiendo a los vasos de la respuesta inflamatoria, la trombosis, y las enfermedades cardiovasculares. La pérdida de la función endotelial

determina la pérdida de la adherencia intercelular endotelial y del reclutamiento de células mieloides y progenitoras, implicadas en la remodelación y reparación vascular [163].

Las células progenitoras endoteliales (CPE) se incorporan a los sitios de neovascularización, formando parte estructural de los sitios de denudación endotelial y mostrando tres actividades características [163]:

- paracrina
- integración y reparación del daño endotelial
- formación de nuevos vasos en los tejidos dañados

La CPE debe diferenciarse de la célula endotelial circulante (CEC), un subtipo celular, que puede observarse en sangre circulante en un rango fisiológico de 3 células/ml. Son células detectables en procesos de lesión vascular producidos durante procedimientos de cateterismo cardíaco, anemia de células falciformes, infecciones bacterianas, púrpura trombótica trombocitopénica y síndromes coronarios agudos, por lo que se ha sugerido la posibilidad de utilizar su cuantificación como un método no invasivo para el estudio de alteraciones vasculares. [165, 166]

#### **2.4 Localización de las CPE:**

De acuerdo con Aicher [167] y Schatteman [168], las CPE células pueden encontrarse en la médula ósea o en otras localizaciones. De acuerdo con su localización, las CPE pueden clasificarse en [164]:

- Células de sangre periférica/médula ósea
- Células de la pared vascular
- Células del sistema monocito-macrófago.

Las **CPE de la médula ósea y sangre periférica**, se caracterizan por sus marcadores clásicos: CD 34+, CD 133+ y VEGF-R2 (también conocido con KDR+). La función del CD34 es actuar como ligando en la adhesión célula-célula, como ya se ha comentado con anterioridad. El CD133 es una proteína transmembrana, que no se manifiesta en las células endoteliales maduras, y cuya función es regular la composición lipídica dentro de la membrana plasmática. El VEGF-R2 es un receptor tirosín-kinasa, esencial para las funciones de migración celular y maduración.

Las **CPE de la pared vascular (VW-EPC, en inglés)**, actúan como una fuente de células progenitoras en los procesos de angiogénesis y vasculogénesis postnatal. No sólo existen en la pared de los vasos grandes, sino también en los vasos de mediano tamaño localizados en hígado, próstata, corazón, riñones, testículos y pulmones. Su localización hace que sean estas células las primeras en actuar en los procesos isquémicos y de regeneración tisular. [164, 169, 170].

Las **CPE derivadas del sistema monocito-macrófago** tienen una función importante en la neovascularización que se produce en respuesta a las situaciones de isquemia. Los monocitos representan hasta el 12% de los leucocitos circulantes y se movilizan desde la médula ósea hacia los sitios de isquemia, donde reclutan otros monocitos. Estimulan la proliferación y migración de células endoteliales al segregar factores de crecimiento angiogénico y liberar proteasas que degradarán la matriz extracelular, formando túneles sobre los que se construirán los nuevos vasos [134, 150, 164]. Por otra parte, los monocitos circulantes han demostrado su capacidad para expresar marcadores de células endoteliales (factor de Von Willebrand, VE-cadherina, y eNOS) tras 2 semanas de cultivo celular [150, 164]. Los monocitos se identifican por su marcador de superficie CD14+ [134]. Cuando estas células comienzan a determinar la expresión de marcadores de célula endotelial, la expresión de CD14 disminuye hasta desaparecer, al tiempo que

comienzan a expresar CD34+ [171]. La expresión de CD14 es fácilmente detectable mediante el uso de citometría de flujo tradicional, mientras que la expresión de CD34 requiere el uso de anticuerpos marcados con tinción fluorescente, que amplifica la señal de fluorescencia entre 100 y 1000 veces más que la citometría tradicional. El hecho de que las células monocíticas sean capaces de expresar tanto CD14 como CD34, y que más del 90% de las células CD34+ expresen también CD14 [164] apoya que los monocitos sean aceptados como una población celular con capacidad progenitora endotelial, capaces de diferenciarse hacia células endoteliales maduras, lo que las convierte en una fuente potencial de terapia celular en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares [134, 164]

### **2.5 Movilización , reclutamiento y realojamiento de las CPE:**

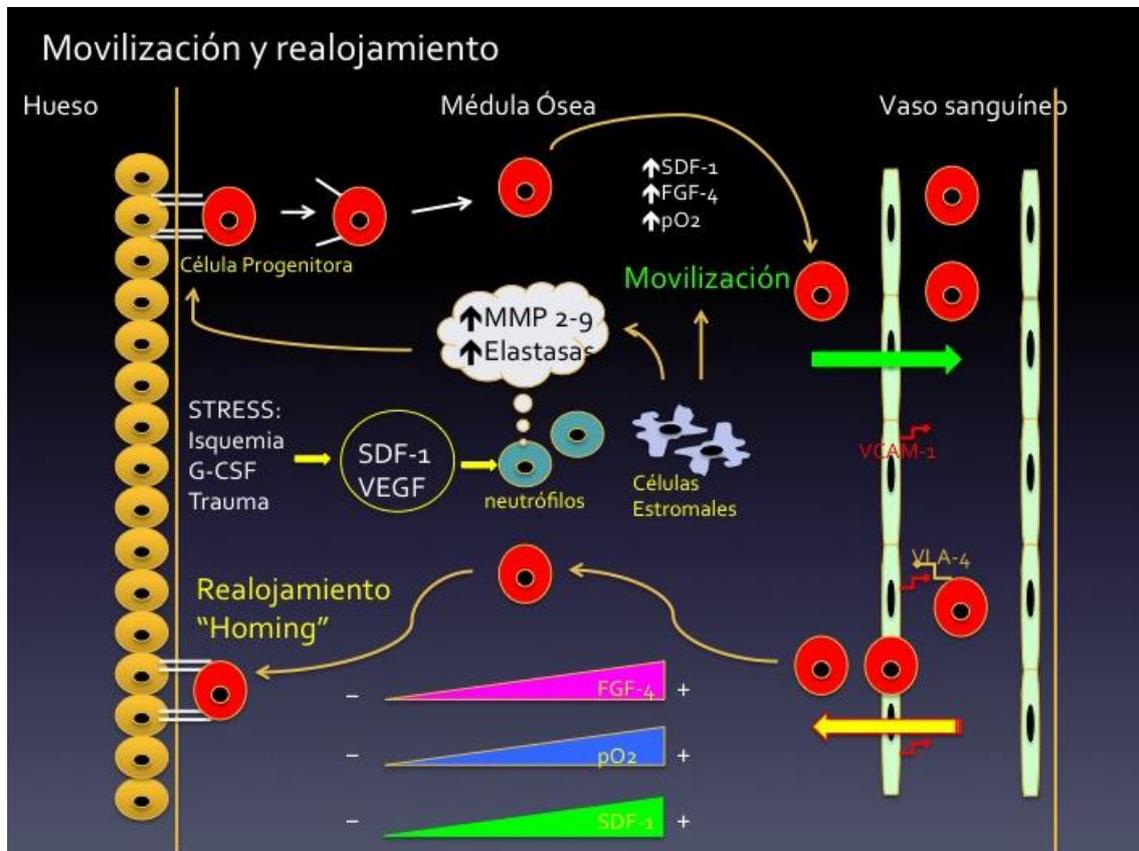
A excepción de las CPE de la pared del vaso (VW-EPC), y las CPE derivadas del sistema monocito-macrófago (que actúan localmente en respuesta al estímulo isquémico), las CPE derivadas de médula ósea han de ser movilizadas y alojadas en los tejidos diana, cuando se produce el estímulo isquémico. Las CPE de la médula ósea, están localizadas en un nicho endostal de células, caracterizado por una baja presión de oxígeno, y elevados niveles de SDF-1/CXCL12, una proteína quimioattractiva para las CPE. Los factores fisiológicos responsables de la movilización de las CPE desde el nicho medular, son: la hipoxia tisular, los traumatismos, el ejercicio físico, la edad y los estrógenos. Estas condiciones activan la producción de sustancias activadoras de las CPE , entre las que se encuentran: SDF-1 (factor derivado de células estromales), s-ICAM ( molécula de adhesión intercelular ), VEGF ( factor de crecimiento vascular endotelial), HIF-1alfa ( factor inducido por hipoxia ), EPO (eritropoyetina), G-CSF (factor de crecimiento granulocitario), HGF (factor de crecimiento hepatocitario), IL-6

(interleucina), estrógenos y MMP-9 ( metaloproteinasas ) [163, 172-180]. Una vez movilizadas y liberadas a sangre periférica, las CPE son alojadas en aquellos tejidos donde la reparación vascular y la neovascularización son requeridas. Las CPE segregan E-selectina, P-selectina y Beta-integrinas, fundamentales en la adhesión a células endoteliales maduras activadas, y responsables del alojamiento de las CPE a los sitios donde se precise neovascularización. El incremento en el reclutamiento de las CPE a los sitios de daño vascular, acelera la reendotelización y disminuye la formación de neoíntima "in vivo". Un vez finalizado el estímulo, las CPE circulantes excedentes, son realojadas en la médula ósea, por un fenómeno conocido como "*homing*" [181-183]. Durante este proceso se produce una interacción entre las selectinas expresadas en la pared endotelial y las expresadas en la superficie de las CPE, lo que permitirá la recaptación de la CPE hacia la médula ósea (Figura 22).

Movilización y realojamiento son dos procesos relacionados. La movilización constituye la salida de las células progenitoras a la sangre periférica, mientras que el realojamiento (*Homing*, en inglés) supone el proceso contrario. Durante el proceso de movilización, las situaciones de stress producen cambios en los niveles de SDF-1 y VEGF, que producen la liberación de metaloproteinasas (MMP) y otras elastasas que determinan la liberación de la célula progenitora del nicho endostal al nicho vascular de la médula ósea, donde los gradientes de Factor Derivado del Estroma-1 (SDF-1), presión de oxígeno (pO<sub>2</sub>) y Factor Derivado Fibroblástico-4 (FDF-4), permitirán la liberación a sangre periférica. El proceso de realojamiento, supone la interacción de selectinas expresadas en las células endoteliales y las integrinas de las células progenitoras, que permitirán el paso de la célula desde el torrente circulatorio a la médula ósea, desde donde se dirigirá al nicho endostal siguiendo los gradientes de pO<sub>2</sub> en espera de una nueva señal de activación que revierta este proceso.

**Figura 22: mecanismo de movilización y realojamiento. Adaptado de: Li Calzi S et al. Microvascular Research 2010; 79: 207-216 [ref. 183]**

Abreviaturas : VCAM ( Molécula de Adhesión Vascular Celular ), VLA (Antígeno muy tardío ), SDF-1 ( Factor Derivado del Estroma - 1 ) , VEGF (Factor de Crecimiento Vascular Endotelial), G-CSF (Factor Estimulante de Colonias Granulocíticas), FGF (Factor de Crecimiento Fibroblástico).



## **2.6 Factores implicados en el número y funcionalidad de las CPE:**

Las CPE poseen la capacidad estructural para integrarse en los sitios de daño endotelial, y la capacidad paracrina de secreción de diferentes citoquinas implicadas en la formación de los nuevos vasos [164]. La integración de las CPE en los sitios de daño endotelial implica, no sólo la formación de los nuevos vasos, sino también la reparación de los vasos dañados. La implicación de las CPE en los mecanismos de reparación endotelial reduce la proliferación neointimal y la aterogénesis [184].

Existen diversas situaciones clínicas que determinan incrementos del stress oxidativo del organismo, que se traducen en un descenso de las CPE. Esto puede ocurrir en la hipercolesterolemia, el tabaquismo, la diabetes mellitus y la hipertensión [164]. En estas

situaciones, se produce una disminución de la disponibilidad y funcionalidad de las CPE, determinando un incremento del proceso arteriosclerótico. La influencia de los factores de riesgo ateroscleróticos ha sido determinada en distintos trabajos [14, 15, 164], afirmando la correlación positiva entre el riesgo estratificado en la escala Framingham para la aterosclerosis y los niveles de CPE circulantes [126, 164, 185, 186], llegando incluso a determinar la relación entre el número de CPE circulantes y la posibilidad de desarrollar un futuro evento cardiovascular en pacientes con enfermedad coronaria establecida [187].

En la Hipercolesterolemia, la lipoproteína de baja densidad (LDL) disminuye la supervivencia de las CPE, al alterar su capacidad migratoria, alterar su capacidad de adhesión, y alterar la capacidad de formación de estructuras tubulares de forma dosis dependiente. Todos estos efectos son atribuibles a la capacidad del LDL para disminuir la fosforilación proteínica y con ello la expresión de óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS). La disminución de la expresión de eNOS determina la apoptosis y senescencia de las CPE [188-191]. Por otro lado, la LDL inhibe las propiedades angiogénicas de las CPE al inhibir la expresión de E-selectina y de integrina  $\alpha(v)$ - $\beta 5$ , proteínas implicadas en la interacción CPE y célula endotelial [192]. Este efecto también se ha visto en los pacientes con insuficiencia renal avanzada, al observarse la producción de LDL carbamilada (cLDL), responsable del incremento de la oxidación proteínica que determina la senescencia y disfunción de las CPE [193].

De manera similar, el tabaquismo incrementa el stress oxidativo y reduce la biodisponibilidad de óxido nítrico, determinando la deplección de las CPE y la atenuación de los mecanismos de reparación vascular [164]. Michaud y colaboradores [24] demostraron este efecto al realizar un estudio sobre 15 individuos fumadores, (sin otros factores de riesgo vascular y sin enfermedad arterial conocida) y 11 individuos

sanos. De cada uno de los individuos se obtuvieron CPE de sangre periférica, con el objetivo de determinar su número, su funcionalidad (evaluada según capacidad de migración, adhesión y tubulización) y su capacidad de diferenciación hacia células endoteliales maduras (evaluada por la capacidad de expresión de marcadores específicos endoteliales, determinada por citometría de flujo). Tras cuatro días de cultivo, y tras comparar las muestras de ambos grupos, se apreció un menor número CPE, una menor capacidad de adhesión y tubulización, y una menor capacidad de diferenciación entre los individuos fumadores. Estos efectos se relacionaron con un aumento en la producción de reactantes oxigenados, y una disminución de la producción de óxido nítrico (Figuras 23,24). El mecanismo de actuación es similar al producido por la LDL, al incrementar la producción de LOX-1, que interfiere en la fosforilación proteínica responsable de la expresión de eNOS [194]. Este efecto citotóxico es dosis dependiente y reversible, de manera que el abandono del hábito tabáquico aumenta la biodisponibilidad del óxido nítrico, disminuye el stress oxidativo y produce un rápido incremento de los niveles circulantes de CPE [164, 195-197].

**Figura 23: Cuantificación de CPE en pacientes fumadores y controles.**

**Figura 24: Cuantificación de productos de reacción oxidativa en pacientes fumadores y controles.**

Tomadas de: Michaud et al. *Atherosclerosis* 2006; 187:423-432 [ref. 24]

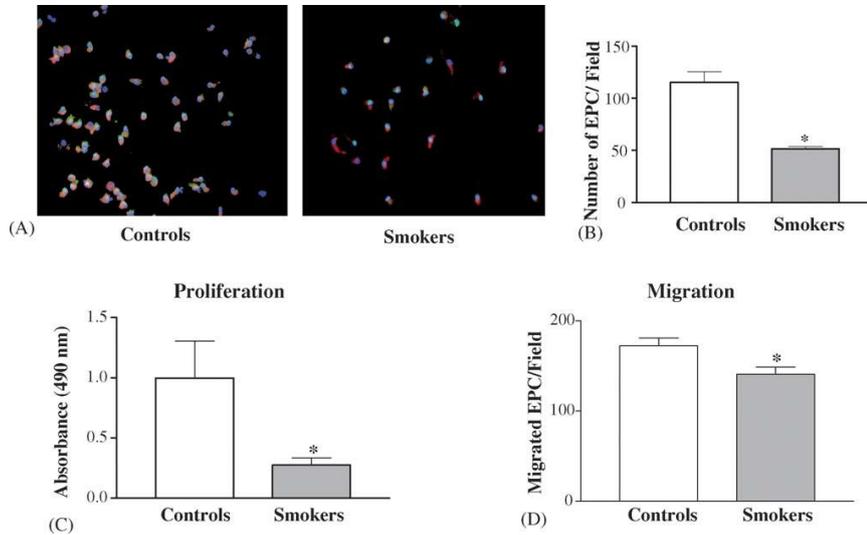


Fig 23

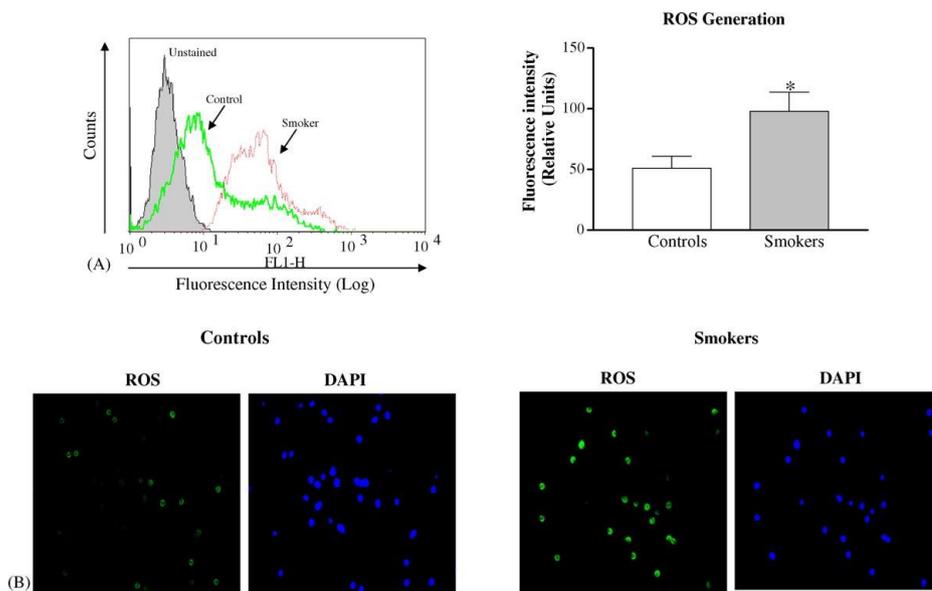


Fig24

En el caso de la diabetes mellitus, las CPE suelen estar reducidas en número, y su funcionalidad también se ve alterada, al observarse una capacidad migratoria reducida, una disminución en la formación de colonias in vitro, una disminución de la capacidad de diferenciación hacia células endoteliales maduras y una menor formación de estructuras tubulares [183]. Este efecto se ha comprobado en modelos experimentales

realizados en ratones tratados con estreptozocina (Zanuser ®) [198-201]. La estreptozocina, inicialmente descubierta como antibiótico, se trata de un agente alquilante utilizado en quimioterapia como citotóxico contra las células beta de los islotes de langerhans. En este grupo de ratones diabéticos inducidos farmacológicamente, se analizó la capacidad de expresión de Factor Derivado del Estroma celular (SDF-1, en adelante). El *SDF-1* es producido por las CPE y las células del tejido isquémico, y está implicado en el proceso de migración, reclutamiento y realojamiento celular (*homing*) a través de su receptor CXCR4. En estos ratones se apreció que la cuantificación de la expresión de *SDF-1* estaba reducida, en comparación con la población control.

Además de la afectación de la funcionalidad, la supervivencia de las CPE se ve disminuida en los pacientes diabéticos. Este efecto parece producido por la alteración de los procesos de fosforilación proteínica determinado por los altos niveles glucémicos, que producen un aumento de los productos derivados de la glicación avanzada, responsables del incremento del stress oxidativo y de la apoptosis celular [202]. Este ha sido uno de los puntos en los que se basan las teorías para explicar la mayor severidad y la mayor rapidez de evolución de la enfermedad arterial en los pacientes diabéticos.

Se ha comentado la posibilidad de una depleción progresiva en la reserva de células progenitoras endoteliales (CPE) de la médula ósea, hasta llegar a un “agotamiento” medular en situaciones de enfermedad avanzada [203, 204]. Esta teoría se ve apoyada por el hecho de observar que en aquellos pacientes diabéticos con correcto control glucémico, se producen menos complicaciones que aquellos con incorrecto control glucémico. Otro dato que apoyaría esta teoría es que los pacientes con diabetes mellitus tipo 2, tratados con sitagliptina, presentan mayores niveles circulante de CPE que los pacientes tratados con otros antidiabéticos [205, 206]. La sitagliptina es un inhibidor de

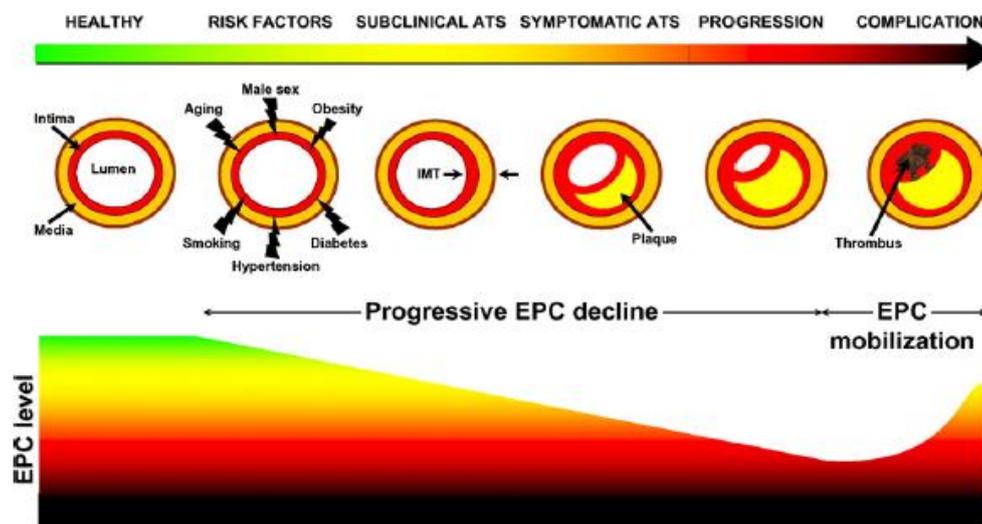
la dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4), enzima implicado en la degradación del *SDF-1*. Al aumentar los niveles de SDF circulante, se incrementa la unión a su receptor específico CXCR-4, determinando la activación de la señal implicada en movilización de las CPE en respuesta al estímulo isquémico [206].

La hipertensión también ha sido relacionada con alteración en la función endotelial y la deplección de la reserva medular [126, 202, 207-209]. En modelos animales de hipertensión, se objetivó que las CPE se volvían senescentes y disfuncionales de forma precoz [202]. El mecanismo por el cual ocurre esto es debido a la hiperactividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona. Tanto en modelos in vivo como in vitro, los niveles elevados de angiotensina II han determinado un incremento del stress oxidativo, que se traduce en disfunción y senescencia de las CPE. Esta disfunción se corrigió tras la administración de bloqueantes de los receptores de angiotensina [202, 207, 210]. En modelos in vitro, la administración de aldosterona disminuía los niveles de VEGF, lo que afectaba a la diferenciación de CPE; este efecto se corregía con la administración de espironolactona y antioxidantes [211]. Todos estos datos han llevado a pensar en que el efecto de la hipertensión sobre el desarrollo del proceso arteriosclerótico sea debido al agotamiento de la reserva de CPE [202].

Se ha hablado del efecto de envejecimiento sobre el proceso de aterogénesis y la capacidad de migración y diferenciación endotelial [109, 202]. Con el paso de los años, el número de CPE circulantes disminuyen, al tiempo que aumenta la migración desde médula ósea a sangre periférica con el fin de mantener la homeostasis. Esto conlleva a una depleción progresiva de la médula ósea. De la misma forma, el proceso de envejecimiento influye también en la funcionalidad celular, reduciendo la capacidad de migración y diferenciación endotelial, lo que disminuye la capacidad de reparación

endotelial y por tanto contribuye al proceso aterosclerótico. Esto parece ser debido a que durante el proceso de envejecimiento se reduce la capacidad de la telomerasa celular, implicada en los procesos de reparación del ADN, y responsable de la senescencia celular [203]. Figura 25

**Figura 25: proceso de depleción medular de CPE. Tomado de : Fadini et al. Atherosclerosis 2007; 194:46-54 [ref. 202]**



Debido a la importancia de las CPE en los procesos de reparación endotelial, muchos investigadores han intentado identificar mecanismos para proteger a las CPE, y mejorar su funcionalidad. Se ha llegado a identificar al único patógeno humano (*bartonella henselae*) conocido hasta el momento, con capacidad para infectar a las CPE y alterar su funcionalidad [212].

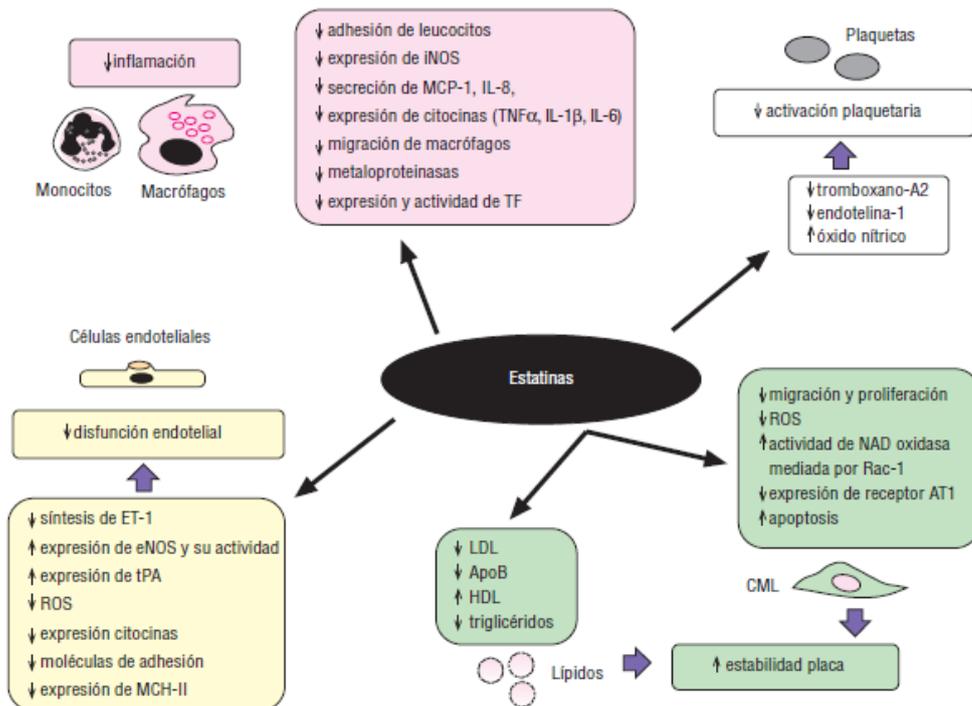
Se han identificado fármacos que actúan favoreciendo la actividad y el número de las CPE: antioxidantes, aminoácidos (L-Arginina), hormona paratiroidea, eritropoyetina, hormona del crecimiento e insulinas. [175, 179, 203, 213-218].

Sin embargo, de todos ellos, las estatinas han sido los fármacos más estudiados en los últimos años [202, 203, 219, 220].

Inicialmente indicadas para el tratamiento de la hipercolesterolemia pura, las estatinas vieron incrementadas sus indicaciones con la aparición de las primeras publicaciones en donde se informaba de la mejoría de la claudicación intermitente en aquellos pacientes con arteriopatía periférica establecida tratados mediante la combinación de estatina, hemorreológico y antiagregante convencional [25-27]. Diversos estudios han demostrado un aumento de los niveles circulantes de CPE en pacientes tratados durante periodos cortos de tiempo con atorvastatina, pravastatina o simvastatina [221]. Sin embargo, también ha aparecido en la literatura algún dato contradictorio: un estudio publicado en 2007 por Hristov y colaboradores [222], puso en duda este efecto beneficioso, al apreciar una disminución en la capacidad de formación de colonias celulares de progenitores endoteliales en pacientes tratados durante largos periodos de tiempo con estatinas. No obstante, estas conclusiones venían dadas por el hecho que sólo se habían tenido en cuenta los niveles circulantes de células precoces ( *earlyEPC* o CPE jóvenes) las cuales constituyen la subpoblación celular que contribuye en el proceso vasculogénico mediante la liberación de factores de crecimiento. Otros estudios han demostrado que el tratamiento con estatinas mejora la funcionalidad de las CPE maduras (*lateEPC*, *L-EPC*) [221, 223], incrementando su número y su capacidad de migración y diferenciación, independientemente de la reducción de los niveles de colesterol [27, 202]. Entre los efectos pleotrópicos de las estatinas, se encuentra el efecto inmunomodulador. Al inhibir la respuesta inflamatoria mediada por Factor de Necrosis Tumoral ( $\text{TNF}\alpha$ ) e Interleucina 6 (IL-6) responsable de la apoptosis de las CPE, se produce un incremento en el número de CPE circulantes, lo que se traduce en un efecto endotelio-protector. Por todo esto, cada vez son más frecuentes las referencias

a las estatinas como parte fundamental del tratamiento farmacológico del paciente con enfermedad arterial periférica. [26, 27, 223-227] Figura 26

**Figura 26: efectos pleotrópicos de las estatinas.** Tomado de Badimon et al. *Rev Esp Cardiol* 2011; supl. 11(B):3-13 [ref. 26]



Durante los procesos inflamatorios, se producen niveles elevados de Proteína C Reactiva. La funcionalidad de las CPE se ve alterada en esta situación, debido al incremento de la producción de reactantes derivados de las reacciones oxidativas, responsables de la apoptosis de las CPE y de la alteración de su funcionalidad [16, 17, 228]. Los efectos de la respuesta inflamatoria en la movilización y reclutamiento de las CPE pueden ser clasificados en 2 categorías: 1) respuesta transitoria restringida y 2) respuesta persistente o estimulación inflamatoria excesiva.

Una respuesta transitoria restringida puede contribuir como estímulo positivo en la movilización de las CPE, como ocurre en las fases iniciales de los traumatismos. Sin embargo, una estimulación inflamatoria excesiva puede tener el efecto contrario, al incrementar los niveles de IL-6 y TNF $\alpha$ , responsables de la apoptosis de las CPE. [164]

Llegados a este punto, podríamos concluir que las CPE constituyen la población celular encargada de la neovascularización postnatal tanto fisiológica como patológica, y expresan en superficie gran variedad de marcadores, tanto de línea hematopoyética como endotelial. Las CPE son de gran interés para los investigadores dedicados a los mecanismos de reparación en las enfermedades cardiovasculares. Algunos estudios preliminares [88, 103, 105, 114, 136, 164, 229, 230] han demostrado que el tratamiento aislado con CPE o en combinación con tratamientos tradicionales, pueden ser prometedores para curar enfermedades vasculares en pacientes arterioscleróticos con factores de riesgo clásicos, proponiendo nuevos conceptos y estrategias terapéuticas en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.



## **OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO**



### **3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO**

De acuerdo con la historia natural de la enfermedad [8, 231], aquellos pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores, sin posibilidad de tratamiento revascularizador, presentarán una alta tasa de amputación de extremidad. El objetivo fundamental del trabajo es determinar si en aquellos pacientes con diagnóstico de isquemia crítica de miembros inferiores, a los que se les han agotado todas las opciones revascularizadoras (cirugía abierta de revascularización, cirugía endovascular o híbrida), existe la posibilidad de evitar la amputación mayor de la extremidad mediante un nuevo enfoque terapéutico: la terapia celular.

#### **3.1 Hipótesis de Trabajo:**

*En comparación con el tratamiento convencional, el tratamiento mediante infusión local autóloga de células progenitoras hematopoyéticas y endoteliales evitará la amputación de las extremidades afectadas por isquemia crítica en un mayor número de pacientes, consiguiendo tasas de salvamento de extremidad superiores a las publicadas en la actualidad.*

#### **3.2 Objetivos Primarios:**

*1. Demostrar la eficacia del tratamiento con células progenitoras hematopoyéticas y endoteliales autólogas en pacientes con diagnóstico de Isquemia Crítica de miembros inferiores, sin posibilidades de revascularización.*

Para ello se analizará la tasa de salvamento de extremidad de los pacientes tratados con terapia celular, comparándola con la de aquellos pacientes sometidos a tratamiento convencional, definido por el uso exclusivo de tratamiento analgésico, hemorreológico y vasodilatador.

2. *Evaluar la seguridad de la terapia celular en aquellos pacientes sometidos a este tratamiento.*

Para ello se analizarán:

- a) los efectos adversos derivados de la técnica de movilización, aféresis e implantación celular.
- b) la tasa de mortalidad comparada con la de los pacientes sometidos a tratamiento convencional, identificando todas las causas de muerte atribuibles al uso de la técnica.

### **3.3 Objetivos Secundarios:**

1. Identificar la composición cuantitativa óptima del inóculo celular, que permita conseguir el efecto terapéutico deseado.
2. Analizar la influencia de las comorbilidades sobre el efecto terapéutico de los tratamientos aplicados, basándonos en las tasas de amputación y exitus.
3. Analizar el efecto del tratamiento aplicado sobre la calidad de vida del paciente, basándose en la disminución de la puntuación obtenida en la escala de valoración subjetiva del dolor.
4. Identificar aquellas variables que pudieran condicionar el fracaso de la terapia angiogénica, con el fin de evitar tratamientos que no conseguirán el objetivo primario.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

De manera conjunta, el Servicio de Hematología y Hemoterapia y el Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Son Dureta\*, desarrollaron un estudio para el tratamiento de pacientes con diagnóstico de Isquemia Crítica de Miembros Inferiores (ICMI), sin posibilidades de revascularización. Para ello se diseñó un protocolo de tratamiento mediante trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos y endoteliales. Este protocolo fue aprobado por el Comité Ético Hospitalario y el Gobierno Autonómico de las Islas Baleares. Todos los pacientes dieron por escrito su consentimiento informado.

### **4.1 Material : Pacientes**

Se ha tomado como muestra a los pacientes con diagnóstico de ICMI, valorados por el Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Son Dureta\*, Palma de Mallorca (Illes Balears), que hayan participado en dicho estudio. El periodo de estudio es el comprendido entre enero de 2002 y diciembre de 2012.

\* (El hospital Son Dureta fue cerrado en diciembre de 2011, trasladando toda su actividad asistencial al nuevo Hospital Son Espases)

### **4.2 Material: Fármacos**

1. Filgrastim (Neupogen®): Filgrastim (factor metionil-recombinante estimulador de las colonias de granulocitos humanos) se obtiene por tecnología DNA recombinante en *E. coli* (K12). Es un factor de crecimiento de células de la serie blanca (factor de estimulación de colonias de granulocitos, G-CSF) y pertenece a un grupo de medicamentos denominados citocinas. Los factores de crecimiento son proteínas que se producen de manera natural en el organismo, pero que también se pueden obtener mediante biotecnología para su uso como medicamentos. Neupogen® está indicado para la movilización de las células progenitoras de sangre periférica (PBPC).

2. Antiagregantes: los recomendados en el tratamiento de la enfermedad arterial periférica establecida, de acuerdo a las guías clínicas [8]. Los utilizados fueron: Acido Acetilsalicílico (Adiro®), Clopidogrel (Plavix®/Iscover®) y Trifusal (Disgren®). Se desestimaron pacientes en tratamiento con Ticagrelor, Prasugrel y Ticlopidina.

3. Antitrombóticos: Acenocumarol (Sintrom®). Su posología venía establecida por el Servicio de Hematología y Hemostasia, en aquellos pacientes con indicación médica de anticoagulación. En estos casos, durante el periodo de movilización celular, recolección e implantación, la anticoagulación oral fue sustituida por heparinas de bajo peso molecular, siendo las habitualmente utilizadas Enoxaparina (Clexane®) y Bemiparina (Hibor®)

4. Analgésicos no opioides, antiinflamatorios no esteroideos y neurolépticos: Paracetamol, Ibuprofeno, Diclofenaco (Voltarén®), Pregabalina (Lyrica®), Gabapentina (Neurontín®), Ketorolaco (Droal®).

5. Analgésicos opioides: Fentanilo ( Durogesic®, Abstral® ), Buprenorfina (Transtec®)

6. Hemorreológicos: Pentoxifilina (Hemovás®), Buflomedilo (Lofton®), Nafthidrofurilo (Praxilene®), Cilostazol (Pletal®, Ekistol®)

7. Estatinas: Simvastatina, Atorvastatina, Pravastatina, Rosuvastatina.

### **4.3 Métodos: diseño del estudio. Criterios de inclusión y exclusión**

Diseño: ensayo clínico prospectivo, no aleatorizado, abierto, de un solo brazo y control mediante serie histórica. Aprobado por Comité Ético Hospitalario y Gobierno Autónomo de las Islas Baleares.

Para este Ensayo Clínico, con un nivel de seguridad del 95%, una potencia del 90%, y con 2 controles por cada caso, se calculó la necesidad de obtener un tamaño muestral (n) del grupo sometido a tratamiento de progenitores hematopoyéticos y endoteliales de, al menos 42 individuos, con un grupo de control de, al menos, 85 individuos. Calculando la posibilidad de pérdida de un 10% de pacientes durante el seguimiento, se estipuló la necesidad de obtener una n de 46 individuos sometidos a tratamiento.

Sobre la tasa de amputaciones, se decidió realizar análisis estadístico en base a la extremidad tratada y no al paciente, por la posibilidad de encontrar pacientes con dos extremidades susceptibles de tratamiento.

En aquellos casos que pudieran ser sometidos a tratamiento simultáneo bilateral, o en los que la segunda extremidad fuera tratada antes de que hubieran pasado 6 meses del inicio de tratamiento de la extremidad contralateral, se utilizó como extremidad a estudio la más afectada desde el punto de vista clínico y hemodinámico, no siendo considerada la extremidad contralateral en el análisis estadístico. En los casos con dos extremidades tratadas, con inicio del tratamiento separado por un intervalo entre ambas superior a 6 meses, se realizó análisis independiente de cada extremidad.

El grupo control histórico está constituido por pacientes tratados en nuestro hospital, con el mismo diagnóstico e indicación terapéutica que el grupo estudiado, pero que no hubieran tenido la posibilidad de recibir terapia celular, al no estar disponible en el momento de su diagnóstico. Estos pacientes debían cumplir con los mismos criterios de inclusión y exclusión que el grupo de intervención.

### **Criterios de inclusión**

1. Adultos, mayores de 18 años.
2. Pacientes con Isquemia Crítica de Miembros Inferiores (ICMI) diagnosticados por la Unidad de Angiología y Cirugía Vascular.
3. Pacientes no tributarios de cirugía de revascularización, por haber agotado las opciones técnicas quirúrgicas o no existir lechos distales aptos para revascularizar.
4. Pacientes que cumplan con el correcto tratamiento de la enfermedad, basado en antiagregantes, hemorreológicos, vasodilatadores y estatinas.
5. Pacientes que hayan firmado Consentimiento Informado.

### **Criterios de Exclusión**

1. Pacientes en edad pediátrica.
2. Test de embarazo positivo o negativa a utilizar métodos anticonceptivos adecuados.
3. Ausencia de consentimiento informado firmado.
4. Antecedentes de enfermedad oncológica de cualquier tipo (incluidas las hematológicas) o pendientes de estudio.
5. Cardiopatía isquémica sintomática en el momento de la inclusión, en los 6 meses previos, o que haya precisado de intervencionismo coronario, o cirugía de revascularización, en los 12 meses previos a la inclusión.
6. Pacientes trasplantados de cualquier tipo.
7. Pacientes con calidad de vida limitada por comorbilidades asociadas, incapacitados para deambulación independiente, encamados o con deterioro cognitivo en cualquier grado.
8. Pacientes con isquemia irreversible de la extremidad, dolor no controlado de manera ambulatoria o lesiones que indiquen la amputación primaria.

Indicaciones de Amputación Primaria:

8.1 Lesiones cutáneas infragénicas o del pie, que afecten a más de 2/3 de la extensión del territorio y que impidan cirugía reconstructiva de la extremidad a pesar de revascularización o amputación transmetatarsiana

8.2 Contractura en flexión por dolor no controlado

8.3 Lesiones cutáneas con exposición osteotendinosa maleolar

8.4 Necrosis húmeda de extremidad

9. Positividad a VIH

#### **4.4 Métodos: Descripción de las líneas celulares. Procesamiento del inóculo autólogo**

El objetivo de la técnica es conseguir implantar un inóculo de células mononucleadas CD34+ obtenidas de la sangre periférica del propio paciente por leucaféresis, tras un proceso de movilización celular a través de la administración de G-CSF durante 5 días. Se realizará una determinación analítica basal al paciente previo a la movilización celular, y otra analítica el día de recolección celular (aféresis) donde se determinarán niveles de: Leucocitos, Neutrófilos, Linfocitos, Monocitos, Hemoglobina, Hematocrito, y Plaquetas en la sangre periférica del paciente, todos ellos expresados en las unidades internacionales de medida.

Tras el proceso de aféresis, se realizará el análisis del inóculo a implantar, donde se determinarán los niveles de : Leucocitos (v.a  $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) , Plaquetas (v.a  $\times 10^3/\mu\text{l}$ ), Neutrófilos (%), CD34 (%), CD3 (%), Células Nucleadas Totales (CNT) ( v.a  $\times 10^8$  y v.a  $\times 10^6/\text{ml}$ ), Células Mononucleadas (CMN) (v.a  $\times 10^8$  y v.a  $\times 10^8/\text{kg}$ ), CD34 (v.a  $\times 10^6$  y v.a  $\times 10^6/\text{kg}$ ), CD3 (v.a  $\times 10^7/\text{kg}$ ) y Hematocrito (%)

#### **4.5 Métodos: obtención del inóculo**

A continuación se describe el proceso de obtención del inóculo celular, distribuido en cuatro procesos:

- Movilización celular
- Recolección
- Envasado, etiquetado y manipulación hasta zona quirúrgica
- Estudio de idoneidad del producto

##### **4.5.1 Movilización de Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH) a sangre periférica.**

La movilización la realizó el médico responsable del Gabinete de Aféresis y Terapia Celular. Él mismo, fue el responsable de explicar al Paciente, o al Responsable/Tutor Legal, el procedimiento y los posibles riesgos. Se le entregó una Nota Informativa (TCPH-PGX-049) donde se explicaba el proceso de aféresis y se informaba de una serie de consejos importantes para las sesiones de aféresis. El paciente debía firmar los consentimientos informados para la movilización y aféresis.

La movilización en los pacientes se realizó mediante la administración de factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) (Neupogen®), en régimen ambulatorio.

La solicitud de G-CSF se realizó cumplimentando el volante de medicamentos hospitalarios para pacientes externos. En régimen ambulatorio, el G-CSF se administró por vía subcutánea (s.c) a una dosis de 5 µg/kg/c24 horas, durante 5 días. La primera

recolección (aféresis) se realizó tras cinco días de tratamiento con G-CSF. Antes de iniciar la primera recolección, se debía cuantificar el número de células CD34 circulantes. Para ello se remitía una muestra de sangre periférica al Laboratorio de Inmunología, solicitando determinación de hemograma y células CD34. La muestra remitida al laboratorio se realizó en 2 tubos de EDTA con 2ml de sangre periférica.

La siguiente fórmula muestra el procedimiento para el cálculo de células CD34+ circulantes:

$$\underline{Células CD34+ circulantes/\mu l = Leucocitos (mm^3) \times CD34+(\%)}$$

**Ejemplo:** para una muestra de 50.000 leucocitos/mm<sup>3</sup> y un porcentaje de CD34+ del 0,02%.

$$\underline{Células CD34+circulantes/\mu l = 50000(mm^3)\times 0.02(\%) = 10 células CD34/\mu l}$$

Las recolecciones sólo se iniciaron si la cifra de leucocitos preaféresis era  $\geq 4$  veces la cifra de leucocitos basales y la cifra de células CD34+ circulantes era  $\geq 10/\mu l$ . Si tras cinco días de movilización, no se alcanzaba este mínimo, se continuaba con la administración de G-CSF durante dos días más. Después del sexto día, se repetía la determinación de células CD34+ circulantes. Si la cifra era  $\geq 10/\mu l$  se realizaba la recolección; si era  $< 10/\mu l$  se suspendía la movilización, repitiéndose a las 3 semanas un nuevo ciclo de movilización.

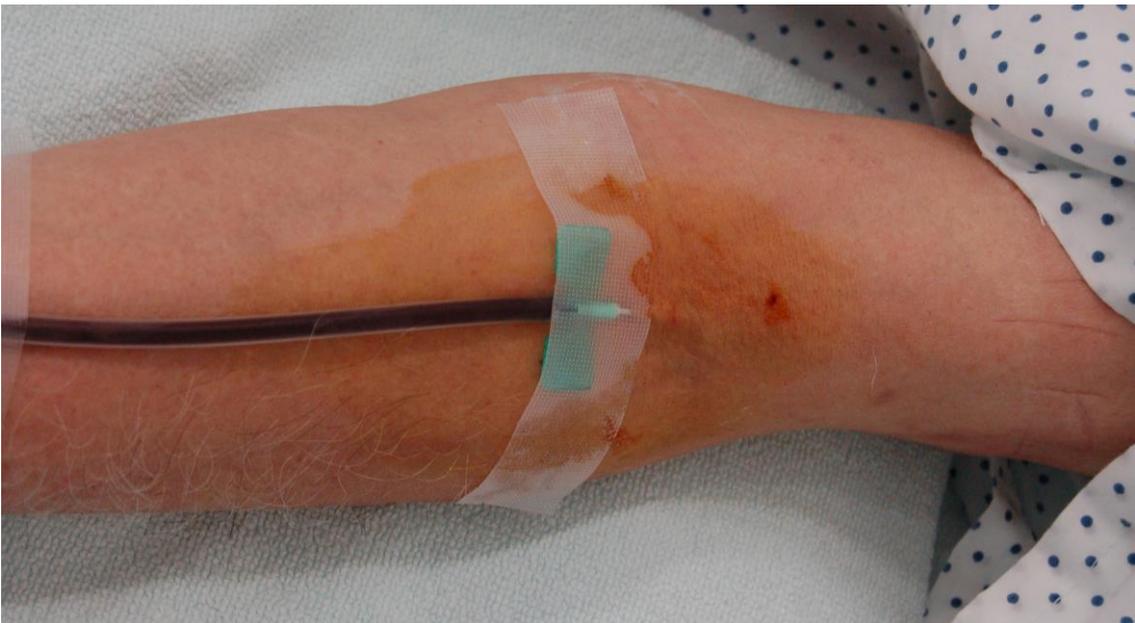
Si con la primera recolección no se obtenía un número mínimo suficiente de células CD34+ (definido entre  $2-3 \times 10^6/kg$ ), se continuaba con el G-CSF y se realizaba una segunda sesión de recolección al día siguiente.

La movilización finalizaba cuando se había alcanzado el número mínimo de células CD34+ requeridas para el trasplante ( $\geq 2 \times 10^6/\text{kg}$ ) o se habían realizado un máximo de cuatro sesiones de recolección.

#### 4.5.2 Recolección de progenitores hematopoyéticos: Aféresis

La **aféresis** es la técnica mediante la cual se separan los componentes de la sangre, seleccionando la capa de células mononucleadas y devolviendo al torrente sanguíneo el resto de componentes celulares. La finalidad de la aféresis es la extracción de un componente sanguíneo destinado a la transfusión.

El procedimiento de la aféresis consiste en conectar por vía venosa, (a través de uno o dos accesos), al paciente con a una máquina separadora de células, mediante un equipo de bolsas y tubos de recolección estériles. La sangre llega al separador celular, donde se procesa y se selecciona el producto a recolectar, y el resto de la sangre es devuelta al paciente. Según el tipo de máquina de recolección, y el producto que se pretende obtener, la aféresis puede durar entre 30 minutos y tres horas. Este procedimiento se realiza con el paciente en régimen ambulatorio.





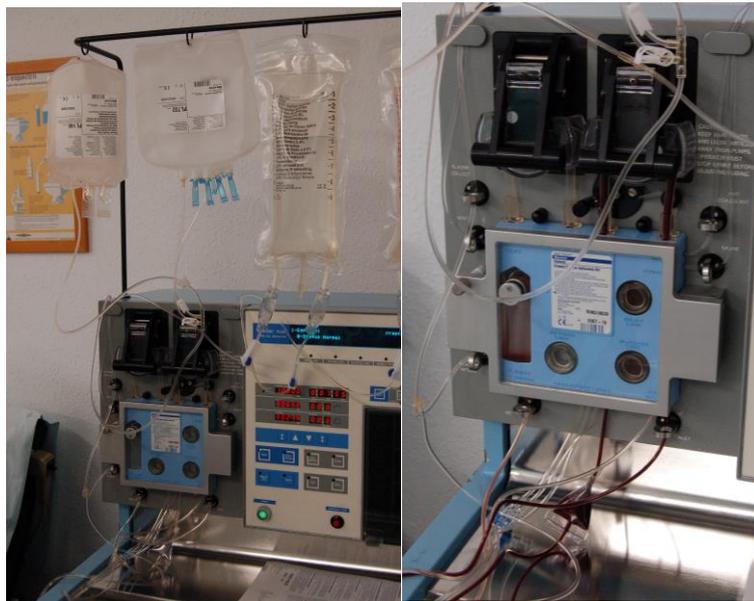
El paciente debía disponer de vías periféricas adecuadas. En caso contrario, se individualizaba la indicación de colocación de una vía central (Shaldon®), habitualmente vía subclavia. En caso de precisar una vía central, ésta era colocada previamente a la realización de la aféresis, previa comprobación de la normalidad de los parámetros de coagulación, según el protocolo habitual hospitalario.

El paciente debía disponer de grupo sanguíneo (ABO y Rh) y escrutinio de anticuerpos irregulares. Se realizaba test de serología vírica (VIH, VHC, VHB) y VDRL previamente a la aféresis. Los tests de serología infecciosa eran realizados en los 30 días previos a la primera extracción. Los resultados de estos tests son necesarios para la seguridad del laboratorio. En el caso del VIH, su positividad excluía al paciente del protocolo de tratamiento.



El procedimiento se realizó por el enfermero/a, adscrito a la Unidad de Obtención de CPH, y era supervisado por el médico responsable de la Unidad. Se realizó según los procedimientos para el manejo de los procesadores de aféresis BAXTER-FENWAL CS 3000 (Cell Separator Machine CS-3000 PLUS; Bayer, Leverkusen, Germany). Al paciente se le asignó un identificador alfanumérico y se introdujo en el ordenador utilizado para el registro de pacientes. A continuación, se sacaba la etiqueta identificativa con los datos del paciente y se colocaba en la bolsa de progenitores.

## Baxter-Fenwall CS-3000



El volumen a procesar venía dado por las características del donante. En general, se procesó una media de 10 litros. La periodicidad era diaria hasta lograr un mínimo de  $CD34+ \geq 2 \times 10^6/\text{kg}$  de peso del paciente, o un máximo de cuatro sesiones consecutivas.

La siguiente fórmula muestra el procedimiento para el cálculo de rendimiento de células CD34+ de aféresis:

$$\underline{CD34+ = (Leucocitos (mm^3) \times CD34(\%) \times volumen (ml) \times 1000) / kg \text{ peso paciente}}$$

**Ejemplo:** Aféresis con 200 ml de volumen, 250.000 leucocitos/mm<sup>3</sup>, 0,2% de CD34+ para un paciente de 73 kg de peso.

$$CD34+ = (250000 \times 0,002 \times 200 \times 1000) / 73 = 1,36 \times 10^6 / kg$$

En todos los casos se realizaba un hemograma al donante autólogo antes y después del proceso. De la bolsa de recolección se realizaba un hemograma y una extracción para Inmunología para calcular el número de células CD34+ obtenidas.

Durante el procedimiento se anotaban los lotes y fechas de caducidad del material empleado. El producto de la aféresis se remitía etiquetado al Banco de Tejidos de CPH, mediante formulario de envío y solicitud de almacenamiento. Si el producto se iba a infundir de forma inmediata, se realizaban pruebas pretransfusionales como si se tratara de un concentrado de hematíes.



#### 4.5.3 Envasado, etiquetado, e identificación del inóculo

Las operaciones de etiquetado son fundamentales para la correcta identificación, almacenamiento y administración de los hemoderivados. Este procedimiento se realizaba en el Banco de Tejidos.

La bolsa primaria de productos no congelados se colocaba en una bolsa secundaria cerrada herméticamente, para evitar fugas. Las operaciones de etiquetado incluían los siguientes controles:

1. El etiquetado de los contenedores se hacía a la recepción, y se confrontaban con los datos del etiquetado inicial de la unidad de aféresis para garantizar su exactitud en relación con la identidad, contenido y conformidad. Se realizaba una verificación del contenido de la etiqueta por dos miembros del equipo antes de proceder a su distribución.
2. Todas las etiquetas eran validadas por el Director Médico de la unidad antes de ser impresas.
3. Todas las etiquetas eran legibles y estaban impresas usando tinta indeleble. Los componentes que eran procesados a continuación, podían ser puestos en nuevos contenedores con las nuevas etiquetas de forma apropiada.

Todos los datos relativos a dichos componentes se introducían en los Registros de Criopreservación en sus versiones en papel y electrónica. Dichos registros permitían la recuperación posterior de los componentes. Cuando se fijaba la etiqueta al contenedor, debía de permanecer una superficie suficiente de éste descubierta, para permitir la inspección del contenido.

Terminada la extracción, el contenedor de la extracción primario tenía la siguiente información:

- Identidad de la unidad de extracción
- Número de aféresis
- El nombre del componente en una posición bien visible
- El nombre del paciente/receptor y su número de historia clínica
- Fecha y hora de extracción
- Volumen aproximado del componente
- Nombre y volumen del anticoagulante y cualquier otra solución empleada.

Al final del procesado la etiqueta del contenedor del componente indicaba la información recogida en el punto anterior y la siguiente información adicional:

- Grupo ABO y Rh del donante.
- Tipo y volumen de anticoagulantes, soluciones electrolíticas, y/o crioprotectores.
- La frase “Identificar adecuadamente al Receptor propuesto y Componente o Unidad” y “Cuidado. Este Producto puede Transmitir Agentes Infecciosos” (etiqueta de peligro biológico).
- Los resultados más recientes de los tests sobre enfermedades infecciosas realizados al paciente.
- La fecha de caducidad, incluyendo el día, mes y año, y si el periodo de fechado es de 72 horas o menos, la hora de caducidad

- Recomendaciones sobre el rango de temperatura de conservación de los componentes en grados Celsius.
- Cada contenedor de células propuesto para uso autólogo tenía marcado claramente : “Para uso exclusivo autólogo”.

Se rellenaba el Formulario de trazabilidad de envío del Banco de Tejidos a la Unidad Clínica de trasplante de CPH. Se comprobaba que era devuelta una copia debidamente firmada por el receptor para su archivo en el Banco de Tejidos. Las bolsas conteniendo los componentes de CPH iban en el interior de un contenedor adecuado y correctamente identificado para su traslado desde el Banco de Tejidos a la Unidad Clínica de Trasplante de CPH para su infusión (quirófano). Para el transporte del inóculo, el contenedor estaba etiquetado, indicando: identificación del centro, contenido y su destino, fecha y hora de su salida de la Unidad de Obtención de CPH de HUSD/HUSE. El contenedor transportador debía tener marcado claramente: “MUESTRA BIOLÓGICA DE CÉLULAS. MANEJAR CON CUIDADO” y “NO IRRADIAR”.

**Figura 27: etiquetas identificativas del inóculo**



#### 4.5.4 Estudio de la idoneidad del producto

Se cursaban las muestras obtenidas de la bolsa de aféresis, inmediatamente después de su obtención para la realización de los diferentes estudios: 1) un tubo de EDTA para hemograma que se enviará al laboratorio de citomorfología, 2) un tubo de EDTA para enviar a Inmunología para estudio de células CD34+ y linfocitos T, 3) muestras para microbiología: Hemocultivos (aerobios y anaerobios), micobacterias y cultivo de hongos.

El producto final fue analizado mediante un contador automático celular ( Advia 120, Bayer ), determinando la fórmula celular ( células mononucleares, CD34, CD133, células granulocitarias, y plaquetas). La viabilidad de las células mononucleares se estudió mediante sistema de exclusion “trypan blue-dye”. Se realizó citometría de flujo mediante anti-CD133 isocianato de fluoresceina y anti-CD34 ficoeritrina (FACScan; Becton Dickinson, Mountain View, CA).

#### **4.6 Métodos: Descripción de la técnica de implantación celular**

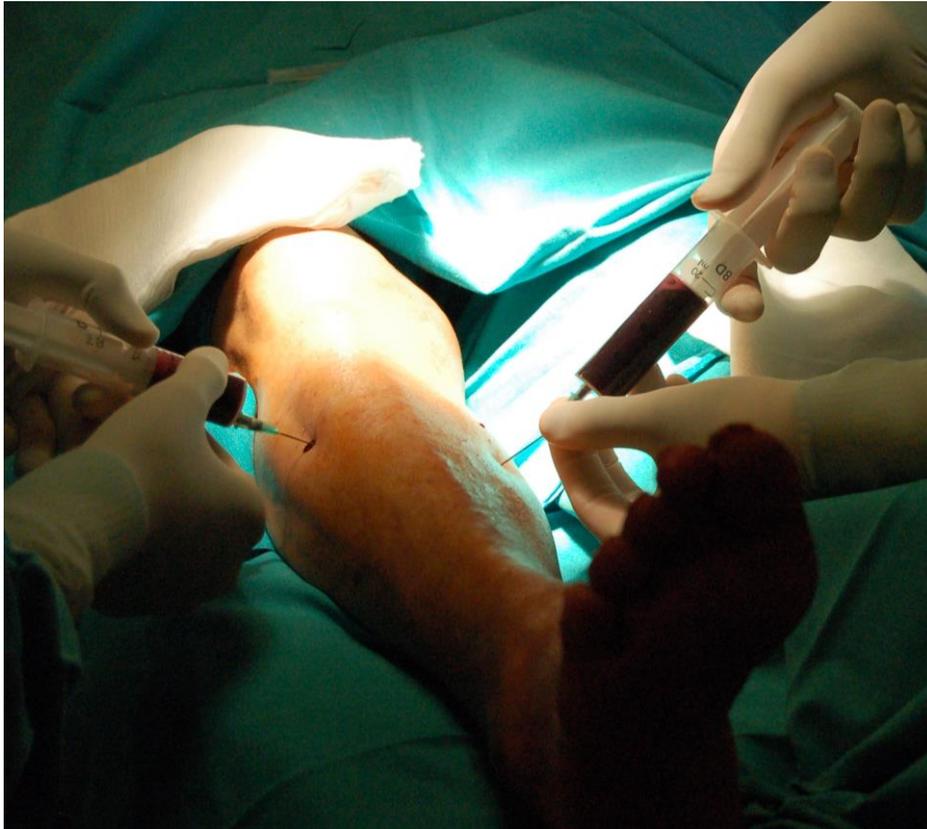
La implantación del inóculo se realizó en un tiempo máximo de 24h tras el proceso de aféresis.

En condiciones de asepsia quirúrgica, y bajo anestesia loco-regional o sedación profunda, se procedía a la asepsia de la extremidad a tratar. El volumen total del inóculo a implantar se extraía del contenedor primario por punción de válvula hemostática con aguja de venopunción de 18G y en jeringas de 20 ml, tras retirada del protector estéril. La totalidad del inóculo se dividía en alícuotas de 2 ml. Estas alícuotas eran implantadas por vía intramuscular utilizando aguja de punción de 21G con trayecto perpendicular al plano cutáneo y siguiendo la distribución de los compartimentos

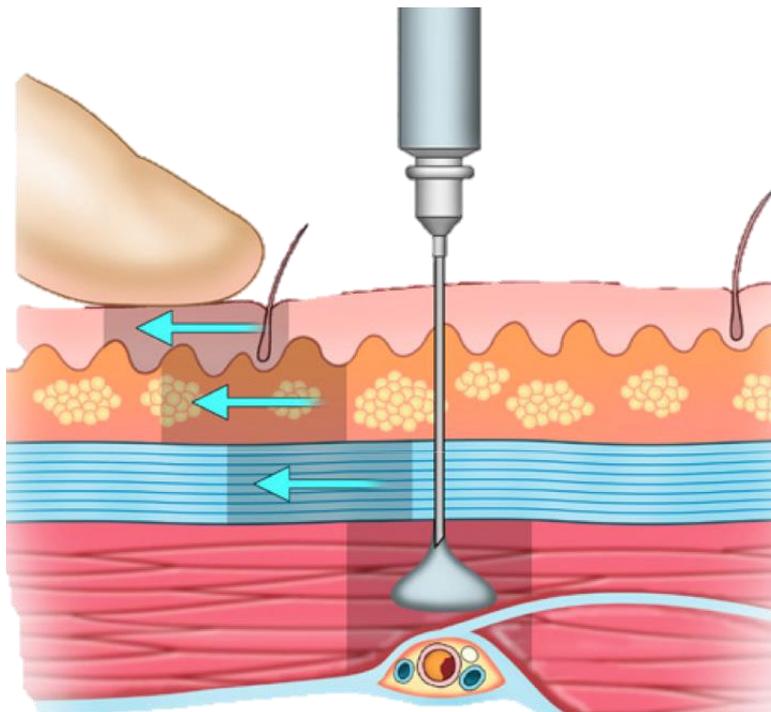
tibiales y peroneos, de acuerdo a la afectación de los territorios angiográficos estudiados. Las alícuotas eran depositadas en un plano de profundidad no inferior a 2 cms. Tras la implantación intramuscular, se procedía a protección de las zonas de punción, indicando reposo con extremidad en cama ligeramente elevada. Se aumentaba la dosis analgésica para control del dolor y se indicaba una analítica sanguínea de control a las 24h del procedimiento.







**Figura 27B:** esquema de implantación intramuscular y formación de depósito celular.  
Tomada de : Ko et al. *Seminars in Vascular Surgery* 2014; 27 (1): 23-31 [ref. 348]





#### **4.7 Métodos: Descripción de métodos de control y evaluación postprocedimiento**

Durante su estancia hospitalaria se realizó la evaluación de las constantes del paciente por turno. Se valoró la movilidad, sensibilidad y perfusión de la extremidad, y el grado de dolor (escala EVA). El paciente debía reiniciar la deambulación a las 24h del procedimiento. Si no existían complicaciones registradas y los parámetros analíticos eran correctos, se procedía al alta administrativa del paciente a las 48h del ingreso. Los controles posteriores se realizaron al primer mes, y trimestralmente hasta llegar al año. A partir de los 12 meses, se realizaron controles semestrales. A partir de los 24 meses los seguimientos fueron anuales, salvo empeoramiento de la clínica del paciente.

Las variables registradas en las visitas de control eran: estudio hemodinámico (ITB) y estudio pletismográfico en aquellos pacientes con índices calcificados. Se registraron los cambios en la Escala Visual Analógica de valoración del dolor (EVA). Se evaluaron los cambios en las lesiones tróficas de aquellos pacientes que las presentaban.

Se individualizó la necesidad de angiografía y se valoró la necesidad de técnicas alternativas de imagen en función de la disponibilidad hospitalaria.

Se registraron todos los posibles signos y síntomas susceptibles de ser considerados complicaciones de la técnica de movilización, aféresis e implantación. Se consideró fracaso del tratamiento la indicación de amputación mayor por cualquiera de las siguientes causas:

- Dolor no controlado a pesar de mórficos.
- Extensión de lesiones tróficas que no permitiesen la reconstrucción del pie para la deambulación independiente.
- Infección de las lesiones que no fueran controladas con desbridamientos y tratamiento antibiótico de amplio espectro.

Las amputaciones menores digitales y transmetatarsianas, no eran consideradas fracaso del tratamiento, puesto que el objetivo primario del tratamiento era evitar la amputación mayor. En el caso de los pacientes fallecidos, se registró el motivo de exitus.

#### **4.8 Métodos: Diseño estadístico**

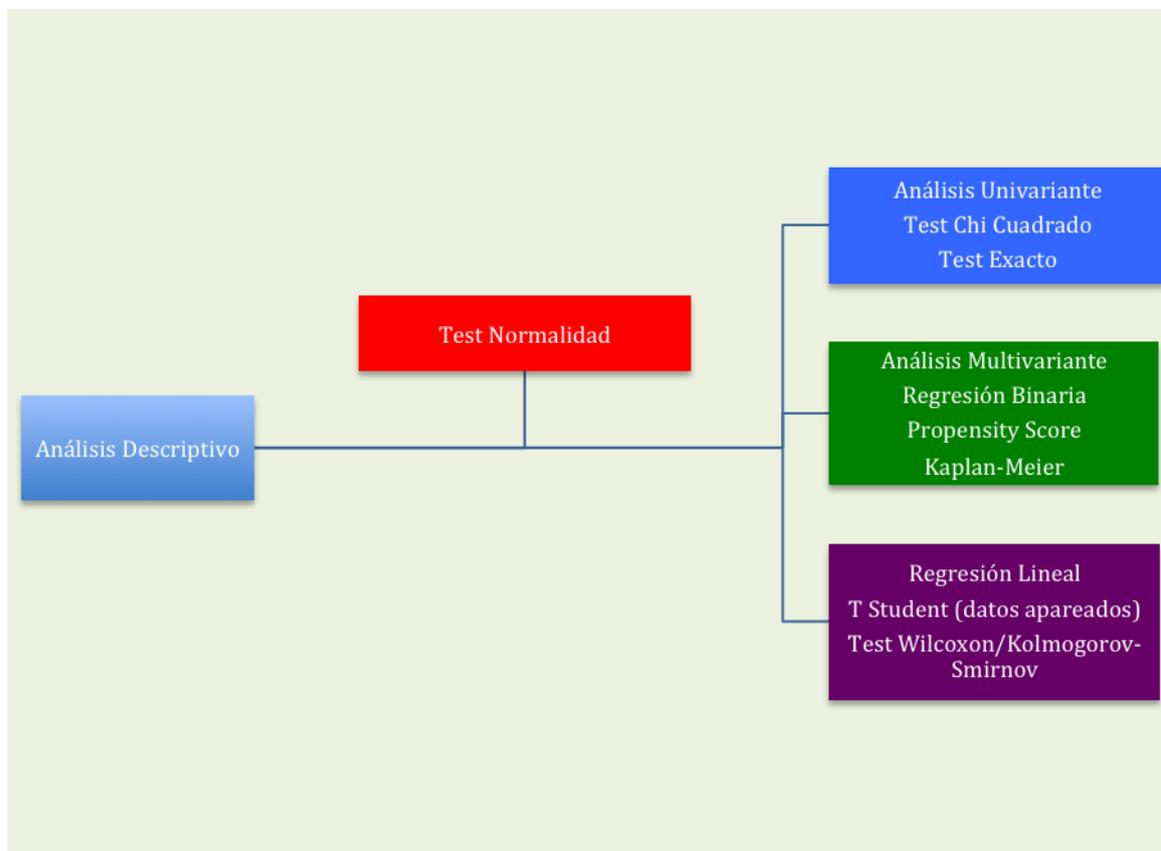
El estudio estadístico se realizó mediante paquete estadístico SPSS versión 21.0 (Statistical Package for Social Sciences: SPSS, Inc., Chicago, IL). Al grupo de pacientes tratados mediante trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos y endoteliales se le denomina *Grupo Angiogénesis*, y al grupo de controles histórico se le denomina *Grupo Control*. Dada la previsible influencia que el antecedente de cirugía de revascularización de miembros inferiores podía tener en cualquiera de los dos grupos, algunos subanálisis se han realizado sobre la población *naïve*, esto es, sin antecedentes de tratamiento quirúrgico previo, y que en adelante denominamos *Grupo Tratamiento Médico*.

El análisis de los datos se estructura de la siguiente forma:

- Estadística descriptiva e inferencial.
- Análisis de Normalidad previa a la valoración de estadísticos a aplicar.
- Probabilidad de Pertenencia a Grupo (Propensity Score) en el análisis global, con el fin de determinar la homogeneidad de los grupos y la ausencia de sesgos de selección.
- Análisis Univariante y Multivariante respecto a variables de Amputación y Exitus.
- Análisis de la Supervivencia mediante método de Kaplan-Meier

Los datos cuantitativos se han expresado como media  $\pm$  desviación estandar. El estudio inferencial se ha realizado mediante análisis Univariante con cálculo del riesgo, asignando significación estadística para valores de  $p \leq 0,05$ . El análisis Multivariante en la población global ha incluido la Probabilidad de Pertencia a Grupo ( Propensity Score ), con el fin de determinar sesgos de selección si los hubiera, asignando significación estadísticas para valores de  $p \leq 0,05$ . Se han establecido estudios de regresión para relacionar parámetros cuantitativos continuos, identificando como correlación positiva niveles de  $R \geq 0,3$  y  $p \leq 0,05$ . En caso de test no paramétricos para variables continuas, se aplicó test de Wilcoxon y test de Kolmogorov-Smirnov. Para el estudio de las tasas de salvamento de extremidad y supervivencia, se han utilizado tablas de Kaplan-Meier , agrupando los resultados por estratos , y asignando significación para log-rank inferior a 0,05.

**Figura 28: diseño del análisis estadístico**



## **RESULTADOS**



## **5. RESULTADOS**

En el periodo comprendido entre diciembre de 2002 y diciembre de 2012, 45 pacientes (n=50 extremidades) con diagnóstico de ICMI sin posibilidades de revascularización, satisfacían los criterios de inclusión y no cumplían criterios de exclusión. Tras ser informados del protocolo de tratamiento con progenitores hematopoyéticos, los pacientes prestaron su consentimiento informado para ser tratados, siendo incluidos en el grupo de tratamiento (grupo Angiogénesis). Como control se empleó una población histórica de pacientes en el periodo comprendido entre diciembre de 1992 y diciembre de 2002, obteniendo 120 pacientes seleccionados como población control. En total, en el periodo comprendido entre 1992 y 2012 se incluyeron a 165 pacientes (170 extremidades) con diagnóstico de ICMI sin posibilidades de revascularización.

### **5.1 Análisis Población Global**

#### 5.1.1 Análisis Descriptivo

La media de edad de nuestra población global fue de  $69,6 \pm 14$  años, con una mayor proporción del sexo masculino (71,5%). El seguimiento medio de la población global fue de  $17 \pm 25,8$  meses [rango intercuartílico 0,33-111,7 meses]. El 83,6% de la población presentaba lesiones tróficas con dolor en reposo asociado. El resto de la distribución de las comorbilidades se describe en la tabla 7. Un 43% de la población global (n=72) no presentaba antecedentes de cirugía de revascularización de miembros inferiores, en el momento del diagnóstico de ICMI. El resto de los individuos estudiados presentaban antecedentes de cirugía de revascularización, siendo el procedimiento de "bypass" el realizado más frecuentemente. La proporción de amputación en la población global durante el periodo de estudio fue del 81,8% (n=135), y la proporción de exitus fue del 32,1% (n=53).

En el análisis por grupos (tabla 8), se apreciaron diferencias significativas en la media de edad de los pacientes tratados (Media de Edad: grupo Angiogénesis  $61,07 \pm 16,08$  años -vs- Control  $72,8 \pm 11,58$  años;  $p=0,001$ ) en la distribución de tabaquismo ( Tabaquismo: Angiogénesis 55,5% -vs- Control 35% ;  $p=0,031$  ) y en la distribución de diabetes ( Diabetes: Angiogénesis 48,89% -vs- Control 73,33% ;  $p=0,005$  ). En comparación con el grupo de Control, en el momento de diagnóstico de ICMI, un mayor número de pacientes del grupo Angiogénesis no presentaban antecedentes de cirugía de revascularización (Sólo tratamiento médico: Angiogénesis 57,7% -vs- Control 37,5%;  $p=0,006$ ). La proporción de amputación de la extremidad, fue menor en los pacientes del grupo Angiogénesis en comparación con la población Control (Amputación Mayor: Angiogénesis 42,2% -vs- Control 96,6%;  $p=0,0001$ ). La proporción de exitus no mostró diferencias significativas entre los grupos estudiados (Exitus: Angiogénesis 28,8% -vs- Control 33,3% ;  $p= 0,709$ )

Tabla 7

DEMOGRAFÍA DE POBLACIÓN GLOBAL

Resultados expresados en:

- media, desviación estándar y rango, para variables numéricas continuas
- porcentaje y valor absoluto para variables categóricas

Población Global	N=165		
- grupo Control	n=120		
- grupo Angiogénesis	n= 45		
<b>Edad</b>	69,6 ± 14 años	[22-92]	
<b>Sexo</b>	Masculino	71,5%	(n=118)
	Femenino	28,5%	(n=47)
<b><u>Diagnóstico (Leriche-Fontaine)</u></b>			
	Grado III	16,4%	(n=27)
	Grado IV	83,6%	(n=138)
<b><u>Factores de riesgo vascular</u></b>			
	Tabaquismo		
	Fumador	40%	(n=66)
	Exfumador	20,6%	(n=34)
	Nunca han fumado	39,4%	(n=64)
	Diabetes Mellitus	66,7%	(n=110)
	Hipertensión Arterial	61,8%	(n=102)
	Dislipemia	37,6%	(n=62)
<b><u>Comorbilidades</u></b>			
	Cardiopatía		
	Insuficiencia cardíaca	12,1%	(n=20)
	Cardiopatía isquémica	20,6%	(n=34)
	Cardiopatía valvular	10,9%	(n=18)
	Cardiopatía arritmogénica	29,7%	(n=49)
	Corrección quirúrgica	13,3%	(n=22)
	Neumopatía	30,9%	(n=51)
	Asma	n= 3	
	EPOC	n=41	
	SAHS	n= 1	
	TEP	n= 1	
	Restrictivas	n= 5	
	O <sub>2</sub> crónica	n= 7	
	Hepatopatía	13,3%	(n=22)
	VHB	n=2	
	VHC	n=6	
	Cirrosis Alcohólica	n=8	
	Litiasis Biliar	n=6	
	Nefropatía	30,9%	(n=52)
	Creatinina >1,5mg/dl	n=29	
	Hemodiálisis	n=23	
	Neurológico	14,6%	(n=24)
	AIT	n=20	
	Ictus	n= 4	

(Continuación tabla 7 : demografía población total)

**Antecedentes Vasculares**

Arteriosclerosis obliterante	89,6%	(n=149)
Tromboangeitis obliterante	9,7%	(n=16)

**Tratamientos**

Sólo tratamiento médico	43%	(n=72)
Cirugía de revascularización ( n° de procedimientos )		

Menor o igual a 2 n=67

Más de 3 n=26

Tipo de procedimientos

Bypass n=66

Endovascular n=29

Farmacológicos

- Antiagregante 65,9% (n=108)

- Anticoagulante 47,6% (n=78)

- Antiagregante+Anticoagulante 12,2% (n=20 )

- Hemorreológico 52,5% (n=86)

- Estatinas 50,3% (n=83)

- Hipotensores 48,5% (n=80)

(IECA / ARA-II)

- Sugiran 17,6% (n= 29)

**Amputación mayor**

81,8% (n=135)

**Exitus**

32,1% (n= 53)

**ABREVIATURAS**

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

SAHS: Síndrome de Apnea Hipopnea del Sueño

TEP: Tromboembolismo Pulmonar

VHB / VHC: Virus Hepatitis B/C

AIT: Accidente Isquémico Transitorio

IECA: Inhibidor de Enzima Conversora de Angiotensina

ARA-II: Antagonista Receptor Angiotensina-II

**Tabla 8**  
**DEMOGRAFÍA DESCRIPTIVA: ANÁLISIS POR GRUPOS**

Datos expresados en media, desviación estándar, valor absoluto y (porcentaje)

	<b>ANGIOGENESIS</b> (n=45)	<b>CONTROLES</b> (n=120)	<b>p</b>
<b><u>Edad (años)</u></b>	61,07±16,08	72,88±11,58	0,001
<b><u>Sexo</u></b>			
Masculino	35 (77,7%)	83 (69,16%)	0,185
Femenino	10 (22,3%)	37 (30,84%)	
<b><u>Factores de Riesgo Vascular</u></b>			
Tabaquismo	25 (55,5%)	42 (35%)	0,031
Diabetes	22 (48,89%)	88 (73,33%)	0,005
Tipo			
1	6 (27,27%)	26 (29,54%)	
2	16 (72,72%)	62 (70,46%)	
Hipertensión	26 (57,77%)	76 (63,33%)	0,717
Dislipemia	19 (42,22%)	43 (35,83%)	0,468
<b><u>Comorbilidades</u></b>			
Cardiopatía			
- Insuficiencia cardiaca	6 (13,33%)	14 (11,66%)	0,789
- Cardiopatía isquémica	10 (22,22%)	24 (20%)	0,671
- Cardiopatía valvular	7 (15,55%)	11 (9,16%)	0,261
- Cardiopatía arritmogénica	8 (17,78%)	41 (34,16%)	0,055
- Corrección quirúrgica	7 (15,55%)	15 (12,5%)	0,608
Neumopatía	13 (28,88%)	38 (31,66%)	0,851
Hepatopatía	4 (3,33%)	18 (15%)	0,441
Nefropatía			0,013
- IRC	5 (11,11%)	25 (20,83%)	
- Hemodiálisis	1 (2,22%)	22 (18,33%)	
Neuropatía			0,190
- AIT	3 (6,66%)	17 (14,16%)	
- Ictus	0	4 (3,33%)	
<b><u>Antecedentes Vasculares</u></b>			0,0001
- Arteriosclerosis	33 (73,33%)	116 (96,66%)	
- Tromboangeitis/Buerger	12 (26,66%)	4 (3,33%)	
<b><u>Tratamiento revascularizador</u></b>			0,006
- Sólo tratamiento médico	26 (57,77%)	46 (38,3%)	
- Bypass	18 (40%)	48 (40%)	
- Endovascular	1 (2,22%)	27 (22,5%)	
<b><u>Tratamiento Farmacológico</u></b>			0,009
- Antiagregación (AG)	37 (82,22%)	72 (60%)	
- Adiro	34 (75,55%)	61 (50,83%)	
- Clopidogrel	2 (4,44%)	4 (3,33%)	
- Trifusal	0	2 (1,66%)	
- Doble *	1 (2,22%)	1 (0,83%)	
(* Adiro + Clopidogrel)			

(Continuación tabla 8: Análisis por grupos)

- Anticoagulante (AC)	17 (37,77%)	61 (50,83%)	0,162
- Oral (ACO)	11 (24,44%)	42 (35%)	
- HBPM	6 (13,33%)	19 (15,83%)	
- AG + AC	9 (20%)	11 (9,16%)	0,066
- con ACO	3 (6,67%)	5 (4,16%)	
- con HBPM	6 (13,33%)	6 (5%)	
- Hemorreológico	24 (53,33%)	62 (51,66%)	0,863
- Pentoxifilina	15 (33,33%)	62 (51,66%)	
- Nafthidrofurilo	0	0	
- Cilostazol	9 (20%)	0	
- Estatina	21 (45,65%)	62 (51,66%)	0,603
- Hipotensores (IECAS/ARA-II)	24 (53,33%)	55 (45,83%)	0,484
- Vasodilatadores	10 (22,22%)	19 (15,83%)	0,362
- Sugiran	10	19	
- Bosentan	0	0	
<b><u>Amputación Mayor de Extremidad</u></b>	19 (42,22%)	116 (96,66%)	0,0001
<b><u>Exitus</u></b>	13 (28,88%)	40 (33,33%)	0,709

#### ABREVIATURAS

IRC: Insuficiencia Renal Crónica

AIT: Accidente Isquémico Transitorio

HBPM: Heparina Bajo Peso Molecular

IECA: Inhibidores de Enzima Conversora de Angiotensina

ARA-II: Antagonista Receptor Angiotensina –II

### 5.1.2 Análisis Univariante y Multivariante sobre variable Amputación

En el análisis Univariante (tabla 9), se apreció una mayor frecuencia de amputación en los pacientes diabéticos (Diabéticos 88,2% -vs- No diabéticos 69,1% RR 3,3 IC95% 1,479-7,532 p=0,005) y en aquellos con hepatopatía crónica B o C (Hepatopatía 100% -vs- No hepatopatía 78,8%. RR 1,205 IC95% 1,117-1,301 p=0,009). Por el contrario, la frecuencia de amputación fue menor en los pacientes sometidos a trasplante autólogo de células progenitoras hematopoyéticas y endoteliales (Angiogénesis 42,2% -vs- Control 96,6%. RR 0,025 IC95% 0,008-0,080 p=0,000). Los pacientes con diagnóstico clínico y arteriográfico de enfermedad de Buerger también presentaron menor frecuencia de amputación (Buerger 43,7% -vs- No Buerger 85,9% RR 0,128 IC95% 0,043-0,380 p=0,0001).

En el análisis Multivariante (tabla 10), la diabetes mellitus se identificó como factor de riesgo de amputación mayor (OR 7,240 IC95% mín 2,176 máx 24,093 p=0,001), mientras que el tratamiento con progenitores hematopoyéticos (Angiogénesis) fue identificado como factor protector (OR 0,008 IC95% mín 0,001 máx 0,069 p=0,000).

No se detectó sesgo de selección en el cálculo del Propensity Score (OR 22,722 IC95% mín 0,556 máx 927,859 p=0,099).

Tabla 9

ANÁLISIS UNIVARIANTE POBLACIÓN GLOBAL: AMPUTACIÓN

Amputados población global n = 135

Dentro del factor analizado, entre paréntesis se muestra el valor absoluto de la condición cualitativa analizada (Si/No). Resultados expresados en valor absoluto y porcentaje, respecto de la variable independiente Amputación = SI.

			<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC95%</b>
<b>AMPUTACION = SI</b>					
<b><u>Sexo</u></b>					
	Masculino (n=118)	Femenino (n=47)			
	98 (83%)	37 (78 %)	0,51	0,755	0,323-1,763
<b><u>Fumador</u></b>					
	Si (n=67)	No (n=98)			
	54 (80,6%)	81 (82,6%)	0,84	0,872	0,392-1,940
<b><u>Diabetes</u></b>					
	Si (n=110)	No (n=55)			
	97 (88,2%)	38 (69,1%)	0,005	3,338	1,479-7,532
<b><u>HTA</u></b>					
	Si (n=102)	No (n=63)			
	87 (85,3%)	48 (76,2%)	0,151	1,813	0,816-4,025
<b><u>DLP</u></b>					
	Si (n=62)	No (n=103)			
	51 (82,2%)	84 (81,5%)	1,000	1,049	0,462-2,381
<b><u>ICA</u></b>					
	Si (n=20)	No (n=145)			
	15 (75%)	120 (82,7%)	0,369	0,625	0,208-1,878
<b><u>CI</u></b>					
	Si (n=34)	No (n=131)			
	27 (79,4%)	108 (82,4%)	0,803	0,821	0,319-2,114
<b><u>CV</u></b>					
	Si (n=18)	No (n=147)			
	14 (77,7%)	121 (82,3%)	0,745	0,752	0,229-2,470
<b><u>CA</u></b>					
	Si (n=49)	No (n=116)			
	43 (87,7%)	92 (79,3%)	0,270	1,870	0,712-4,908
<b><u>CQ</u></b>					
	Si (n=22)	No (n=143)			
	16 (72,7%)	119 (83,2%)	0,242	0,538	0,191-1,515

(Continuación Tabla 9: Análisis Univariante población global: Amputación)

			<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC95%</b>
<b>AMPUTACIÓN = SI</b>					
<b><u>NM</u></b>	Si (n=51) 44 (86,2%)	No (n=114) 91 (79,8%)	0,387	1,589	0,635-3,984
<b><u>O2cron</u></b>	Si (n=7) 7 (100%)	No (n=158) 128 (81%)	0,352	1,055	1,014-1,097
<b><u>HP</u></b>	Si (n=23) 23 (100%)	No (n=142) 112 (78,8%)	0,009	1,205	1,117-1,301
<b><u>IRC</u></b>	Si (n=51) 45 (88,2%)	No (n=114) 90 (78,9%)	0,192	2,000	0,763-5,242
<b><u>NRL</u></b>	Si (n=5) 4 (80%)	No (n=160) 131 (81,8%)	0,082	5,955	0,772-45,954
<b><u>Buerger</u></b>	Si (n=16) 7 (43,7%)	No (n=149) 128 (85,9%)	0,000	0,128	0,043-0,380
<b><u>Numero procedimientos quirúrgicos previos</u></b>					
	Tto médico (n=72) 52 (72,2%)				
	<=2 procedimientos (n=67) 58 (86,6%)		0,011		
	>=3 procedimientos (n=26) 25 (96,1%)				
<b><u>Solo Tratamiento Médico (sin posibilidad de tratamiento quirúrgico revascularizador)</u></b>					
	Si (n=72) 52 (72,2%)	No (n=93) 83 (89,2%)	0,008	0,313	0,136-0,722
<b><u>AG</u></b>	Si (n=109) 86 (78,9%)	No (n=56) 49 (87,5%)	0,206	0,534	0,214-1,335
<b><u>AC</u></b>	Si (n=78) 67 (85,9%)	No (n=87) 68 (78,1%)	0,229	1,702	0,753-3,847
<b><u>AG+AC</u></b>	Si (n=20) 16 (80%)	No (n=145) 119 (82%)	0,763	0,874	0,270-2,830

(Continuación Tabla 9: Análisis Univariante Poblacion Global: Amputación )

		<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC 95%</b>
<b>AMPUTACIÓN = SI</b>				
<b><u>Hemorreológico</u></b>				
Si (n=86)	No (n=79)			
75 (87,2%)	60 (75,9%)	0,071	2,159	0,954-4,885
<b><u>Estatina</u></b>				
Si (n=83)	No (n=82)			
71 (85,5%)	64 (78%)	0,232	1,664	0,744-3,721
<b><u>ARA-II</u></b>				
Si (n=21)	No (n=144)			
14 (66,6%)	121 (84%)	0,069	0,380	0,138-1,045
<b><u>IECA</u></b>				
Si (n=59)	No (n=106)			
49 (83%)	86 (81,1%)	0,835	1,140	0,494-2,630
<b><u>Sugiran</u></b>				
Si (n=29)	No (n=136)			
23 (79,3%)	112 (n=82,3%)	0,791	0,821	0,302-2,235
<b><u>Triple Terapia (Antiagregante+Estatina+Hipotensor)</u></b>				
Si (n=56)	No (n=109)			
48 (85,7%)	87 (79,8%)	0,401	1,517	0,628-3,667
<b><u>Terapia Angiogénica</u></b>				
Si (n=45)	No (n=120)			
19 (42,2%)	116 (96,6%)	0,000	0,025	0,008-0,080

**Abreviaturas:**

ADO: antidiabético oral; HTA : hipertensión arterial; DLP: dislipemia; ICA: insuficiencia cardíaca; CI: cardiopatía isquémica; CV: cardiopatía valvular; CA: cardiopatía arritmogénica; CQ: corrección quirúrgica de la cardiopatía; NM: neumopatía crónica tipo bronquitis o enfisema; O2cron: oxigenoterapia crónica; HP: hepatopatía virus hepatitis B/C crónica; IRC: insuficiencia renal crónica/nefropatía crónica; NRL: antecedente neurológico isquémico Ictus/AIT; AG: antiagregante; AC:anticoagulante; AG+AC: antiagregante+anticoagulante; ARA-II: antagonista de receptor de Angiotensina-II; IECA: inhibidor de la enzima conversora de angiotensina.

Tabla 10

ANÁLISIS MULTIVARIANTE POBLACIÓN GLOBAL: AMPUTACIÓN

Amputados población global n = 135

Cálculo Multivariante con inclusión de la Probabilidad de Pertenencia a Grupo Angiogénesis (Propensity Score Angiogénesis)

	Variables en la ecuación							
	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95% para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Angiogénesis	-4,806	1,088	19,519	1	0,000	0,008	0,001	0,069
Diabetes	1,980	0,613	10,415	1	0,001	7,240	2,176	24,093
Hepatopatía	23,806	6192,686	0,000	1	0,997	2,181E+10	0,000	.
Neuropatía	0,626	1,258	0,248	1	0,619	1,870	0,159	22,013
Buerger	-1,958	1,359	2,078	1	0,149	0,141	0,010	2,023
Ttomédico	-1,029	0,711	2,095	1	0,148	0,357	0,089	1,440
Nefropatía	1,145	0,833	1,887	1	0,170	3,142	0,613	16,094
Hemorreológico	2,982	0,821	13,198	1	0,000	19,721	3,947	98,522
Estatinas	0,818	0,628	1,698	1	0,193	2,265	0,662	7,749
ARA-II	-1,476	1,093	1,823	1	0,177	0,228	0,027	1,948
PScoreAngiogénesis	3,123	1,893	2,723	1	0,099	22,722	0,556	927,859

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: Angiogénesis, Diabetes, Hepatopatía, Neuro, Buerger, ttomédico, Nefropatía, Hemorreológico, Estatinas, ARA-II, PScoreAngiogénesis.

Resumen del modelo			
Paso 1	-2 log de la verosimilitud	R cuadrado de Cox y Snell	R cuadrado de Nagelkerke
	69,942 <sup>a</sup>	0,618	0,824

Prueba de Hosmer y Lemeshow		
Paso 1	Chi cuadrado	Sig.
	6,471	0,595

### 5.1.3 Análisis Univariante y Multivariante sobre variable Exitus

Dentro del análisis Univariante (tabla 11), se apreció una mayor mortalidad entre los pacientes con Insuficiencia cardíaca (ICA 60% -vs- No ICA 28,3% RR 3,8 IC95% 1,45-9,985 p=0,009), Cardiopatía isquémica (CI 47% -vs- No CI 28,2 % RR 2,258 IC95% 1,042-4,894 p=0,042), antecedente de Cirugía cardíaca (CQ 54,5% -vs- No CQ 28,7% RR2,985 IC95% 1,197-7,447 p=0,025), y en pacientes con Insuficiencia Renal Crónica (IRC 49% -vs- No IRC 24,6% RR 2,953 IC95% 1,474-5,919 p=0,004). Aquellos pacientes que no tenían antecedentes de cirugía de revascularización de miembros inferiores, también presentaron mayor mortalidad en comparación con los presentaban algún intento revascularizador previo (Sólo tratamiento médico 45,8% -vs- Cirugía revascularizadora previa 21,5% RR 3,088 IC95% 1,568-6,084 p=0,001). Por el contrario, los pacientes con diagnóstico clínico y arteriográfico de enfermedad de Buerger, presentaron menor mortalidad (Buerger 0% -vs- No Buerger 35,6% RR 0,857 IC95% 0,795-0,924 p=0,002 )

En el análisis Multivariante (tabla 12), los pacientes sin antecedentes de cirugía de revascularización de miembros inferiores, fueron identificados como grupo de riesgo para la variable exitus (OR 2,728 IC95% mín 1,271 máx 5,854 p=0,01). No se identificó ningún otro factor de riesgo para la variable exitus dentro de la población global. No se identificó sesgo de selección en el cálculo del Propensity Score (OR 1,99 IC95% mín0,285 máx 13,881 p=0,487).

TABLA 11

ANÁLISIS UNIVARIANTE POBLACIÓN GLOBAL: EXITUS

Exitus población global n=53

Dentro del factor analizado, entre paréntesis se muestra el valor absoluto de la condición cualitativa analizada (Si/No). Resultados expresados en valor absoluto y porcentaje, respecto de la variable independiente Exitus = SI.

			<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC95%</b>
<b>EXITUS = SI</b>					
<b><u>Sexo</u></b>					
	Masculino (n=118)	Femenino (n=47)			
	34 (28,8%)	19(40,4%)	0,196	1,676	0,828-3,395
<b><u>Fumador</u></b> Si (n=67) No (n=98)					
	13 (19,4%)	40 (40,8%)	0,004	1,913	1,172-3,122
<b><u>Diabetes</u></b> Si (n=110) No (n=55)					
	37 (33,6%)	16 (29,1%)	0,599	1,235	0,611-2,497
<b><u>HTA</u></b> Si (n=102) No (n=63)					
	37 (36,2%)	16 (25,4%)	0,171	1,672	0,833-3,355
<b><u>DLP</u></b> Si (n=62) No (n=103)					
	21 (33,8%)	32 (31,1%)	0,733	1,136	0,581-2,224
<b><u>ICA</u></b> Si (n=20) No (n=145)					
	12 (60%)	41 (28,3%)	0,009	3,805	1,450-9,985
<b><u>CI</u></b> Si (n=34) No (n=131)					
	16 (47%)	37 (28,2%)	0,042	2,258	1,042-4,894
<b><u>CV</u></b> Si (n=18) No (n=147)					
	7 (38,8%)	46 (31,3%)	0,594	1,397	0,509-3,835
<b><u>CA</u></b> Si (n=49) No (n=116)					
	16 (32,7%)	37 (31,9%)	1,000	1,035	0,507-2,113
<b><u>CQ</u></b> Si (n=22) No (n=143)					
	12 (54,5%)	41 (28,7%)	0,025	2,985	1,197-7,447
<b><u>NM</u></b> Si (n=51) No (n=114)					
	19 (37,2%)	34 (29,8%)	0,371	1,397	0,697-2,800

(Continuación Tabla 11: ANÁLISIS UNIVARIANTE POBLACIÓN GLOBAL: EXITUS)

			<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC95%</b>
<b>EXITUS = SI</b>					
<b><u>O2cron</u></b>	Si (n=7) 2 (28,6%)	No (n=158) 51 (32,3%)	1,000	0,839	0,157-4,473
<b><u>HP</u></b>	Si (n=23) 5 (21,7%)	No (n=142) 48 (33,8%)	0,338	0,544	0,190-1,555
<b><u>IRC</u></b>	Si (n=51) 25 (49%)	No (n=114) 28 (24,6%)	0,004	2,953	1,474-5,919
<b><u>NRL</u></b>	Si (n=24) 8 (33,3%)	No (n=141) 45 (31,9%)	1,000	1,067	0,425-2,675
<b><u>Buerger</u></b>	Si (n=16) 0	No (n=149) 53 (35,6%)	0,002	0,857	0,795-0,924
<b><u>Número de procedimientos quirúrgicos previos</u></b>			0,004		
Tto médico (n=72) 32 (44%)					
<=2 procedimientos (n=67) 15 (22,4%)					
>=3 procedimientos (n=26) 5 (19,2%)					
<b><u>Tipo de intervención vascular</u></b>			0,006		
Bypass (n=67) 14 (20,9%)					
Endovascular (n=31) 7 (22,6%)					
<b><u>Solo Tratamiento Médico (sin antecedente de tratamiento quirúrgico revascularizador)</u></b>					
	Si (n=72) 33 (45,8%)	No (n=93) 20 (21,5%)	0,001	3,088	1,568-6,084

(Continuación Tabla 11: ANÁLISIS UNIVARIANTE POBLACIÓN GLOBAL: EXITUS)

			<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC95%</b>
<b>EXITUS = SI</b>					
<b><u>AG</u></b>	Si (n=109) 34 (31,2%)	No (n=56) 19 (34%)	0,728	0,883	0,445-1,753
<b><u>AC</u></b>	Si (n=78) 28 (35,9%)	No (n=87) 25 (28,7%)	0,404	1,389	0,721-2,675
<b><u>AG+AC</u></b>	Si (n=20) 8 (40%)	No (n=145) 45 (31%)	0,449	1,481	0,567-3,874
<b><u>Hemorreológico</u></b>					
	Si (n=86) 16 (18,6%)	No (n=79) 37 (46,8%)	0,000	0,259	0,129-0,523
<b><u>Estatina</u></b>	Si (n=83) 29 (34,9%)	No (n=82) 24 (29,3%)	0,506	1,298	0,674-2,500
<b><u>ARA-II</u></b>	Si (n=21) 7 (33,3%)	No (n=144) 46 (31,9%)	1,000	1,065	0,403-2,817
<b><u>IECA</u></b>	Si (n=59) 25 (42,3%)	No (n=106) 28 (26,4%)	0,039	2,048	1,045-4,015
<b><u>Sugiran</u></b>	Si (n=29) 6 (20,6%)	No (n=136) 47 (34,5%)	0,190	0,494	0,188-1,297
<b><u>Triple Terapia (Antiagregante+Estatina+Hipotensor)</u></b>					
	Si (n=56) 22 (39,3%)	No (n=109) 31 (28,4%)	0,164	1,628	0,826-3,210
<b><u>Terapia Angiogénica</u></b>					
	Si (n=45) 13 (28,9%)	No (n=120) 40 (33,3%)	0,709	0,813	0,385-1,717

**Abreviaturas:**

ADO: antidiabético oral; HTA : hipertensión arterial; DLP: dislipemia; ICA: insuficiencia cardíaca; CI: cardiopatía isquémica; CV: cardiopatía valvular; CA: cardiopatía arritmogénica; CQ: corrección quirúrgica de la cardiopatía; NM: neumopatía crónica tipo bronquitis o enfisema; O2cron: oxigenoterapia crónica; HP: hepatopatía virus hepatitis B/C crónica; IRC: insuficiencia renal crónica/nefropatía crónica; NRL: antecedente neurológico isquémico Ictus/AIT; AG: antiagregante; AC:anticoagulante; AG+AC: antiagregante+anticoagulante; ARA-II: antagonista de receptor de Angiotensina-II; IECA: inhibidor de la enzima convertora de angiotensina.

TABLA 12

ANÁLISIS MULTIVARIANTE POBLACIÓN GLOBAL: EXITUS

Exitus población global n = 53

Cálculo Multivariante con inclusion de la Probabilidad de Pertenencia a Grupo Angiogénesis (Propensity Score Angiogénesis)

	Variables en la ecuación							
	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95% para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Fumador	-0,623	0,436	2,039	1	0,153	0,536	0,228	1,261
InsuficienciaCardiaca	0,027	0,596	0,002	1	0,964	1,027	0,320	3,302
Cardiopatía	0,412	0,523	0,620	1	0,431	1,510	0,542	4,207
Cardiopatíaoperada	0,243	0,649	0,141	1	0,708	1,275	0,358	4,546
Nefropatía	0,613	0,477	1,652	1	0,199	1,846	0,725	4,700
Buerger	-20,935	9454,511	0,000	1	0,998	0,000	0,000	.
ttomedico	1,003	0,390	6,632	1	0,010	2,728	1,271	5,854
Hemorreo	-1,633	0,387	17,787	1	0,000	0,195	0,091	0,417
Hipotensores	-0,595	0,428	1,931	1	0,165	0,551	0,238	1,277
Vasodilat	-0,913	0,573	2,538	1	0,111	0,401	0,131	1,234
PscoreAngiogenesis	0,688	0,991	0,482	1	0,487	1,990	0,285	13,881

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: Fumador, Insuficiencia Cardiaca, Cardiopatía Isquémica, Cardiopatía operada, Nefropatía, Buerger, Ttomedico, Hemorreo, Hipotensores, Vasodilatador ( Sugiran ), Propensity Score Angiogenesis.

Resumen del modelo			
Paso 1	-2 log de la verosimilitud	R cuadrado de Cox y Snell	R cuadrado de Nagelkerke
	158,843 <sup>a</sup>	0,345	0,460

Prueba de Hosmer y Lemeshow			
Paso 1	Chi cuadrado	gl	Sig.
	10,829	8	0,212

#### 5.1.4 Tablas de Supervivencia (Kaplan-Meier) : global y por grupos

La tasa de salvamento de Extremidad de la población Global fue del 36,1% a los 12 meses del seguimiento (Figura 29, tabla 13). El resumen del procesamiento de los casos, y la tabla de eventos, se expone en el anexo 1 ( tabla 1 )

En el análisis por grupos, se objetivó una mayor tasa de salvamento de extremidad en el grupo Angiogénesis comparado con el grupo Control (media de tiempo en meses: Angiogenesis  $68,7 \pm 7,2$  -vs- Control:  $8,3 \pm 1,03$ ;  $p=0,000$ ). Esta diferencia en la tasa de salvamento de extremidad, se mantuvo durante el seguimiento de los grupos, alcanzándose un *plateau* en la incidencia de amputación en el grupo Angiogénesis a partir de los 60 meses de seguimiento (Figura 30, Tablas 14 15). El resumen del procesamiento de los casos, y la tabla de eventos, se expone en el anexo 1 ( tabla 2 )

Respecto a la mortalidad, la tasa de supervivencia global a los 12 meses fue del 72,4% (figura 31, tabla 16). Si bien la mortalidad fue similar entre los dos grupos al final del seguimiento, la mortalidad de los pacientes del grupo control se produjo en un menor tiempo desde el diagnóstico, en comparación con los pacientes del grupo Angiogénesis (media de tiempo en meses Angiogénesis:  $79,5 \pm 6,7$  -vs- Control:  $28,7 \pm 3,9$ ;  $p=0,000$ ) (Figura 32, tabla 17) . El resumen del procesamiento de los casos, y la tabla de eventos, se expone en el anexo 1 ( tablas 3 y 4 )

**Figura 29: Tasa de salvamento de extremidad. Análisis Global**

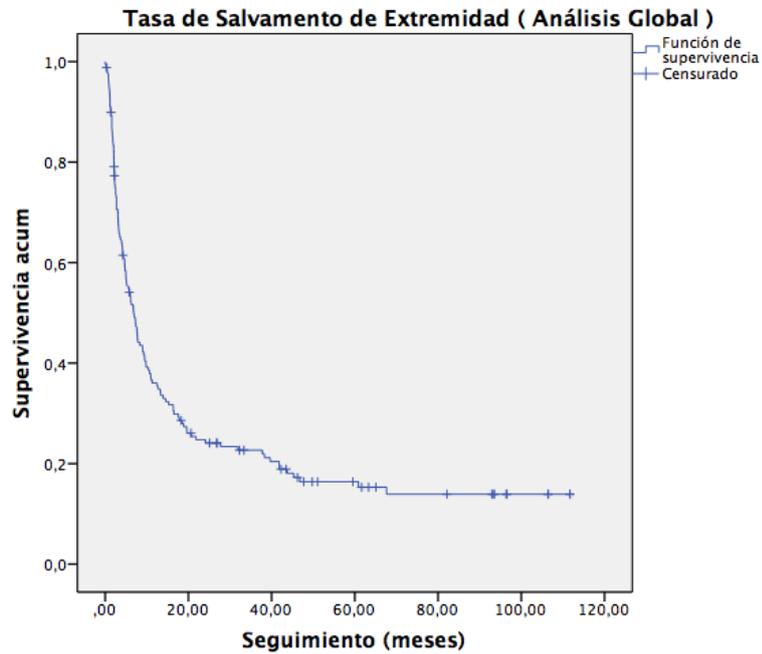


Tabla 13: medias y medianas de tiempo de salvamento de extremidad.

Medias y medianas del tiempo de supervivencia							
Media <sup>a</sup>				Mediana			
Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
24,936	3,046	18,967	30,906	6,867	0,949	5,007	8,726

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

**Figura 30: Tasa de Salvamento de Extremidad. Análisis por grupos.**

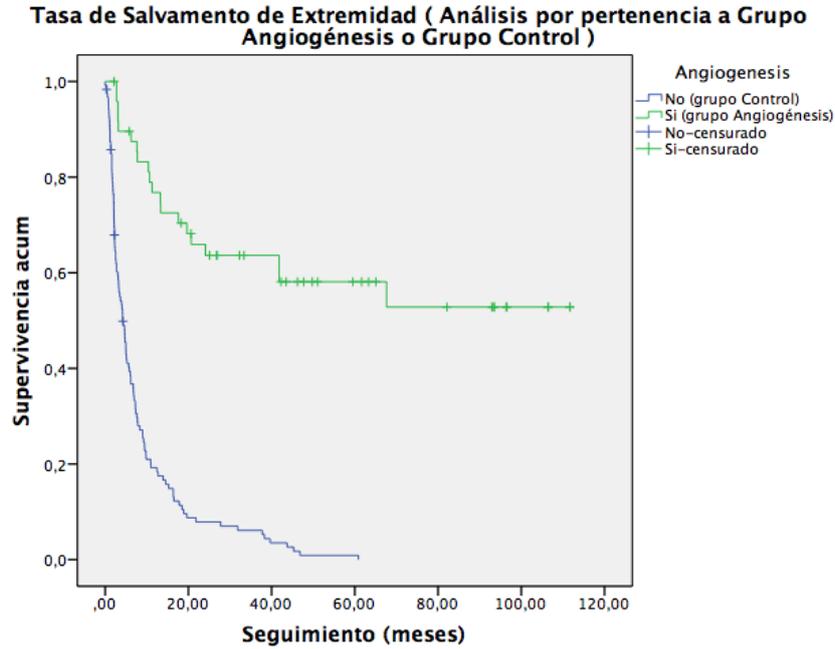


Tabla 14: medias y medianas de tiempo de salvamento de extremidad

Medias y medianas del tiempo de supervivencia								
Angiogénesis	Media <sup>a</sup>				Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
No	8,318	1,035	6,289	10,347	4,200	0,600	3,023	5,377
Si	68,742	7,264	54,505	82,980	.	.	.	.
Global	24,936	3,046	18,967	30,906	6,867	0,949	5,007	8,726

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Tabla 15: análisis comparativo de la tasa de salvamento de extremidad.

Angiogénesis	Seguimiento en meses	Controles
76,8%	12	18,4%
63,6%	24	7,9%
63,6%	36	5,2%
58,1%	48	0,9%
58,1%	60	0%

Tabla 16: Tasa Salvamento de extremidad. Estadísticos de comparación.

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	74,766	1	0,000
Breslow (Generalized Wilcoxon)	52,473	1	0,000
Tarone-Ware	62,743	1	0,000

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de Angiogenesis .

Figura 31: Tasa de Supervivencia. Análisis Global

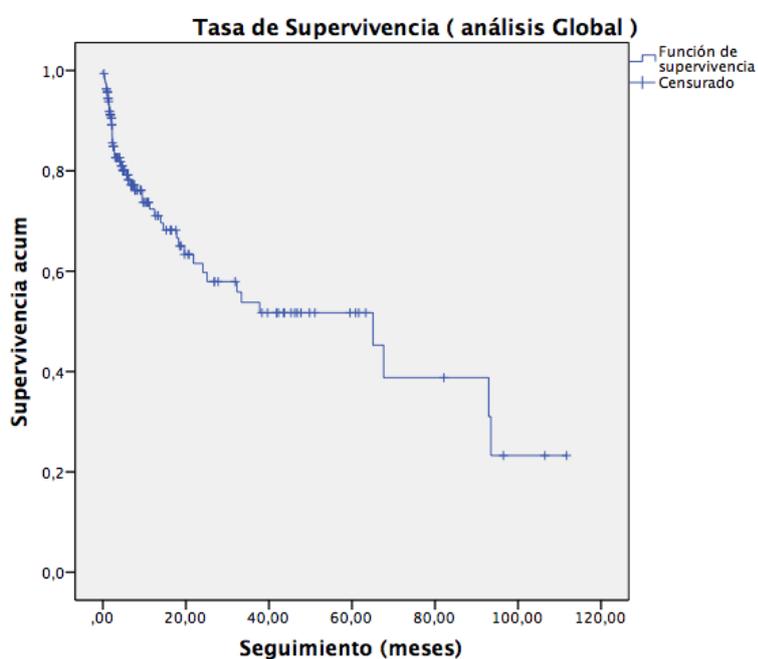


Tabla 17: medias y medianas de tiempo de supervivencia global.

Medias y medianas del tiempo de supervivencia							
Media <sup>a</sup>				Mediana			
Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
54,971	5,749	43,702	66,240	65,067	16,528	32,672	97,461

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

**Figura 32: Tasa de supervivencia. Análisis por grupos.**

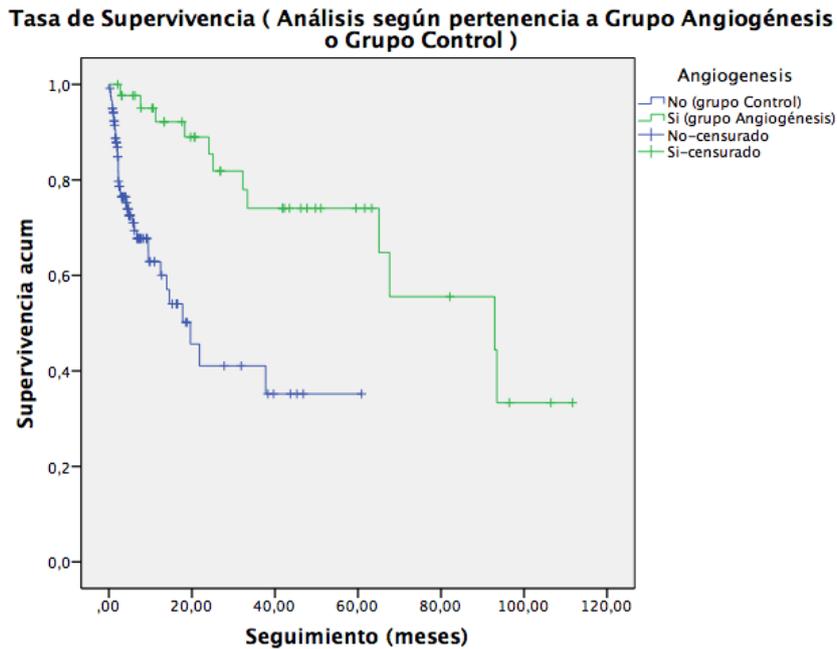


Tabla 17: medias y medianas de tiempo de supervivencia.

Medias y medianas del tiempo de supervivencia								
Angiogénesis	Media <sup>a</sup>				Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
No	28,732	3,917	21,056	36,409	19,633	3,938	11,915	27,352
Si	75,700	7,643	60,721	90,680	92,933	32,580	29,077	156,789
Global	54,971	5,749	43,702	66,240	65,067	16,528	32,672	97,461

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Tabla 18: Tasa de supervivencia. Estadísticos de comparación.

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	16,968	1	0,000
Breslow (Generalized Wilcoxon)	15,599	1	0,000
Tarone-Ware	16,941	1	0,000

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de Angiogénesis .

## **5.2 Análisis del grupo Control**

Contamos con una población control de 120 pacientes, con una media de edad de  $72,8 \pm 11,5$  años y una mayor proporción de sexo masculino (69,1%). El seguimiento medio fue de  $8,01 \pm 10,9$  meses [0,1 - 60,8 meses]. El 85% de los pacientes presentaban lesiones tróficas. Un 38,3% de los pacientes no presentaban antecedentes de cirugía de revascularización en el momento del diagnóstico. La prevalencia de amputación de extremidad en la población control fue del 96,6% (n=116) y la prevalencia de exitus al final del seguimiento fue del 33,3% (n=40). El resto de la distribución de comorbilidades se expone en la tabla 8 del apartado 6.1.1.

### 5.2.1 Análisis Univariante y Multivariante sobre la variable amputación.

En el análisis Univariante de la población control respecto a la variable amputación (tabla 20), se apreció una mayor prevalencia de amputación entre los pacientes hipertensos (HTA 100% -vs- No HTA 90,9% RR 0,909 IC95% 0,828-0,998 p=0,017) y en tratamiento hemorreológico (tratamiento hemorreológico: Si 100% -vs- No 93,1% RR 0,931 IC95% 0,868-0,999 p=0,052). El análisis Multivariante no identificó variables relacionadas con el riesgo de amputación (tabla 21).

La tasa de salvamento de extremidad se expone en la figura 30, y en las tablas 14 y 15 adjuntas a la figura, así como en la tabla 2 del anexo 1.

Tabla 20

ANÁLISIS UNIVARIANTE POBLACIÓN CONTROL: AMPUTACIÓN

Amputados población control n = 116

Entre paréntesis se muestra el valor absoluto de la condición cualitativa analizada (Si/No). Resultados expresados en valor absoluto y porcentaje, respecto de la variable independiente Amputación = SI.

			<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC95%</b>
<b>AMPUTACION = SI</b>					
<b>Sexo</b>	Masculino (n=83)	Femenino (n=37)			
	82 (98,79%)	34 (91,89%)	0,087	0,138	0,014-1,376
<b>Diagnóstico</b>	Grado III (n=18)	Grado IV (n=102)			
	18 (100%)	98 (96,07%)	1,000	1,041	1,001-1,082
<b>Fumador</b>	Si (n=42)	No (n=78)			
	41 (97,61%)	75 (96,15%)	1,000	1,640	0,165-16,275
<b>Diabetes</b>	Si (n=88)	No (n=32)			
	85 (96,59%)	31 (96,87%)	1,000	0,914	0,092-9,118
<b>HTA</b>	Si (n=76)	No (n=44)			
	76 (100%)	40 (90,90%)	0,017	0,909	0,828-0,998
<b>DLP</b>	Si (n=43)	No (n=77)			
	43 (100%)	73 (94,80%)	0,295	0,948	0,900-0,999
<b>ICA</b>	Si (n=14)	No (n=106)			
	14 (100%)	102 (96,22%)	1,000	0,962	0,927-0,999
<b>CI</b>	Si (n=24)	No (n=96)			
	23 (95,83%)	93 (96,87%)	1,000	0,742	0,074-7,465
<b>CV</b>	Si (n=11)	No (n=109)			
	11(100%)	105 (96,33%)	1,000	0,963	0,929-0,999
<b>CA</b>	Si (n=41)	No (n=79)			
	40 (97,56%)	76 (96,20%)	1,000	1,579	0,159-15,675
<b>CQ</b>	Si (n=15)	No (n=105)			
	15 (100%)	101 (96,19%)	1,000	0,962	0,926-0,999

**Continuación Tabla 20: Análisis Univariante población Control: Amputación**

			<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC95%</b>
<b>AMPUTACIÓN = SI</b>					
<b>NM</b>	Si (n=38) 36 (94,73%)	No (n=82) 80 (97,56%)	0,590	0,451	0,061-3,322
<b>O2cron</b>	Si (n=6) 6 (100%)	No (n=114) 110(96,49%)	1,000	0,965	0,932-0,999
<b>HP</b>	Si (n=18) 18 (100%)	No (n=102) 98 (96,07%)	1,000	0,961	0,924-0,999
<b>IRC</b>	Si (n=45) 43 (95,55%)	No (n=75) 73 (97,33%)	0,630	0,589	0,080-4,334
<b>NRL</b>	Si (n=21) 20 (95,23%)	No (n=99) 96 (96,96%)	0,542	0,625	0,062-6,321
<b>Buerger</b>	Si (n=4) 4 (100%)	No (n=116) 112 (96,55%)	1,000	0,966	0,933-0,999
<b>Solo Tratamiento Médico (sin posibilidad de tratamiento quirúrgico revascularizador)</b>					
	Si (n=46) 44 (95,65%)	No (n=74) 72 (97,29%)	0,637	0,611	0,083-4,495
<b>AG</b>	Si (n=72) 71 (98,61%)	No (n=48) 45 (93,75%)	0,301	4,733	0,478-46,918
<b>AC</b>	Si (n=61) 58 (95,08%)	No (n=59) 58 (98,30%)	0,619	0,333	0,032-3,29
<b>AG+AC</b>	Si (n=11) 11 (100%)	No (n=109) 105 (96,33%)	1,000	0,963	0,929-0,999

(Continuación Tabla 20: Análisis Univariante Población Control: Amputación)

			<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC 95%</b>
<b>AMPUTACIÓN = SI</b>					
<b>Hemorreológico</b>					
	Si (n=62)	No (n=58)			
	62 (100%)	54 (93,10%)	0,052	0,931	0,868-0,999
<b>Estatina</b>					
	Si (n=62)	No (n=58)			
	61 (98,38%)	55 (94,82%)	0,352	3,327	0,336-32,933
<b>ARA-II</b>					
	Si (n=11)	No (n=109)			
	11 (100%)	105 (96,33%)	1,000	0,963	0,929-0,999
<b>IECA</b>					
	Si (n=45)	No (n=75)			
	44 (97,77%)	72 (96%)	1,000	1,833	0,185-18,177
<b>Sugiran</b>					
	Si (n=19)	No (n=101)			
	19 (100%)	97 (96,03%)	1,000	0,960	0,923-0,999
<b>Triple Terapia (Antiagregante+Estatina+Hipotensor)</b>					
	Si (n=42)	No (n=78)			
	41 (97,61%)	75 (96,15%)	1,000	1,640	0,165-16,275

**Abreviaturas:**

ADO: antidiabético oral; HTA : hipertensión arterial; DLP: dislipemia; ICA: insuficiencia cardíaca; CI: cardiopatía isquémica; CV: cardiopatía valvular; CA: cardiopatía arritmogénica; CQ: corrección quirúrgica de la cardiopatía; NM: neumopatía crónica tipo bronquitis o enfisema; O2cron: oxigenoterapia crónica; HP: hepatopatía virus hepatitis B/C crónica; IRC: insuficiencia renal crónica/nefropatía crónica; NRL: antecedente neurológico isquémico Ictus/AIT; AG: antiagregante; AC:anticoagulante; AG+AC: antiagregante+anticoagulante; ARA-II: antagonista de receptor de Angiotensina-II; IECA: inhibidor de la enzima convertora de angiotensina.

Tabla 21

ANÁLISIS MULTIVARIANTE POBLACIÓN CONTROL: AMPUTACIÓN

Amputados población Control n = 116

	Variables en la ecuación							I.C. 95% para	
	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	EXP(B)		
							Inferior	Superior	
Fumador(1)	-0,730	1,502	0,236	1	0,627	0,482	0,025	9,155	
InsuficienciaCardiaca(1)	-17,554	8732,486	0,000	1	0,998	0,000	0,000	.	
Nefropatía(1)	2,322	1,551	2,242	1	0,134	10,198	0,488	213,114	
ttomedico(1)	0,321	1,419	0,051	1	0,821	1,379	0,086	22,227	
Hemorreo(1)	-19,647	4144,195	0,000	1	0,996	0,000	0,000	.	
Hipertension(1)	-20,170	3851,701	0,000	1	0,996	0,000	0,000	.	
Constante	56,920	10405,108	0,000	1	0,996	5,248E+24			

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: Hipertension.

Resumen del modelo			
Paso	-2 log de la verosimilitud	R cuadrado de Cox y Snell	R cuadrado de Nagelkerke
1	13,893 <sup>a</sup>	0,162	0,638

a. La estimación ha finalizado en el número de iteración 20 porque se han alcanzado las iteraciones máximas. No se puede encontrar una solución definitiva.

Prueba de Hosmer y Lemeshow			
Paso	Chi cuadrado	gl	Sig.
1	0,220	6	1,000

### 5.2.2 Análisis Univariante y Multivariante sobre la variable exitus.

En el análisis univariante (tabla 22) , se apreció mayor mortalidad entre los pacientes con Insuficiencia Cardíaca (ICA 64,28 % -vs- No ICA 29,24 RR 4,355 IC95% 1,351-14,039 p=0,014), Insuficiencia Renal Crónica (IRC 46,66% -vs- No IRC 25,33% RR 2,579 IC95% 1,178-5,645 p=0,027) y en aquellos pacientes sin antecedentes de cirugía de revascularización de extremidad (Sólo tratamiento médico: Si 54,34% -vs- No 20,27% RR 4,683 IC95% 2,081-10,537 p=0,000).

El análisis multivariante (tabla 23), identificó la toma de hemorreológicos como factor de riesgo de mortalidad (OR 3,166 IC95% 1,235-8,133 p=0,016). El hábito tabáquico mostró tendencia a la significación dentro de las variables analizadas en el estudio de regresión logística (OR 2,809 IC95% 0,981-8,040 p=0,054)

El análisis de Kaplan-Meier referido a la tasa de supervivencia, puede consultarse en la figura 32, y en la tabla 4 del anexo 1.

Ante los resultados obtenidos, se decidió realizar un análisis independiente de los pacientes que no hubieran tenido antecedentes de cirugía de revascularización en el momento de diagnóstico de ICMI (grupo Sólo Tratamiento Médico), y de aquellos pacientes sometidos a tratamiento con progenitores hematopoyéticos (grupo Angiogénesis).

Tabla 22

ANÁLISIS UNIVARIANTE POBLACIÓN CONTROL: EXITUS

Exitus población control n = 40

Entre paréntesis se muestra el valor absoluto de la condición cualitativa analizada (Si/No). Resultados expresados en valor absoluto y porcentaje, respecto de la variable independiente Exitus = SI.

			<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC95%</b>
<b>EXITUS = SI</b>					
<b>Sexo</b>					
	Masculino (n=83)	Femenino (n=37)			
	24 (28,91%)	16 (43,24%)	0,145	1,873	0,873-4,190
<b>Diagnóstico</b>					
	Grado III (n=18)	Grado IV (n=102)			
	4 (22,22%)	36 (35,29%)	0,417	1,909	0,585-6,232
<b>Fumador</b>					
	Si (n=42)	No (n=78)			
	7 (16,66%)	33 (42,30%)	0,005	0,273	0,108-0,690
<b>Diabetes</b>					
	Si (n=88)	No (n=32)			
	26 (29,54%)	14 (43,75%)	0,189	0,539	0,234-1,243
<b>HTA</b>					
	Si (n=76)	No (n=44)			
	26 (34,21%)	14 (31,81%)	0,843	1,114	0,505-2,460
<b>DLP</b>					
	Si (n=43)	No (n=77)			
	14 (32,55%)	26 (33,76%)	1,000	0,947	0,428-2,094
<b>ICA</b>					
	Si (n=14)	No (n=106)			
	9 (64,28%)	31 (29,24%)	0,014	4,355	1,351-14,039
<b>CI</b>					
	Si (n=24)	No (n=96)			
	11 (45,83%)	29 (30,20%)	0,155	1,955	0,784-4,874
<b>CV</b>					
	Si (n=11)	No (n=109)			
	3 (27,27%)	37 (33,94%)	0,750	0,730	0,183-2,915
<b>CA</b>					
	Si (n=41)	No (n=79)			
	15 (36,58%)	25 (31,64%)	0,684	1,246	0,564-2,754
<b>CQ</b>					
	Si (n=15)	No (n=105)			
	7 (46,66%)	33 (31,42%)	0,255	1,909	0,639-5,706

(Continuación Tabla 22 : Análisis Univariante población control: Exitus)

			<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC95%</b>
<b>EXITUS = SI</b>					
<b>NM</b>	Si (n=38) 13 (34,21%)	No (n=82) 27 (32,92%)	1,000	1,059	0,470-2,389
<b>O2cron</b>	Si (n=6) 2 (33,33%)	No (n=114) 38 (33,33%)	1,000	1,000	0,175-5,706
<b>HP</b>	Si (n=18) 5 (27,77%)	No (n=102) 35 (34,31%)	0,787	0,736	0,243-2,233
<b>IRC</b>	Si (n=45) 21 (46,66%)	No (n=75) 19 (25,33%)	0,027	2,579	1,178-5,645
<b>NRL</b>	Si (n=21) 7 (33,33%)	No (n=99) 33 (33,33%)	1,000	1,000	0,368-2,715
<b>Buerger</b>	Si (n=4) 0 (0%)	No (n=116) 40 (34,48%)	0,308	0,655	0,574-0,748
<b>Solo Tratamiento Médico (sin posibilidad de tratamiento quirúrgico revascularizador)</b>					
	Si (n=46) 25 (54,34%)	No (n=74) 15 (20,27%)	0,000	4,683	2,081-10,537
<b>AG</b>	Si (n=72) 24 (33,33%)	No (n=48) 16 (33,33%)	1,000	1,000	0,461-2,170
<b>AC</b>	Si (n=61) 20 (32,78%)	No (n=59) 20 (33,89%)	1,000	0,951	0,445-2,032
<b>AG+AC</b>	Si (n=11) 3 (27,27%)	No (n=109) 37 (33,94%)	0,750	0,730	0,183-2,915

(Continuación Tabla 22: Análisis Univariante Población Control: Exitus )

		p	RR	IC 95%
<b>AMPUTACIÓN = SI</b>				
<b>Hemorreológico</b>				
Si (n=62)	No (n=58)			
12 (19,35%)	28 (48,27%)	0,001	0,257	0,114-0,580
<b>Estatina</b>				
Si (n=62)	No (n=58)			
22 (35,48%)	18 (31,03%)	0,699	1,222	0,571-2,618
<b>ARA-II</b>				
Si (n=11)	No (n=109)			
2 (18,18%)	38 (34,86%)	0,333	0,415	0,085-2,020
<b>IECA</b>				
Si (n=45)	No (n=75)			
19 (42,22%)	21 (28%)	0,116	1,879	0,864-4,088
<b>Sugiran</b>				
Si (n=19)	No (n=101)			
5 (26,31%)	35 (34,65%)	0,600	0,673	0,224-2,024
<b>Triple Terapia (Antiagregante+Estatina+Hipotensor)</b>				
Si (n=42)	No (n=78)			
16 (38,09%)	24 (30,76%)	0,425	1,385	0,630-3,041

**Abreviaturas:**

ADO: antidiabético oral; HTA : hipertensión arterial; DLP: dislipemia; ICA: insuficiencia cardíaca; CI: cardiopatía isquémica; CV: cardiopatía valvular; CA: cardiopatía arritmogénica; CQ: corrección quirúrgica de la cardiopatía; NM: neumopatía crónica tipo bronquitis o enfisema; O2cron: oxigenoterapia crónica; HP: hepatopatía virus hepatitis B/C crónica; IRC: insuficiencia renal crónica/nefropatía crónica; NRL: antecedente neurológico isquémico Ictus/AIT; AG: antiagregante; AC:anticoagulante; AG+AC: antiagregante+anticoagulante; ARA-II: antagonista de receptor de Angiotensina-II; IECA: inhibidor de la enzima convertora de angiotensina.

Tabla 23

ANÁLISIS MULTIVARIANTE POBLACIÓN CONTROL: EXITUS

Exitus población Control n = 40

	Variables en la ecuación							
	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95% para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Fumador(1)	1,033	0,537	3,704	1	0,054	2,809	0,981	8,040
InsuficienciaCardiaca(1)	-0,533	0,681	0,613	1	0,434	0,587	0,154	2,230
Nefropatía(1)	-0,819	0,477	2,956	1	0,086	0,441	0,173	1,122
ttomedico(1)	-1,457	0,459	10,082	1	0,001	0,233	0,095	0,573
Hemorreo(1)	1,152	0,480	5,759	1	0,016	3,166	1,235	8,113
Hipertension(1)	0,387	0,494	0,614	1	0,433	1,473	0,559	3,877
Constante	-0,430	0,854	0,254	1	0,614	0,650		

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: Hipertension.

Resumen del modelo			
Paso	-2 log de la verosimilitud	R cuadrado de Cox y Snell	R cuadrado de Nagelkerke
1	119,192 <sup>a</sup>	0,244	0,339

a. La estimación ha finalizado en el número de iteración 5 porque las estimaciones de los parámetros han cambiado en menos de ,001.

Prueba de Hosmer y Lemeshow			
Paso	Chi cuadrado	gl	Sig.
1	9,962	8	0,268

### **5.3 Análisis del grupo Tratamiento Médico: población de pacientes sin antecedente de cirugía de revascularización (Sólo tratamiento médico)**

Fueron recogidos un total de 72 pacientes sin antecedente de cirugía de revascularización en el momento del diagnóstico de ICMI. La media de edad fue de  $68,63 \pm 17,23$  años, con mayor proporción de sexo masculino (70,8%). El seguimiento medio fue de  $18,6 \pm 25,8$  meses [0,33-96,47]. El 86,1% de los pacientes de este subgrupo presentaban lesiones tróficas con dolor de reposo asociado. Un 36,1% de los pacientes de este subgrupo (n=26) recibieron terapia celular. Un 72,2% (n=52) de este subgrupo precisó amputación mayor de la extremidad. La mortalidad de este subgrupo de pacientes fue del 45,83% (n=33).

El resto de las variables demográficas se describen en la tabla 24.

En el análisis por grupos, se apreciaron diferencias significativas en la frecuencia de amputación (Amputación mayor: Angiogénesis sólo tto médico 31,03% -vs- Control sólo tto médico 95,65%;  $p = 0,000$ ). No se apreciaron diferencias en la mortalidad referida entre los grupos (Exitus: Angiogénesis sólo tto médico 34,48% -vs- 54,34%;  $p=0,104$ ). El resto de las variables descritas se muestran en la tabla 25.

Tabla 24

DEMOGRAFÍA DE POBLACIÓN POBLACIÓN SIN ANTECEDENTE DE TRATAMIENTO QUIRÚRGICO REVASCULARIZADOR (SOLO TRATAMIENTO MÉDICO)

Resultados expresados en:

- media, desviación estándar y rango, para variables numéricas continuas
- porcentaje y valor absoluto para variables categóricas

Población Sólo tratamiento médico N=72  
 - grupo Control n= 46  
 - grupo Angiogénesis n= 26

**Edad** 68,63 ± 17,23 años [22-92]

**Sexo**

Masculino	70,8%	(n=51)
Femenino	29,2%	(n=21)

**Diagnóstico (Leriche-Fontaine)**

Grado III	13,9%	(n=10)
Grado IV	86,1%	(n=62)

**Factores de riesgo vascular**

Tabaquismo	41,7%	(n=30)
Diabetes Mellitus	63,9%	(n=46)
Hipertensión Arterial	54,2%	(n=39)
Dislipemia	34,7%	(n=25)

**Comorbilidades**

Cardiopatía		
Insuficiencia cardíaca	13,9%	(n=10)
Cardiopatía isquémica	19,4%	(n=14)
Cardiopatía valvular	9,7%	(n=7)
Cardiopatía arritmogénica	25%	(n=18)
Corrección quirúrgica	13,9%	(n=10)
Neumopatía	25%	(n=18)
Hepatopatía	18,1%	(n=13)
Nefropatía	34,7%	(n=25)
Neurológico	18,1%	(n=13)

**(continuación tabla 24: demografía población sólo tratamiento médico)**

**Antecedentes Vasculares**

Arteriosclerosis obliterante	83,3%	(n=60)
Tromboangeitis obliterante	16,7%	(n=12)

**Tratamientos**

Farmacológicos

- Antiagregante	68,1%	(n=49)
- Anticoagulante	43,1%	(n=31)
- Antiagregante+Anticoagulante	11,1%	(n=8)
- Hemorreológico	45,8%	(n=33)
- Estatinas	45,8%	(n=33)
- Hipotensores	38,9%	(n=28)
- Sugiran	18,1%	(n=13)

**Amputación mayor**

72,2% (n=52)

**Exitus**

45,8% (n=33)

**ABREVIATURAS**

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

SAHS: Síndrome de Apnea Hipopnea del Sueño

TEP: Tromboembolismo Pulmonar

VHB / VHC : Virus Hepatitis B/C

AIT : Accidente Isquémico Transitorio

IECA: Inhibidor de Enzima Conversora de Angiotensina

ARA-II: Antagonista Receptor Angiotensina-II

Tabla 25  
**DEMOGRAFÍA DESCRIPTIVA SOLO TRATAMIENTO MÉDICO: ANÁLISIS POR GRUPOS**

Pacientes Solo Tratamiento Médico: 72

Datos expresados en media, desviación estándar, valor absoluto y (porcentaje)

	<b>ANGIOGENESIS</b> (n=26)	<b>CONTROLES</b> (n=46)	<b>P</b>
<b><u>Edad (años)</u></b>	56,5±18,4 [22-79]	75,48±12,1 [37-92]	0,000
<b><u>Sexo</u></b>			1,000
	Masculino	33 (71,73%)	
	Femenino	13 (28,26%)	
<b><u>Diagnóstico</u></b>			0,479
	Grado III	5 (19,23%)	
	Grado IV	41 (89,13%)	
<b><u>Factores de Riesgo Vascular</u></b>			
	Tabaquismo	14 (30,43%)	0,013
	Diabetes	35 (76,08%)	0,006
	Hipertensión	28 (60,86%)	0,147
	Dislipemia	16 (34,78%)	1,000
<b><u>Comorbilidades</u></b>			
	Cardiopatía		
	- Insuficiencia cardiaca	9 (19,56%)	0,083
	- Cardiopatía isquémica	10 (21,73%)	0,556
	- Cardiopatía valvular	4 (8,69%)	1,000
	- Cardiopatía arritmogénica	16 (34,78%)	0,021
	- Corrección quirúrgica	7 (15,21%)	0,739
	Neumopatía	14 (30,43%)	0,257
	Hepatopatía	10 (21,73%)	0,352
	Nefropatía	20 (43,47%)	0,043
	Neuropatía	12 (26,08%)	0,024
<b><u>Antecedentes Vasculares</u></b>			0,000
	- Arteriosclerosis	45 (97,82%)	
	- Tromboangeitis/Buerger	1 (2,17%)	

Continuación tabla 25. Sólo tratamiento médico: análisis por grupos.

**Tratamiento Farmacológico**

- Antiagregación (AG)	24 (92,30%)	25 (54,34%)	0,001
- Anticoagulante (AC)	7 (26,92%)	24 (52,17%)	0,049
- AG + AC	5 (19,23%)	3 (6,52%)	0,128
- Hemorreológico	13 (50%)	20 (43,47%)	0,630
- Estatina	9 (34,61%)	24 (52,17%)	0,218
- Hipotensores (IECAS/ARA-II)	11 (42,30%)	17 (36,95%)	0,802
- Vasodilatadores	7 (26,92%)	6 (13,04%)	0,202
- AG+Estatina+Hipotensor	5 (19,23%)	14 (30,43%)	0,407

**Amputación Mayor de Extremidad** 8 (30,76%) 44 (95,65%) 0,0001

**Exitus** 8 (30,76%) 25 (54,34%) 0,084

ABREVIATURAS

IRC: Insuficiencia Renal Crónica

AIT: Accidente Isquémico Transitorio

HBPM: Heparina Bajo Peso Molecular

IECA: Inhibidores de Enzima Conversora de Angiotensina

ARA-II: Antagonista Receptor Angiotensina –II

### 5.3.1 Análisis Univariante y Multivariante sobre la variable Amputación (sólo tto médico)

Se apreció una mayor frecuencia de amputación en los pacientes diabéticos (Diabéticos 84,78% -vs- No diabéticos 50% RR 5,57 IC95% 1,831-16,953 p=0,002), en pacientes con Hepatopatía B o C (Hepatopatía 100% -vs- No hepatopatía 66,1% RR 1,33 IC95% 1,14-1,56 p=0,014). Por el contrario, los pacientes con diagnóstico clínico de enfermedad de Buerger (Buerger 30% -vs- No Buerger 80% RR 0,125 IC95% 0,032-0,485 p=0,002) , y los tratados con progenitores hematopoyéticos presentaron una menor frecuencia de amputación ( Angiogénesis 30,76% -vs- Control 95,65% RR 0,02 IC95% 0,004-0,105 p=0,000). El resto de los factores analizados puede apreciarse en la tabla 25.

En el análisis multivariante, la Diabetes fue identificada como factor de riesgo de amputación (OR 15,879 IC95% mín 1,045 máx 241,317 p=0,046), mientras que la terapia celular se identificó como factor protector frente a la amputación (OR 0,014 IC95% mín 0,001 máx 0,216 p=0,002). La tabla 26 muestra los factores analizados en el estudio multivariante.

TABLA 25

ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LA POBLACIÓN SIN ANTECEDENTE DE TRATAMIENTO QUIRÚRGICO REVASCULARIZADOR (SÓLO TRATAMIENTO MÉDICO): AMPUTACIÓN

Población sin antecedente de cirugía de revascularización n = 72 (sólo tratamiento médico)

Entre paréntesis se muestra el valor absoluto de la condición cualitativa analizada (Si/No). Resultados expresados en valor absoluto y porcentaje, respecto de la variable independiente Amputación = SI.

			<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC95%</b>
<b>AMPUTACIÓN = SI</b>					
<b>Edad</b>	Amputación (n=52)	No amputación (n=20)			
	71,92±15,57	60,05±18,73	0,008		
<b>Sexo</b>	Masculino (n=51)	Femenino (n=21)			
	38 (74,5%)	14 (66,67%)	0,567	0,684	0,227-2,065
<b>Fumador</b>	Si (n=30)	No (n=42)			
	19 (63,33%)	33 (78,57%)	0,188	0,471	0,165-1,341
<b>Diabetes</b>	Si (n=46)	No (n=26)			
	39 (84,78%)	13 (50%)	0,002	5,571	1,831-16,953
<b>HTA</b>	Si (n=39)	No (n=33)			
	30 (76,92%)	22 (66,67%)	0,430	1,667	0,590-4,709
<b>DLP</b>	Si (n=25)	No (n=47)			
	19 (76%)	33 (70,21%)	0,783	1,343	0,443-4,079
<b>ICA</b>	Si (n=10)	No (n=62)			
	9 (90%)	43 (69,32%)	0,265	3,977	0,470-33,644
<b>CI</b>	Si (n=14)	No (n=58)			
	11 (78,57%)	41 (70,68%)	0,744	1,510	0,376-6,142
<b>CV</b>	Si (n=7)	No (n=65)			
	4 (57,14%)	48 (73,84%)	0,388	0,472	0,996-2,379
<b>CA</b>	Si (n=18)	No (n=54)			
	16 (88,89%)	36 (66,67%)	0,078	4,000	0,828-19,325
<b>CQ</b>	Si (n=10)	No (n=62)			
	7 (70%)	45 (72,58%)	1,000	0,881	0,204-3,807
<b>NM</b>	Si (n=18)	No (n=54)			
	16 (88,89%)	36 (66,67%)	0,078	4,000	0,828-19,325

(Continuación Tabla 25: ANÁLISIS UNIVARIANTE SOLO TTO MÉDICO: AMPUTACIÓN)

			<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC95%</b>
<b>AMPUTACIÓN = SI</b>					
<b><u>O2cron</u></b>	Si (n=3) 3 (100%)	No (n=69) 49 (71,01%)	0,550	1,061	0,992-1,135
<b><u>HP</u></b>	Si (n=13) 13 (100%)	No (n=59) 39 (66,10%)	0,014	1,333	1,140-1,560
<b><u>IRC</u></b>	Si (n=25) 21 (84%)	No (n=47) 31 (65,95%)	0,166	2,710	0,794-9,249
<b><u>HM</u></b>	Si (n=2) 1 (50%)	No (n=70) 51 (72,85%)	0,481	0,373	0,022-6,259
<b><u>NRL</u></b>	Si (n=13) 12 (92,3%)	No (n=59) 40 (67,79%)	0,095	5,700	0,690-47,101
<b><u>Buerger</u></b>	Si (n=12) 4 (33,3%)	No (n=60) 48 (80%)	0,002	0,125	0,032-0,485
<b><u>AG</u></b>	Si (n=49) 33 (67,34%)	No (n=23) 19 (82,6%)	0,260	0,434	0,127-1,489
<b><u>AC</u></b>	Si (n=31) 25 (80,64%)	No (n=41) 27 (68,85%)	0,193	2,160	0,719-6,492
<b><u>AG+AC</u></b>	Si (n=8) 6 (75%)	No (n=64) 46 (71,87%)	1,000	1,174	0,216-6,365
<b><u>Hemorreológico</u></b>	Si (n=33) 24 (72,73%)	No (n=39) 28 (71,79%)	1,000	1,048	0,372-2,952
<b><u>Estatina</u></b>	Si (n=33) 26 (78,78%)	No (n=39) 26 (66,67%)	0,299	1,857	0,639-5,401
<b><u>Hipotensores</u></b>	Si (n=28) 18 (64,28%)	No (n=44) 34 (77,27%)	0,284	0,529	0,186-1,507

(Continuación tabla 25: ANÁLISIS UNIVARIANTE SOLO TTO MÉDICO: AMPUTACIÓN

			<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC95%</b>
<b>AMPUTACIÓN = SI</b>					
<b><u>ARA-2</u></b>	Si (n=4) 0	No (n=68) 52 (76,47%)	0,005	0,800	0,643-0,996
<b><u>IECA</u></b>	Si (n=24) 18 (75%)	No (n=48) 34 (70,83%)	0,786	1,235	0,405-3,763
<b><u>Vasodilatador</u></b>					
	Si (n=13) 8 (61,53%)	No (n=59) 44 (74,57%)	0,494	0,545	0,154-1,926
<b><u>Triple Terapia (Antiagregante+Estatina+Hipotensor)</u></b>					
	Si (n=19) 15 (78,94%)	No (n=53) 37 (69,81%)	0,558	1,622	0,465-5,655
<b><u>Terapia Angiogénica</u></b>					
	Si (n=26) 8 (30,76%)	No (n=46) 44 (95,65%)	0,000	0,020	0,004-0,105

**Abreviaturas:**

ADO: antidiabético oral; HTA : hipertensión arterial; DLP: dislipemia; ICA: insuficiencia cardíaca; CI: cardiopatía isquémica; CV: cardiopatía valvular; CA: cardiopatía arritmogénica; CQ: corrección quirúrgica de la cardiopatía; NM: neumopatía crónica tipo bronquitis o enfisema; O2cron: oxigenoterapia crónica; HP: hepatopatía virus hepatitis B/C crónica; IRC: insuficiencia renal crónica/nefropatía crónica; NRL: antecedente neurológico isquémico Ictus/AIT; AG: antiagregante; AC:anticoagulante; AG+AC: antiagregante+anticoagulante; ARA-II: antagonista de receptor de Angiotensina-II; IECA: inhibidor de la enzima convertora de angiotensina.

TABLA 26: ANALISIS MULTIVARIANTE POBLACION SOLO TTO MÉDICO:  
AMPUTACIÓN

	Variables en la ecuación							
	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95% para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Edad	0,011	0,011	0,881	1	0,348	1,011	0,988	1,034
Diabetes	2,765	1,388	3,967	1	0,046	15,879	1,045	241,317
Cardiop. Arritmogénica	1,486	1,915	0,602	1	0,438	4,417	0,104	188,358
Neumopatía	1,690	1,392	1,474	1	0,225	5,419	0,354	82,905
Hepatopatía	39,342	11640,639	0,000	1	0,997	1,219E+17	0,000	.
Neuro	-0,539	1,549	0,121	1	0,728	0,583	0,028	12,142
Buerger	-16,186	7865,825	0,000	1	0,998	0,000	0,000	.
Angiogenesis	-4,278	1,400	9,334	1	0,002	0,014	0,001	0,216

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: Edad, Diabetes, Cardiopatía arritmogénica, Neumopatía, Hepatopatía, Neuropatía, Enfermedad de Buerger, Angiogenesis.

Resumen del modelo			
Paso 1	-2 log de la verosimilitud	R cuadrado de Cox y Snell	R cuadrado de Nagelkerke
	29,611	0,623	0,830

Prueba de Hosmer y Lemeshow			
Paso	Chi cuadrado	gl	Sig.
1	13,298	8	0,102

### 5.3.2 Análisis Univariante y Multivariante sobre la variable Exitus (sólo tto médico)

En el análisis univariante se apreció una mayor mortalidad en pacientes con diagnóstico de Insuficiencia Cardíaca (ICA90%-vs-No ICA38,7% RR 14,250 IC95% 1,696-119,702 p=0,004), e Insuficiencia Renal Crónica (IRC 68% -vs- No IRC 34% RR 4,117 1,463-11,584 p=0,007).

No hubo mortalidad entre los pacientes con diagnóstico de enfermedad de Buerger (Buerger 0% -vs- No Buerger 55% RR 0,692 IC95% 0,562-0,853 p=0,000).

La toma de IECA (IECA 66,6% -vs- No IECA 35,41% RR3,647 IC95% 1,296-10,262 p=0,023) y la asociación de Antiagregante+Estatina+Hipotensor (Triple terapia 68,42% -vs- 37,7% RR 3,575 IC95% 1,172-10,907 p=0,031) no se relacionó con una menor mortalidad. El resto de las variables analizadas se muestran en la tabla 27.

En el análisis multivariante la toma de hemorreológicos se identificó como factor protector de mortalidad en este grupo de pacientes, sin poder identificar otras variables asociadas a mortalidad. Los datos incluidos en el análisis multivariante se muestran en la tabla 28.

TABLA 27

ANÁLISIS UNIVARIANTE POBLACIÓN SIN POSIBILIDAD DE TRATAMIENTO QUIRÚRGICO REVASCULARIZADOR (SÓLO TRATAMIENTO MÉDICO):  
EXITUS

Población sin antecedente de cirugía de revascularización n = 72 (sólo tratamiento médico)

Entre paréntesis se muestra el valor absoluto de la condición cualitativa analizada (Si/No). Resultados expresados en valor absoluto y porcentaje, respecto de la variable independiente Exitus = SI.

			p	RR	IC95%
<b>EXITUS = SI</b>					
<b><u>Edad</u></b>	Exitus Si (n=33)	Exitus No (n=39)			
	78,27±11,61	60,46±17,08	0,000		
<b><u>Sexo</u></b>	Masculino (n=51)	Femenino (n=21)			
	21 (41,17%)	12 (57,14%)	0,299	1,905	0,681-5,328
<b><u>Fumador</u></b>	Si (n=30)	No (n=42)			
	7 (23,33%)	26 (61,90%)	0,002	0,187	0,066-0,536
<b><u>DM</u></b>	Si (n=46)	No (n=26)			
	23 (50%)	10 (38,46%)	0,461	1,600	0,601-4,259
<b><u>HTA</u></b>	Si (n=39)	No (n=33)			
	22 (56,41%)	11 (33,33%)	0,061	2,588	0,990-6,770
<b><u>DLP</u></b>	Si (n=25)	No (n=47)			
	15 (60%)	18 (38,29%)	0,089	2,417	0,895-6,524
<b><u>IC</u></b>	Si (n=10)	No (n=62)			
	9 (90%)	24 (38,70%)	0,004	14,250	1,696-119,702
<b><u>CI</u></b>	Si (n=14)	No (n=58)			
	8 (57,14%)	25 (43,10%)	0,384	1,760	0,541-5,723
<b><u>CV</u></b>	Si (n=7)	No (n=65)			
	4 (57,14%)	29 (44,61%)	0,695	1,655	0,343-7,944
<b><u>CA</u></b>	Si (n=18)	No (n=54)			
	7 (38,88%)	26 (48,14%)	0,590	0,085	0,231-2,033

Continuación Tabla 27: ANALISIS UNIVARIANTE SOLO TTO MEDICO:EXITUS

			<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC95%</b>
<b>EXITUS=Si</b>					
<b><u>NM</u></b>	Si (n=18) 8 (44,44%)	No (n=54) 25 (46,29%)	1,000	0,928	0,317-2,712
<b><u>O2Cron</u></b>	Si (n=3) 1 (33,33%)	No (n=69) 32 (46,37%)	1,000	0,578	0,050-6,677
<b><u>HP</u></b>	Si (n=13) 3 (23,07%)	No (n=59) 30 (50,84%)	0,122	0,290	0,072-1,161
<b><u>IRC</u></b>	Si (n=25) 17 (68%)	No (n=47) 16 (34,04%)	0,007	4,117	1,463-11,584
<b><u>HM</u></b>	Si (n=2) 2 (100%)	No (n=70) 31 (44,28%)	0,207	1,065	0,976-1,161
<b><u>NRL</u></b>	Si (n=13) 6 (46,15%)	No (n=59) 27 (45,76%)	1,000	1,016	0,305-3,389
<b><u>Buerger</u></b>	Si (n=12) 0	No (n=60) 33 (55%)	0,000	0,692	0,562-0,853
<b><u>AG</u></b>	Si (n=49) 21 (42,85%)	No (n=23) 12 (52,17%)	0,613	0,688	0,254-1,859
<b><u>AC</u></b>	Si (n=31) 17 (54,83%)	No (n=41) 16 (39,02%)	0,234	1,897	0,737-4,884
<b><u>AG+AC</u></b>	Si (n=8)	No (n=64)	0,456	2,143	0,471-9,741
<b><u>Hemorreológico</u></b>					
	Si (n=33) 9 (27,27%)	No (n=39) 24 (61,53%)	0,005	0,234	0,086-0,638
<b><u>Estatina</u></b>	Si (n=33) 19 (57,57%)	No (n=39) 14 (35,89%)	0,097	2,423	0,936-6,273
<b><u>Hipotensores</u></b>					
	Si (n=28) 18 (64,28%)	No (n=44) 15 (34,09%)	0,016	3,480	1,289-9,394

Continuación Tabla 27: ANALISIS UNIVARIANTE SOLO TTO MEDICO:EXITUS

			<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC95%</b>
<b>EXITUS = SI</b>					
<b><u>ARA-II</u></b>	Si (n=4) 2 (50%)	No (n=68) 31 (45,58%)	1,000	1,194	0,159-8,972
<b><u>IECAS</u></b>	Si (n=24) 16 (66,67%)	No (n=48) 17 (35,41%)	0,023	3,647	1,296-10,262
<b><u>Vasodilatador</u></b>					
	Si (n=13) 5 (38,46%)	No (n=59) 28 (47,45%)	0,760	0,692	0,203-2,364
<b><u>Triple Terapia (Antiagregante+Estatina+Hipotensor)</u></b>					
	Si (n=19) 13 (68,42%)	No (n=53) 20 (37,73%)	0,031	3,575	1,172-10,907
<b><u>Terapia Angiogénica</u></b>					
	Si (n=26) 8 (30,77%)	No (n=46) 25 (54,35%)	0,084	0,373	0,135-1,030

**Abreviaturas:**

ADO: antidiabético oral; HTA : hipertensión arterial; DLP: dislipemia; ICA: insuficiencia cardíaca; CI: cardiopatía isquémica; CV: cardiopatía valvular; CA: cardiopatía arritmogénica; CQ: corrección quirúrgica de la cardiopatía; NM: neumopatía crónica tipo bronquitis o enfisema; O2cron: oxigenoterapia crónica; HP: hepatopatía virus hepatitis B/C crónica; IRC: insuficiencia renal crónica/nefropatía crónica; NRL: antecedente neurológico isquémico Ictus/AIT; AG: antiagregante; AC:anticoagulante; AG+AC: antiagregante+anticoagulante; ARA-II: antagonista de receptor de Angiotensina-II; IECA: inhibidor de la enzima convertora de angiotensina.

TABLA 28: ANÁLISIS MULTIVARIANTE SOLO TRATAMIENTO MÉDICO: EXITUS

	Variables en la ecuación							
	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95% para EXP(B)	
							Inferior	Superior
<b>Edad</b>	0,015	0,009	2,986	1	0,084	1,015	0,998	1,032
<b>Angiogenesis</b>	0,031	0,875	0,001	1	0,971	1,032	0,186	5,731
<b>Fumador</b>	-0,878	0,703	1,559	1	0,212	0,416	0,105	1,649
<b>Hipertensión</b>	-1,830	0,989	3,423	1	0,064	0,160	0,023	1,115
<b>Dislipemia</b>	0,324	0,940	0,119	1	0,730	1,383	0,219	8,733
<b>Insuficiencia Cardíaca</b>	1,924	1,412	1,857	1	0,173	6,849	0,430	109,035
<b>Nefropatía</b>	0,289	0,739	0,153	1	0,695	1,336	0,314	5,689
<b>Buerger</b>	-20,601	10845,510	0,000	1	0,998	0,000	0,000	.
<b>Hemorreológico</b>	-2,085	0,732	8,124	1	0,004	0,124	0,030	0,521
<b>Estatinas</b>	1,338	1,062	1,587	1	0,208	3,810	0,475	30,524
<b>Hipotensores</b>	2,474	1,883	1,727	1	0,189	11,875	0,296	475,671
<b>IECAS</b>	-0,304	1,701	0,032	1	0,858	0,738	0,026	20,725
<b>Triple terapia</b>	-1,652	1,625	1,034	1	0,309	0,192	0,008	4,632

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: edad, Angiogénesis, Fumador, Hipertensión, Dislipemia, Insuficiencia Cardíaca, Nefropatía, Buerger, Hemorreológico, Estatinas, Hipotensores, IECAS, Triple terapia (AC+Estatina+Hipotensor).

Resumen del modelo		
-2 log de la verosimilitud	R cuadrado de Cox y Snell	R cuadrado de Nagelkerke
59,225 <sup>a</sup>	0,431	0,575

Prueba de Hosmer y Lemeshow		
Chi cuadrado	gl	Sig.
6,745	8	0,564

### 5.3.3. Tablas de Supervivencia ( Kaplan- Meier ): sólo tratamiento médico

En este subgrupo de pacientes, se apreció una tasa global de salvamento de extremidad del 37,1% a 12 meses (figura 33). El resumen del procesamiento de los casos, y la tabla de eventos, se expone en el anexo 1 (tabla 5)

El análisis por grupos (figura 34) demostró una mayor tasa de salvamento de extremidad en los pacientes tratados con terapia angiogénica (media de tiempo en meses: Angiogenesis  $66\pm 9,2$  -vs- Control  $5,5\pm 1,1$   $p=0,000$ ), con una tasa de salvamento de extremidad a 12 meses del 78,3% en el grupo angiogénesis, frente al 13,7% del grupo control ( $p=0,000$ ). En la tabla 31 se puede apreciar el análisis comparativo de las tasas de salvamento de extremidad. El resumen del procesamiento de los casos, y la tabla de eventos, se expone en el anexo 1 ( tablas 6 )

Respecto a la mortalidad en este subgrupo de pacientes, la tasa global de supervivencia a los 12 meses fue del 61,7% (figura 35). Si bien la mortalidad fue similar entre los dos grupos al final del seguimiento, la mortalidad de los pacientes del grupo control se produjo en un menor tiempo desde el diagnóstico, en comparación con los pacientes del grupo Angiogénesis (media de tiempo en meses Angiogénesis:  $68,5\pm 7,9$  -vs- Control:  $12,4\pm 3,3$ ;  $p=0,000$ ) (figura 36). El resumen del procesamiento de los casos, y la tabla de eventos, se expone en el anexo 1 (tablas 7 y 8).

**Figura 33: Tasa de Salvamento de Extremidad (Sólo tto médico). Análisis global.**

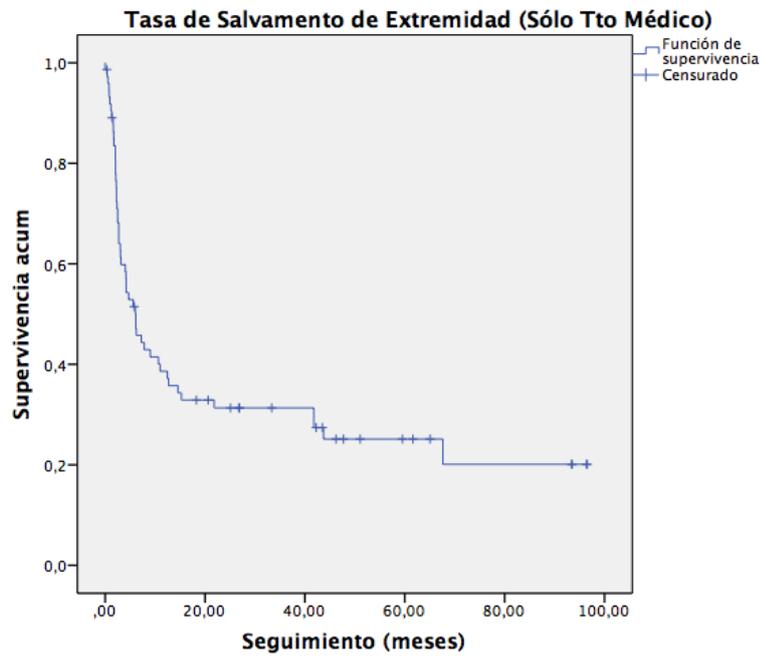
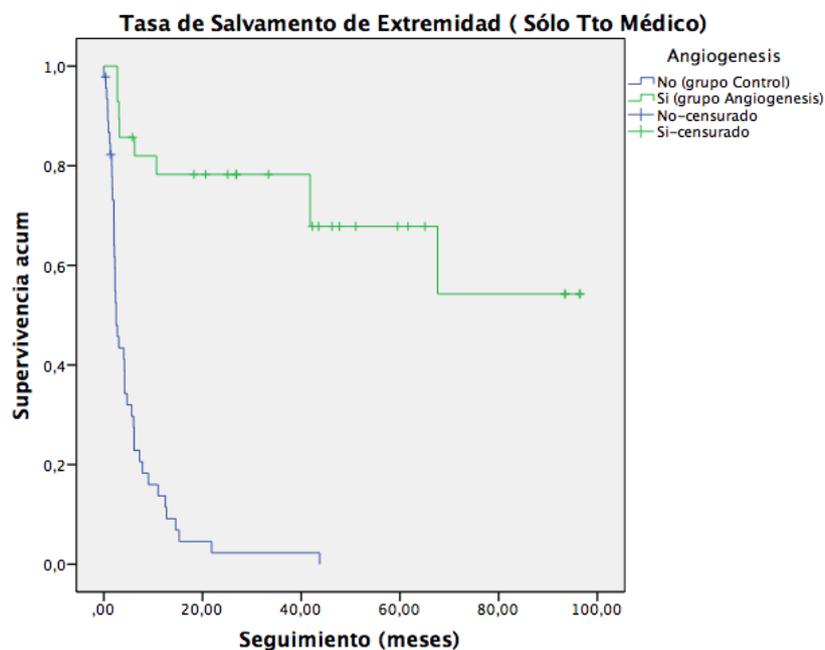


Tabla 29: medias y medianas de tiempo de salvamento de extremidad (Sólo Tratamiento Médico)

Medias y medianas del tiempo de supervivencia							
Media <sup>a</sup>				Mediana			
Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
28,693	4,697	19,488	37,899	6,133	1,422	3,346	8,920

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

**Figura 34: Tasa de Salvamento de Extremidad (Sólo tto médico). Análisis por pertenencia a grupo Angiogénesis o Control.**



**Tabla 30: medias y medianas de tiempo de salvamento de extremidad (Sólo Tratamiento Médico)**

Medias y medianas del tiempo de supervivencia								
Angiogénesis	Media <sup>a</sup>				Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
No	5,567	1,139	3,334	7,799	2,500	0,377	1,762	3,238
Si	66,928	7,903	51,437	82,418	.	.	.	.
Global	28,693	4,697	19,488	37,899	6,133	1,422	3,346	8,920

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

**Tabla 31: análisis comparativo de tasas de salvamento de extremidad. Solo Tratamiento Médico**

Angiogénesis (tto médico)	meses	Control (tto médico)
78,3%	12 m	13,7%
78,3%	24 m	2,3%
78,3%	36 m	0 %
67,8%	48 m	0 %
67,8%	60 m	0 %

Tabla 32: Tasa Salvamento de extremidad. Sólo Tratamiento Médico. Estadísticos de comparación

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	46,641	1	0,000
Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de Angiogenesis .			

Figura 35: Tasa de Supervivencia (Sólo tto médico). Análisis global.

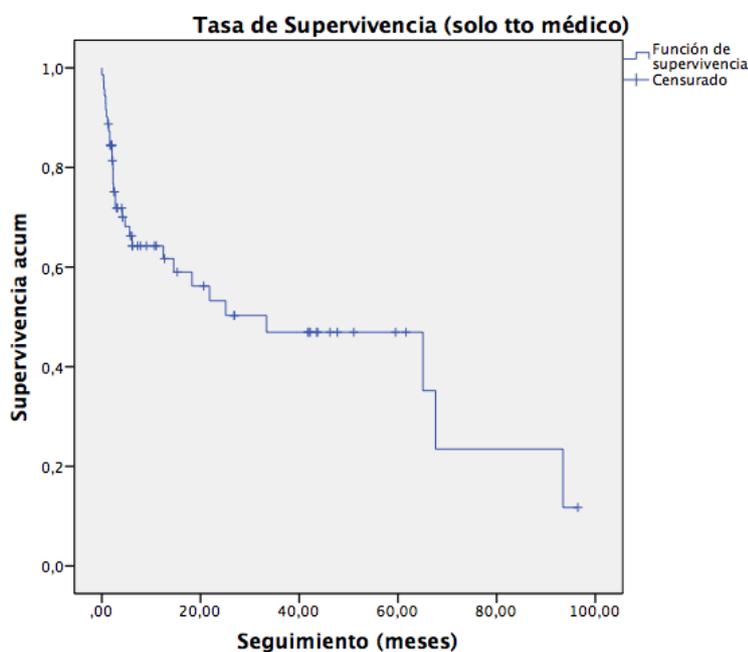
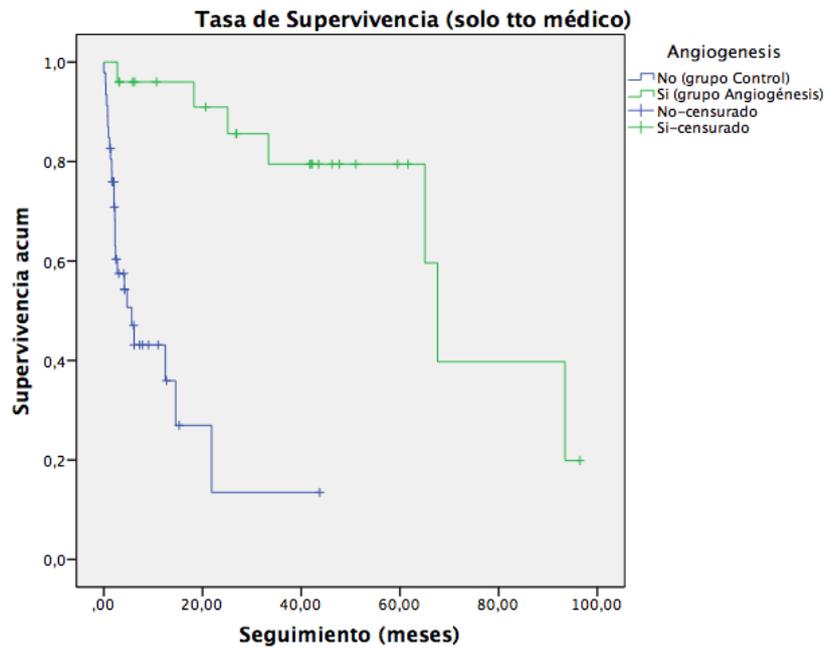


Tabla 33: medias y medianas de tiempo de supervivencia (Sólo Tratamiento Médico)

Medias y medianas del tiempo de supervivencia							
Media <sup>a</sup>				Mediana			
Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
42,405	6,228	30,198	54,611	33,367	16,863	0,316	66,417

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

**Figura 36: Tasa de Supervivencia (Sólo tto médico). Análisis por grupos.**



**Tabla 34: medias y medianas de tiempo de supervivencia (Sólo Tratamiento Médico). Análisis por grupos.**

Medias y medianas del tiempo de supervivencia								
Angiogénesis	Media <sup>a</sup>				Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
No	12,423	3,349	5,858	18,987	5,633	1,984	1,745	9,522
Si	68,525	7,907	53,027	84,023	67,633	2,636	62,466	72,801
Global	42,405	6,228	30,198	54,611	33,367	16,863	0,316	66,417

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

**Tabla 35: Estadísticos de comparación**

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	22,785	1	0,000
El vector de ponderaciones de tendencia es -1, 1. Éste es el valor por defecto.			

## **5.4 Análisis del Grupo Angiogénesis: población de pacientes sometidos a tratamiento con progenitores hematopoyéticos.**

### **5.4.1. Datos Clínicos.**

#### **5.4.1.1 Análisis descriptivo.**

Fueron incluidos un total de 45 pacientes (50 extremidades) con los criterios de inclusión establecidos y sin criterios de exclusión. La media de edad fue de  $61,07 \pm 16,08$  años, con mayor proporción de individuos varones (77,7%). El seguimiento medio fue de  $41,65 \pm 34,9$  meses [2,13-111,7]. Todos los pacientes presentaron dolor de reposo, y un 75% de los pacientes presentaban lesiones tróficas en el momento de la inclusión. A lo largo del seguimiento un 42,2% de los pacientes (n=19) precisaron de amputación mayor de la extremidad tratada. La proporción de exitus al final del seguimiento fue del 28,8% (n=13). El resto de las características de la población se recogen en la tabla 8 de punto 6.1.1.

#### **5.4.1.2 Análisis Univariante y Multivariante sobre la variable Amputación ( grupo Angiogénesis).**

En el análisis univariante respecto de la variable Amputación (tabla 36), se apreció una mayor frecuencia de amputaciones entre los pacientes diabéticos ( Diabetes 56,52% -vs- No diabetes 25,93% RR 3,714 IC95% 1,128-12,232 p=0,043 ), pacientes con

neumopatía crónica tipo bronquitis o enfisema ( NM 64,28% -vs- No NM 30,55% RR 4,091 IC95% 1,111-15,057 p=0,052), y pacientes con hepatopatía crónica B o C ( HP 100% -vs- No HP 33,3% RR 1,33 IC95% 1,035-1,717 p=0,007 ). Dentro de los tratamientos farmacológicos, la toma de hemorreológicos, se asociaba a una mayor frecuencia de amputación (Si 53,8% -vs- No 25% RR 3,5 IC95% 1,051-11,660 p=0,048).

En el análisis multivariante (tabla 37), la Diabetes (OR 8,793 IC95% mín 1,491 máx 51,870 p=0,016 ) , y el tratamiento farmacológico con Hemorreológicos ( OR 7,337 IC95% mín 1,284 máx 41,921 p=0,025 ), fueron identificados como factores de riesgo de amputación.

**TABLA 36: ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LA POBLACIÓN SOMETIDA A TRATAMIENTO ANGIOGÉNICO. VARIABLE AMPUTACIÓN**

Pacientes sometidos a tratamiento angiogénico: 45 (n=50 extremidades. Cinco pacientes fueron tratados de las dos extremidades ). Extremidades amputadas: 20

Resultados expresados en valor absoluto y porcentaje, respecto de la variable independiente AMPUTACIÓN = SI, sobre una población de 50 extremidades tratadas.

			<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC95%</b>
<b>AMPUTACIÓN = SI</b>					
<b>Amput.</b>	Si (n=20)	No (n=30)			
<b>Edad</b>	62,70±15,24	59,37±15,75	0,461		
<b>Sexo</b>	Masculino (n=39)	Femenino (n=11)			
	17 (43,59%)	3 (27,27%)	0,489	0,485	0,112-2,111
<b>Fumador</b>	Si (n=28)	No (n=22)			
	13 (46,43%)	7 (31,82%)	0,387	1,857	0,579-5,592
<b>Diabetes</b>	Si (n=23)	No (n=27)			
	13 (56,52%)	7 (25,93%)	0,043	3,714	1,128-12,232
<b>HTA</b>	Si (n=29)	No (n=21)			
	11 (37,93%)	9 (42,86%)	0,776	0,815	0,259-2,559
<b>DLP</b>	Si (n=20)	No (n=30)			
	8 (40%)	12 (40%)	1,000	1,000	0,315-3,174
<b>IC</b>	Si (n=7)	No (n=43)			
	1 (14,29%)	19 (44,18%)	0,219	0,211	0,023-1,902
<b>CI</b>	Si (n=11)	No (n=39)			
	4 (36,36%)	16 (41,03%)	1,000	0,821	0,206-3,279
<b>CV</b>	Si (n=7)	No (n=43)			
	3 (42,85%)	17 (39,53%)	1,000	1,147	0,228-5,779
<b>CA</b>	Si (n=8)	No (n=42)			
	3 (37,5%)	17 (40,47%)	1,000	0,882	0,186-4,192
<b>NM</b>	Si (n=14)	No (n=36)			
	9 (64,28%)	11 (30,55%)	0,052	4,091	1,111-15,057

(Continuación tabla 36: Análisis Univariante población Angiogénesis para la variable Amputación )

<b>AMPUTACIÓN = SI</b>		<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC95%</b>
<b><u>O2cron</u></b>	Si (n=1) 1 (100%)	No (n=49) 19 (38,77%)	0,400	1,053 0,952-1,164
<b><u>HP</u></b>	Si (n=5) 5 (100%)	No (n=45) 15 (33,33%)	0,007	1,333 1,035-1,717
<b><u>IRC</u></b>	Si (n=6) 2 (33,33%)	No (n=44) 18 (40,91%)	1,000	0,722 0,119-4,372
<b><u>HM</u></b>	Si (n=2) 0	No (n=48) 20 (41,66%)	0,510	0,933 0,848-1,027
<b><u>NRL</u></b>	Si (n=3) 3 (100%)	No (n=47) 17 (36,17%)	0,058	1,176 0,979-1,414
<b><u>Buerger</u></b>	Si (n=14) 3 (21,42%)	No (n=36%) 17 (47,22%)	0,118	0,305 0,073-1,279
<b><u>Sólo tratamiento Médico</u></b>				
	Si (n=29) 9 (31,03%)	No (n=21) 11 (52,38%)	0,154	0,409 0,128-1,309
<b><u>AG</u></b>	Si (n=42) 16 (38,09%)	No (n=8) 4 (50%)	0,697	0,615 0,135-2,812
<b><u>AC</u></b>	Si (n=21) 10 (47,62%)	No (n=29) 10 (34,48%)	0,393	1,727 0,548-5,448
<b><u>AG+AC</u></b>	Si (n=13) 6 (46,15%)	No (n=37) 14 (37,83%)	0,744	1,408 0,393-5,049
<b><u>Hemorreológico</u></b>				
	Si (n=26) 14 (53,85%)	No (n=24) 6 (25%)	0,048	3,500 1,051-11,660
<b><u>Estatina</u></b>	Si (n=21) 10 (47,62%)	No (n=29) 10 (34,48%)	0,393	1,727 0,548-5,448
<b><u>Hipotensores</u></b>				
	Si (n=27) 8 (29,63%)	No (n=23) 12 (52,17%)	0,149	0,386 0,121-1,234

(Continuación tabla 36: Análisis Univariante población Angiogénesis para la variable Amputación )

<b>AMPUTACIÓN = SI</b>		<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC95%</b>
<b><u>ARA-II</u></b> Si (n=11) 3 (27,27%)	No (n=39) 17 (43,49%)	0,469	0,485	0,112-2,111
<b><u>IECA</u></b> Si (n=16) 5 (31,25%)	No (n=34) 15 (44,11%)	0,538	0,576	0,164-2,020
<b><u>Vasodilatador (Sugiran)</u></b>				
Si (n=12) 4 (33,33%)	No (n=38) 16 (42,10%)	0,740	0,688	0,176-2,684
<b><u>Triple terapia ( Antiagregante+Estatina+Hipotensor )</u></b>				
Si (n=14) 7 (50%)	No (n=36) 13 (36,11%)	0,522	1,769	0,507-6,169

**Abreviaturas:**

ADO: antidiabético oral; HTA : hipertensión arterial; DLP: dislipemia; ICA: insuficiencia cardíaca; CI: cardiopatía isquémica; CV: cardiopatía valvular; CA: cardiopatía arritmogénica; CQ: corrección quirúrgica de la cardiopatía; NM: neumopatía crónica tipo bronquitis o enfisema; O2cron: oxigenoterapia crónica; HP: hepatopatía virus hepatitis B/C crónica; IRC: insuficiencia renal crónica/nefropatía crónica; NRL: antecedente neurológico isquémico Ictus/AIT; AG: antiagregante; AC:anticoagulante; AG+AC: antiagregante+anticoagulante; ARA-II: antagonista de receptor de Angiotensina-II; IECA: inhibidor de la enzima convertora de angiotensina.

**TABLA 37: ANÁLISIS MULTIVARIANTE GRUPO ANGIOGÉNESIS: AMPUTACIÓN**

Pacientes sometidos a tratamiento angiogénico: 45

Extremidades sometidas a tratamiento angiogénico: 50 ( 5 pacientes fueron tratados de las 2 extremidades )

	Variables en la ecuación							
	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95% para EXP(B)	
							Inferior	Superior
<b>Diabetes</b>	2,174	0,906	5,764	1	0,016	8,793	1,491	51,870
<b>Neumopatía</b>	0,465	0,952	0,239	1	0,625	1,592	0,246	10,289
<b>Hepatopatía</b>	23,745	15426,808	0,000	1	0,999	2,053E+10	0,000	.
<b>Neuropatía</b>	19,099	19027,306	0,000	1	0,999	1,971E+10	0,000	.
<b>Hemorreológico</b>	1,993	0,889	5,023	1	0,025	7,337	1,284	41,921

**Resumen del modelo**

-2 log de la	R cuadrado de Cox y	R cuadrado de
verosimilitud	Snell	Nagelkerke
38,670 <sup>a</sup>	0,436	0,589

**Prueba de Hosmer y Lemeshow**

Chi cuadrado	gl	Sig.
1,525	6	0,958

#### 5.4.1.3 Análisis Univariante y Multivariante sobre la variable Exitus

(grupo Angiogénesis).

En el análisis univariante (tabla 38) se apreció diferencias significativas en la media de edad de los pacientes con mortalidad asociada (Exitus: Si  $70,2 \pm 6,7$  años -vs- No  $56,6 \pm 16,4$  años  $p=0,003$ ).

Hubo mayor mortalidad entre los pacientes diabéticos ( DM 50% -vs- No DM 8,7% RR 10,5 IC95% 1,969-55,998  $p= 0,003$ ), pacientes hipertensos (HTA 42,3% -vs- No HTA 10,52% RR 6,233 IC95% 1,186-32,724  $p=0,024$ ), en pacientes con antecedente de cirugía cardíaca (CQ 71,42% -vs- No CQ 21,05% RR 9,375 IC95% 1,525-57,621  $p=0,015$ ), y en pacientes con Insuficiencia Renal Crónica ( IRC 66,6% -vs- No IRC 23,08% RR 6,667 IC95% 1,044-42,553  $p=0,049$ ). Los pacientes con diagnóstico clínico de enfermedad de Buerger no presentaron mortalidad asociada al final del seguimiento ( Buerger 0% -vs- No Buerger 39,3% RR 0,635 IC95% 0,478-0,817  $p=0,01$ )

Entre los tratamientos farmacológicos, la toma de anticoagulantes se asoció con una mayor mortalidad (AC 47% -vs- No AC 17,8% RR 4,089 IC95% 1,052-15,8  $p= 0,048$ ).

En el análisis multivariante (tabla 39) no se identificaron factores de riesgo de mortalidad.

**TABLA 38: ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LA POBLACIÓN SOMETIDA A TRATAMIENTO ANGIOGÉNICO. VARIABLE EXITUS**

Población sometida a tratamiento angiogénico: 45 Exitus al final del seguimiento: 13 pacientes

Dentro del factor analizado, entre paréntesis se muestra el valor absoluto de la condición cualitativa analizada (Si/No). Resultados expresados en valor absoluto y porcentaje, respecto de la variable independiente EXITUS=SI.

<b>EXITUS=SI</b>			<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC95%</b>
<b><u>Edad</u></b>			0,003		
exitus Si: 70,27±6,73					
exitus No: 56,6±16,4					
<b><u>Sexo</u></b>	Masculino (n=35)	Femenino (n=10)			
	10 (28,57%)	3 (30%)	1,000	1,071	0,230-4,990
<b><u>Fumador</u></b>	Si (n=25)	No (n=20)			
	6 (24%)	7 (35%)	0,515	0,586	0,160-2,149
<b><u>Diabetes</u></b>	Si (n=22)	No (n=23)			
	11 (50%)	2 (8,7%)	0,003	10,500	1,969-55,998
<b><u>HTA</u></b>	Si (n=26)	No (n=19)			
	11 (42,30%)	2 (10,52%)	0,024	6,233	1,186-32,748
<b><u>DLP</u></b>	Si (n=19)	No (n=26)			
	7 (36,84%)	6 (23,07%)	0,341	1,944	0,528-7,166
<b><u>IC</u></b>	Si (n=6)	No (n=39)			
	3 (50%)	10 (25,64%)	0,334	2,900	0,502-16,760
<b><u>CI</u></b>	Si (n=10)	No (n=35)			
	5 (50%)	8 (22,85%)	0,124	3,375	0,776-14,669
<b><u>CV</u></b>	Si (n=7)	No (n=38)			
	4 (57,14%)	9 (23,68%)	0,168	4,296	0,806-22,900
<b><u>CA</u></b>	Si (n=8)	No (n=37)			
	1 (12,5%)	12 (32,43%)	0,405	0,298	0,033-2,701

(Continuación tabla 38: Análisis Univariante población Angiogénesis para la variable Exitus)

<b>EXITUS=SI</b>		<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC95%</b>
<b><u>CQ</u></b>	Si (n=7) 5 (71,42%)	No (n=38) 8 (21,05%)	0,015	9,375 1,525-57,621
<b><u>NM</u></b>	Si (n=13) 6 (46,15%)	No (n=32) 7 (21,87%)	0,149	3,061 0,774-12,111
<b><u>O2cron</u></b>	Si (n=1) 1 (100%)	No (n=44) 13 (29,54%)	1,000	0,969 0,910-1,031
<b><u>HP</u></b>	Si (n=5) 5 (100%)	No (n=40) 13 (32,5%)	0,301	0,844 0,727-0,979
<b><u>IRC</u></b>	Si (n=6) 4 (66,67%)	No (n=39) 9 (23,08%)	0,049	6,667 1,044-42,553
<b><u>HM</u></b>	Si (n=1) 1 (100%)	No (n=44) 12 (27,27%)	0,289	1,083 0,926-1,267
<b><u>NRL</u></b>	Si (n=3) 1 (33,33%)	No (n=42) 12 (28,57%)	1,000	1,250 0,103-15,108
<b><u>Buerger</u></b>	Si (n=12) 0	No (n=33) 13 (39,39%)	0,010	0,625 0,478-0,817
<b><u>Solo Tratamiento Médico</u></b>				
	Si (n=26) 8 (30,77%)	No (n=19) 5 (26,31%)	1,000	1,244 0,333-4,648
<b><u>AG</u></b>	Si (n=37) 10 (27,02%)	No (n=8) 3 (37,5%)	0,672	0,617 0,124-3,072
<b><u>AC</u></b>	Si (n=17) 8 (47,06%)	No (n=28) 5 (17,85%)	0,048	4,089 1,052-15,888
<b><u>AG+AC</u></b>	Si (n=9) 5 (55,56%)	No (n=36) 8 (22,22%)	0,094	4,375 0,946-20,238
<b><u>Hemorreológico</u></b>				
	Si (n=24) 4 (16,67%)	No (n=21) 9 (42,85%)	0,098	0,267 0,067-1,058

(Continuación tabla 38: Análisis Univariante población Angiogénesis para la variable Exitus)

<b>EXITUS=SI</b>		<b>p</b>	<b>RR</b>	<b>IC95%</b>
<b><u>Estatina</u></b> Si (n=21) 7 (33,33%)	No (n=24) 6 (25%)	0,743	1,500	0,411-5,476
<b><u>Hipotensores</u></b>				
Si (n=24) 11(45,83%)	No (n=21) 2 (9,52%)	0,009	8,038	1,523-42,430
<b><u>ARA-II</u></b> Si (n=10) 5 (50%)	No (n=35) 8 (22,85%)	0,124	3,375	0,776-14,669
<b><u>IECA</u></b> Si (n=14) 6 (42,85%)	No (n=24) 7 (29,16%)	0,286	2,571	0,665-9,944
<b><u>Vasodilatador (Sugiran)</u></b>				
Si (n=10) 1 (10%)	No (n=35) 12 (34,28%)	0,238	0,213	0,024-1,885
<b><u>Triple terapia (Antiagregante+Estatina+Hipotensor)</u></b>				
Si (n=14) 6 (42,85%)	No (n=31) 7 (22,58%)	0,286	2,571	0,665-9,944

**Abreviaturas:**

ADO: antidiabético oral; HTA : hipertensión arterial; DLP: dislipemia; ICA: insuficiencia cardíaca; CI: cardiopatía isquémica; CV: cardiopatía valvular; CA: cardiopatía arritmogénica; CQ: corrección quirúrgica de la cardiopatía; NM: neumopatía crónica tipo bronquitis o enfisema; O2cron: oxigenoterapia crónica; HP: hepatopatía virus hepatitis B/C crónica; IRC: insuficiencia renal crónica/nefropatía crónica; NRL: antecedente neurológico isquémico Ictus/AIT; AG: antiagregante; AC:anticoagulante; AG+AC: antiagregante+anticoagulante; ARA-II: antagonista de receptor de Angiotensina-II; IECA: inhibidor de la enzima convertora de angiotensina.

**TABLA 39: ANÁLISIS MULTIVARIANTE GRUPO ANGIOGÉNESIS: EXITUS**

Pacientes sometidos a tratamiento Angiogénico: 45

Pacientes exitus al final de seguimiento: 13

	<b>Variables en la ecuación</b>							
	<b>B</b>	<b>E.T.</b>	<b>Wald</b>	<b>gl</b>	<b>Sig.</b>	<b>Exp(B)</b>	<b>I.C. 95% para EXP(B)</b>	
							<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
<b>edad</b>	-0,057	0,026	4,695	1	0,030	0,945	0,898	0,995
<b>Diabetes</b>	2,406	1,321	3,316	1	0,069	11,095	0,832	147,881
<b>Hipertension</b>	-1,703	1,435	1,407	1	0,236	0,182	0,011	3,036
<b>Cardiopatíaoperada</b>	1,039	1,160	0,802	1	0,370	2,826	0,291	27,445
<b>Nefropatía</b>	1,096	1,165	0,886	1	0,347	2,993	0,305	29,358
<b>Buerger</b>	-19,468	11052,44	0,000	1	0,999	0,000	0,000	.
<b>ACO</b>	1,346	1,018	1,748	1	0,186	3,840	0,523	28,223
<b>Hipotensores</b>	2,804	1,648	2,893	1	0,089	16,506	0,653	417,554

VARIABLES INTRODUCIDAS: edad, Diabetes, Hipertensión, Cardiopatía operada, Nefropatía, Buerger, Anticoagulantes orales (ACO), Hipotensores.

<b>Resumen del modelo</b>		
-2 log de la verosimilitud	R cuadrado de Cox y Snell	R cuadrado de Nagelkerke
33,578 <sup>a</sup>	0,473	0,630

<b>Prueba de Hosmer y Lemeshow</b>		
Chi cuadrado	gl	Sig.
16,104	7	0,024

#### 5.4.1.4 Tablas de Supervivencia (Kaplan-Meier). Grupo Angiogénesis

En el grupo de pacientes tratados con terapia angiogénica, la tasa global de salvamento de extremidad fue del 76,8% a 12 meses de seguimiento (tabla 15, apartado 6.1.4). La figura 30 (apartado 6.1.4) muestra la tabla de Kaplan-Meier. La distribución de eventos se muestra en la tabla 2 (anexo 1).

Se apreciaron peores tasas de salvamento de extremidad entre aquellos pacientes diabéticos (media de tiempo en meses: Diabéticos  $38,95 \pm 8,64$  -vs- No diabéticos  $86,68 \pm 8,14$   $p=0,003$ ) (figura 37), en pacientes con enfermedad pulmonar (media de tiempo en meses: Neumopatía  $37,16 \pm 10,78$  -vs- No neumopatía  $79,88 \pm 7,88$   $p= 0,007$ ), (figura 38), en pacientes con enfermedad hepática (media de tiempo en meses: Hepatopatía  $20,66 \pm 8,7$  -vs- No hepatopatía  $75,37 \pm 7,51$   $p= 0,002$ ), (figura 39) y en pacientes con tratamiento hemorreológico (media de tiempo en meses: Hemorreológico  $51,759 \pm 10,434$  -vs- No hemorreológico  $81,9 \pm 8,59$   $p=0,026$ ), (figura 40). La distribución de los eventos de las tablas de Kaplan-Meier se muestran en las tablas 9,10,11, y 12 del anexo 1)

A pesar de que las diferencias objetivadas, en términos de amputación mayor, entre los pacientes con diagnóstico clínico de enfermedad de Buerger y los pacientes con enfermedad arteriosclerótica no mostraron significación estadística, la tasa de salvamento de extremidad fue superior entre los pacientes con enfermedad de Buerger tratados con terapia angiogénica (figura 41). La distribución de los eventos de la tabla de Kaplan-Meier se muestra en las tablas 13 del anexo 1.

Dentro del grupo de pacientes amputados ( $n=19$ ), dos pacientes precisaron amputación mayor por progresión de infección cutánea y el resto por dolor no controlado.

La mortalidad al final del seguimiento en los pacientes tratados con terapia angiogénica fue del 28% (tabla 9, apartado 6.1.1), con una tasa de supervivencia a 60 meses del 33,3% (figura 32, apartado 6.1.4) (tabla 4, anexo 1).

El análisis de Kaplan-Meier demostró mayor tasa de supervivencia en los pacientes No diabéticos (Diabetes  $43,651 \pm 9,517$  -vs- No diabéticos  $100,13 \pm 7,197$   $p=0,000$ ), y en aquellos que no hubiesen requerido Corrección Quirúrgica de su patología cardíaca (CQ  $37,494 \pm 8,2$  -vs- No CQ  $83,249 \pm 7,78$   $p=0,014$ ). (Figuras 42 y 43). Las causas de mortalidad se exponen en la tabla 40.

Tabla 40: causas de mortalidad en grupo Angiogénesis

<b>Causa de exitus</b>	<b>Nº casos</b>
Insuficiencia Cardíaca	5
Neumonía	4
Neoplasia pulmonar	1
Sepsis urinaria	2
Cardiopatía isquémica	1
<b>Total</b>	<b>13</b>

**Figura 37: Tasa de Salvamento de Extremidad (grupo Angiogénesis). Análisis por pertenencia a grupo con Diabetes.**

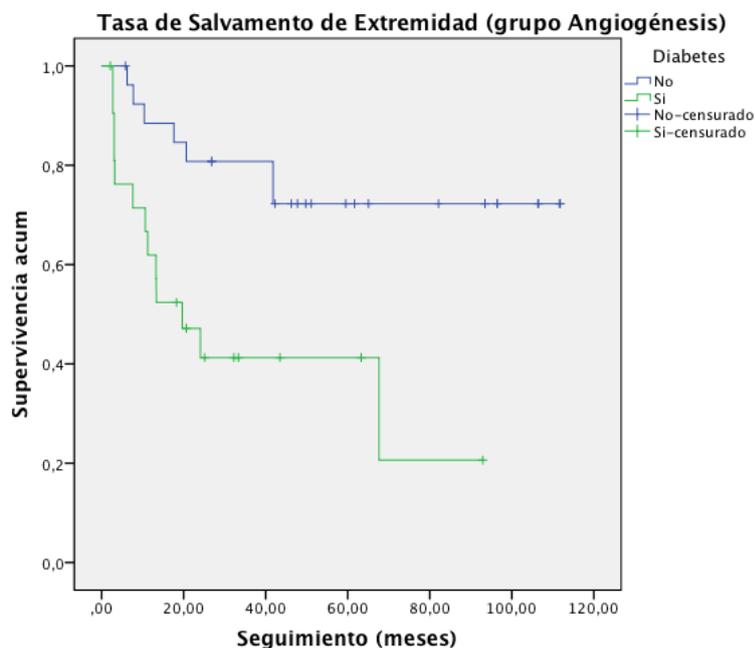


Tabla 41: medias y medianas de tiempo (meses) de salvamento de extremidad (grupo Angiogénesis). Análisis por pertenencia a Diabetes.

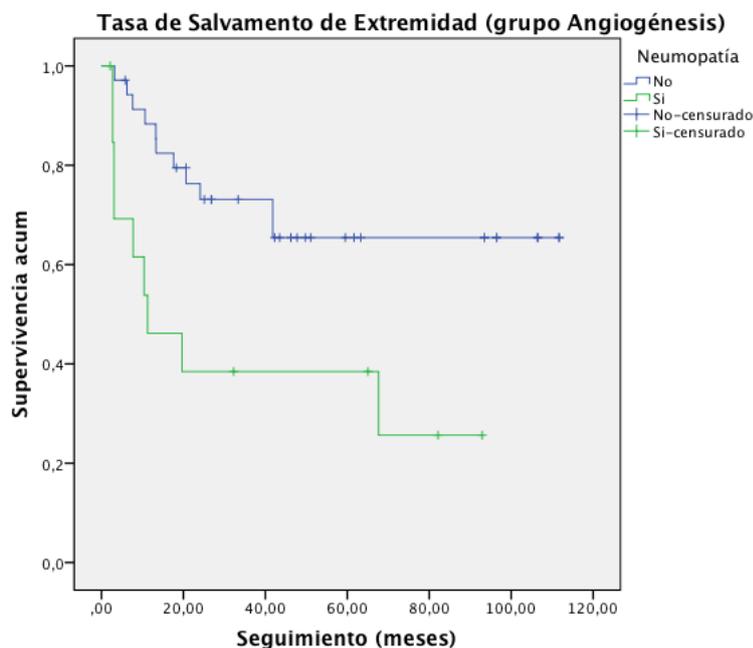
Medias y medianas del tiempo de supervivencia								
Diabetes	Media <sup>a</sup>				Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
No	86,685	8,148	70,714	102,656	.	.	.	.
Si	38,945	8,640	22,010	55,880	19,667	7,495	4,976	34,357
Global	68,742	7,264	54,505	82,980	.	.	.	.

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Tabla 42: estadístico de comparación

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	8,888	1	0,003
El vector de ponderaciones de tendencia es -1, 1. Éste es el valor por defecto.			

**Figura 38: Tasa de Salvamento de Extremidad (grupo Angiogénesis). Análisis por pertenencia a grupo con Neumopatía**



**Tabla 43: medias y medianas de tiempo (meses) de salvamento de extremidad (grupo Angiogénesis). Análisis por pertenencia a neumopatía.**

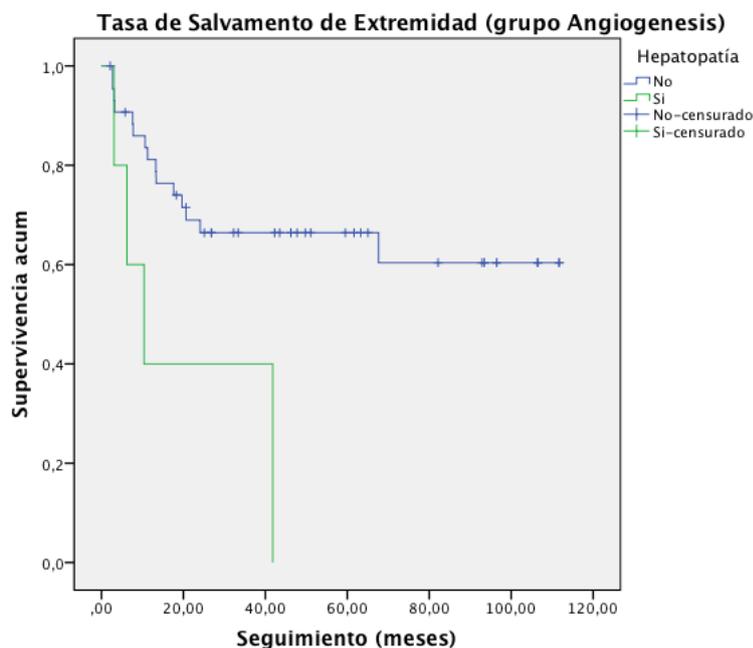
Medias y medianas del tiempo de supervivencia								
Neumopatía	Media <sup>a</sup>				Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
No	79,834	7,885	64,380	95,288	.	.	.	.
Si	37,167	10,781	16,035	58,298	11,267	7,150	0,000	25,280
Global	68,742	7,264	54,505	82,980	.	.	.	.

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

**Tabla 44: estadísticos de comparación**

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	7,388	1	0,007
Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de Neumopatía.			

**Figura 39: Tasa de Salvamento de Extremidad (grupo Angiogénesis). Análisis por pertenencia a grupo con Hepatopatía.**



**Tabla 45: medias y medianas de tiempo (meses) de salvamento de extremidad (grupo Angiogénesis). Análisis por pertenencia a hepatopatía.**

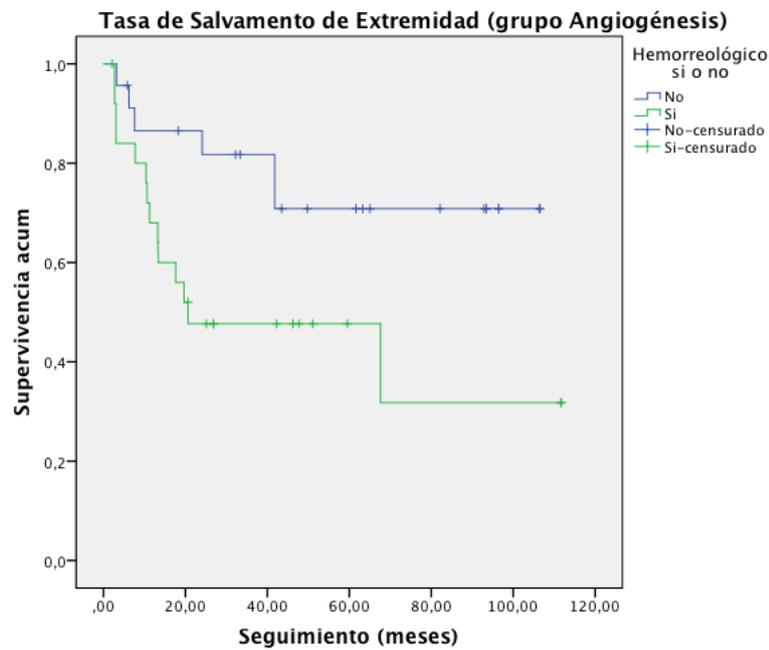
Medias y medianas del tiempo de supervivencia								
Hepatopatía	Media <sup>a</sup>				Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
No	75,371	7,518	60,636	90,106	.	.	.	.
Si	20,660	8,708	3,592	37,728	10,400	4,564	1,454	19,346
Global	68,742	7,264	54,505	82,980	.	.	.	.

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

**Tabla 46: estadísticos de comparación**

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	9,151	1	0,002
Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de Hepatopatía.			

**Figura 40: Tasa de Salvamento de Extremidad (grupo Angiogénesis ). Análisis por pertenencia a grupo en tratamiento hemorreológico.**



**Tabla 47: medias y medianas de tiempo (meses) de salvamento de extremidad (grupo Angiogénesis). Análisis según toma de hemorreológico.**

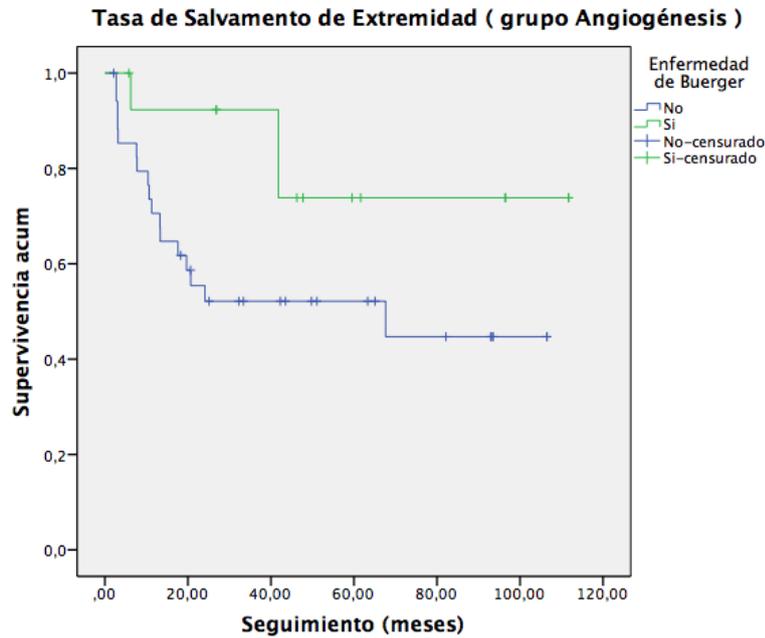
Medias y medianas del tiempo de supervivencia								
Hemorreológico	Media <sup>a</sup>				Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
No	81,901	8,599	65,047	98,755	.	.	.	.
Si	51,759	10,434	31,309	72,209	20,667	20,770	0,000	61,376
Global	68,742	7,264	54,505	82,980	.	.	.	.

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

**Tabla 48: estadístico de comparación**

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	4,956	1	0,026
El vector de ponderaciones de tendencia es -1, 1. Éste es el valor por defecto.			

**Figura 41: Tasa de Salvamento de Extremidad (grupo Angiogénesis). Análisis por pertenencia a grupo con Enfermedad de Buerger.**



**Tabla 49: medias y medianas de tiempo (meses) de salvamento de extremidad (grupo Angiogénesis). Análisis según diagnóstico de Enfermedad de Buerger.**

Medias y medianas del tiempo de supervivencia								
Enfermedad de Buerger	Media <sup>a</sup>				Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de	
			Límite inferior	Límite superior			confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
No	57,840	8,289	41,593	74,087	67,633	44,527	0,000	154,907
Si	90,683	10,598	69,910	111,456	.	.	.	.
Global	68,742	7,264	54,505	82,980	.	.	.	.

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

**Tabla 50: estadístico de comparación**

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	3,296	1	0,069
El vector de ponderaciones de tendencia es -1, 1. Éste es el valor por defecto.			

**Figura 42: Tasa de Supervivencia (grupo Angiogénesis). Análisis por pertenencia a grupo con Diabetes**

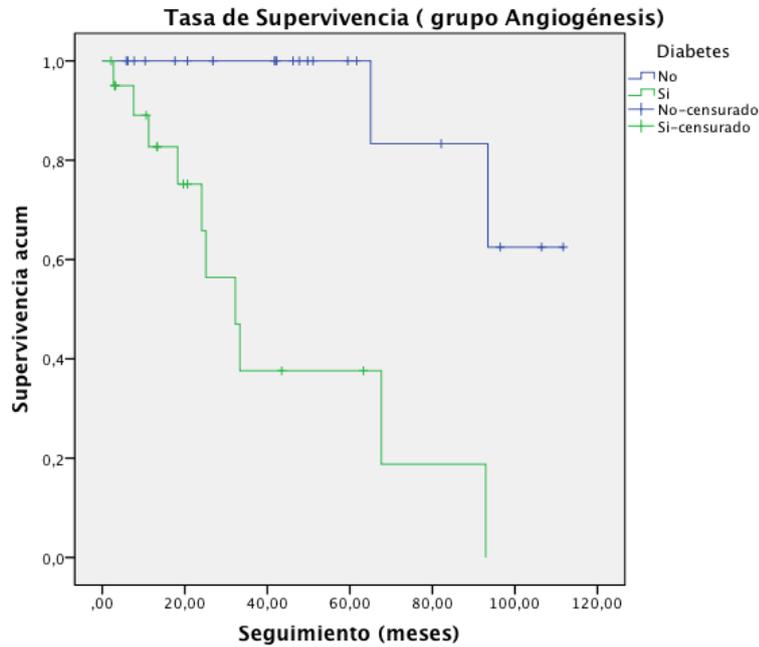


Tabla 51: medias y medianas de tiempo (meses) de supervivencia (grupo Angiogénesis). Análisis según diagnóstico de Diabetes.

Medias y medianas del tiempo de supervivencia								
Diabetes	Media <sup>a</sup>				Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
No	100,129	7,197	86,022	114,236	.	.	.	.
Si	43,651	9,517	24,997	62,305	32,267	6,416	19,691	44,842
Global	75,700	7,643	60,721	90,680	92,933	32,580	29,077	156,789

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Tabla 52: estadístico de comparación

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	17,581	1	0,000
Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de Diabetes.			

**Figura 43: Tasa de Supervivencia (grupo Angiogénesis). Análisis según antecedente de corrección quirúrgica de patología cardíaca.**

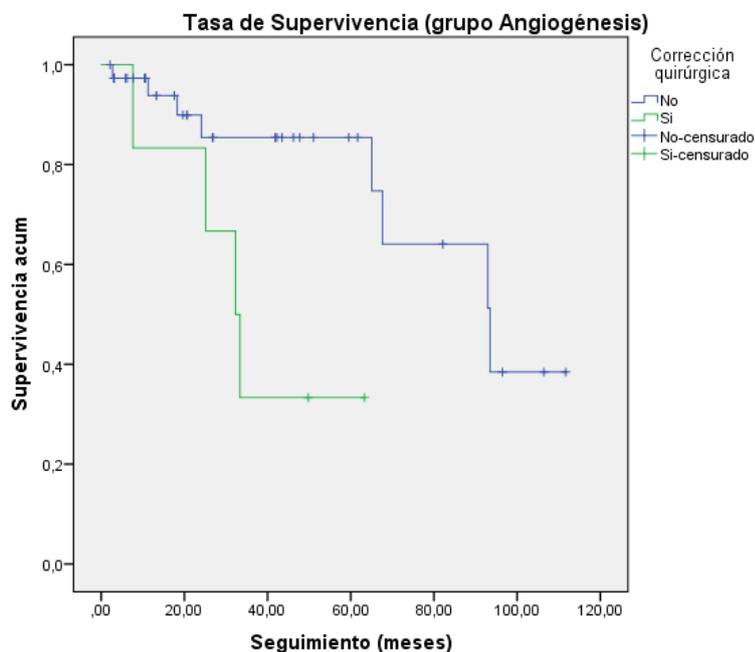


Tabla 53: medias y medianas de tiempo (meses) de supervivencia (grupo Angiogénesis). Análisis según antecedente quirúrgico cardíaco.

Medias y medianas del tiempo de supervivencia								
Corrección quirúrgica	Media <sup>a</sup>				Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
No	83,249	7,783	67,994	98,505	93,467	16,509	61,108	125,825
Si	37,494	8,202	21,419	53,569	32,267	5,062	22,345	42,189
Global	75,700	7,643	60,721	90,680	92,933	32,580	29,077	156,789

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Tabla 54: estadístico de comparación.

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	6,080	1	0,014
Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de Corrección quirúrgica.			

#### 5.4.1.5 Métodos de control postprocedimiento

Respecto a los métodos de control postprocedimiento, se objetivó una mejoría en las presiones segmentarias de las extremidades, que se correlacionaron con una mejoría del índice tobillo brazo (media de ITB: pretratamiento  $0,471\pm 0,524$  -vs- final seguimiento  $0,614\pm 0,481$   $p=0,063$ ). No se apreciaron diferencias significativas entre las cifras medias del ITB obtenidas en los pacientes amputados y no amputados, en situación basal (media de ITB pretratamiento: amputados  $0,580\pm 0,655$  -vs- no amputados  $0,398\pm 0,411$   $p=0,235$ ), y post-tratamiento (media de ITB post-tratamiento: amputados  $0,482\pm 0,543$  -vs- no amputados  $0,702\pm 0,422$   $p=0,115$ ).

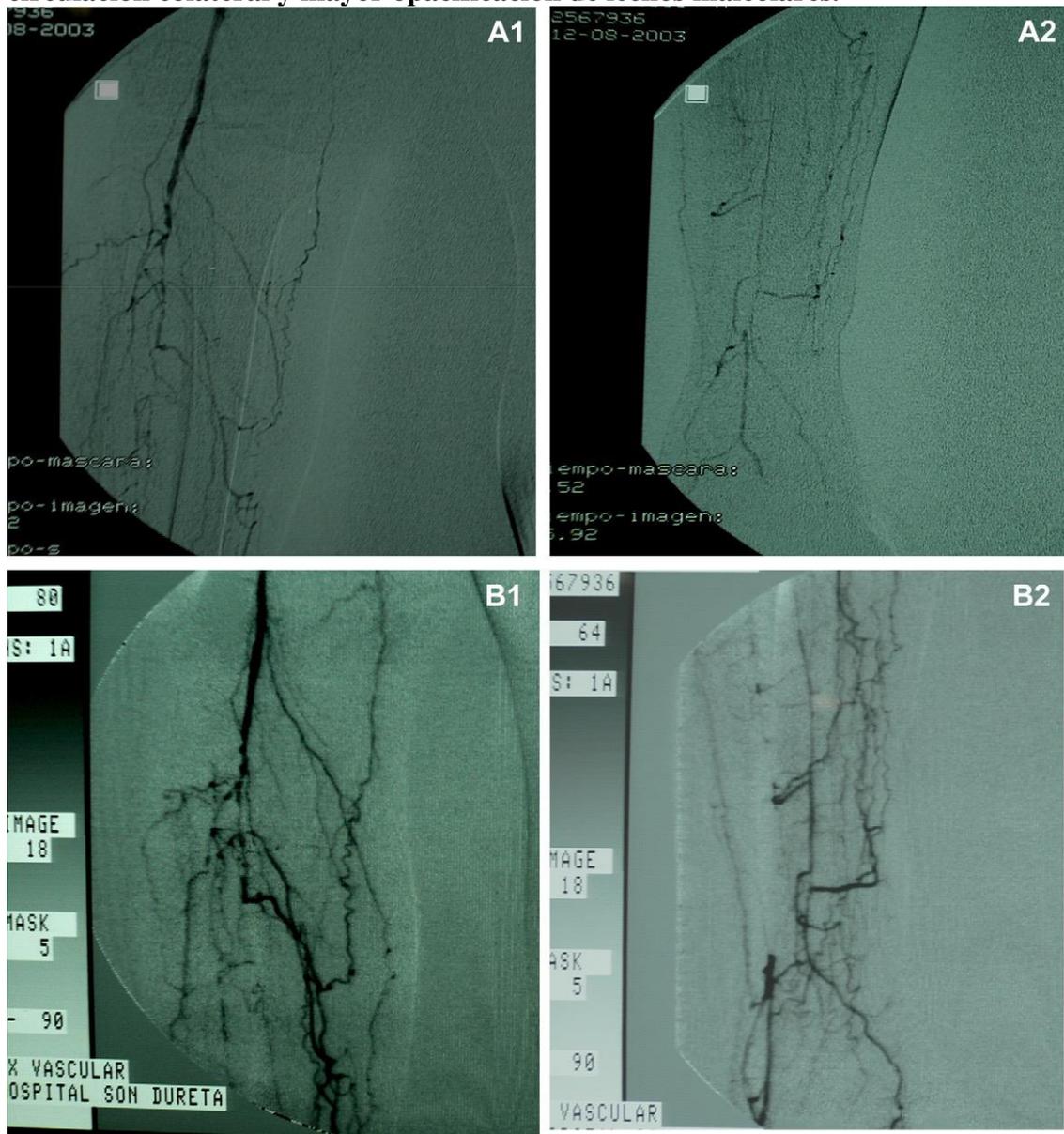
Se realizó estudio arteriográfico a los 12 meses de la implantación en los 7 primeros pacientes que presentaron mejoría clínica, hemodinámica y sintomática. A pesar de apreciar un aparente incremento de la circulación colateral, respecto de la situación basal, se decidió suspender este procedimiento en los casos posteriores, debido al grado de subjetividad implícito a la interpretación de las imágenes, y a la variabilidad de los resultados en función del tiempo de escopia y cantidad de contraste empleado (figura 44). Uno de los pacientes fue valorado mediante Resonancia Magnética Nuclear de perfusión, apreciando incremento de la perfusión de la extremidad tratada (figura 45).

Desde el punto de vista clínico, los pacientes refirieron mejoría de su calidad de vida, objetivada por menores necesidades analgésicas y mejoría de la puntuación en la escala de valoración del dolor (Escala Visual Analógica, donde 10 es dolor no controlado y 0 ausencia de dolor. Media de puntuación EVA: pretratamiento  $8,78\pm 1,13$  -vs- final de seguimiento  $4,50\pm 3,67$   $p=0,000$ ).

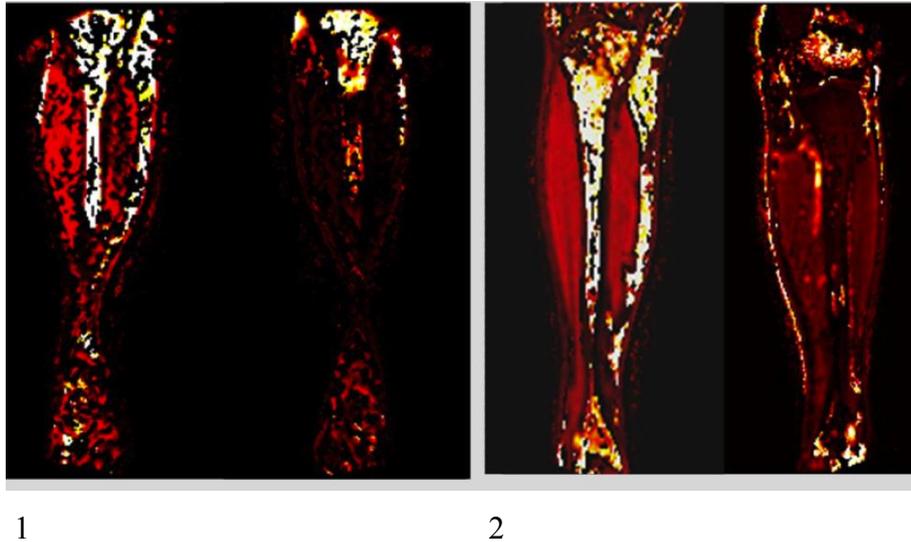
Se apreciaron diferencias significativas en la media de puntuación EVA entre los pacientes amputados y no amputados, en situación basal (media EVA pretratamiento:

amputados  $9,6 \pm 0,68$  -vs- no amputados  $8,23 \pm 1,04$   $p=0,000$  ), y post-tratamiento ( media EVA post-tratamiento: amputados  $8,1 \pm 2,65$  -vs- no amputados  $2,1 \pm 1,82$   $p=0,000$  ).

**Figura 44: Arteriografías diagnósticas: A1 y A2 son estudios pretratamiento. B1 y B2 son estudios a los 12 meses postimplantación. Se identifica incremento de la circulación colateral y mayor opacificación de lechos maleolares.**



**Figura 45: ARM perfusión: imágenes paramétricas que muestran la diferencia de perfusión entre ambas extremidades en el estudio basal (imagen 1), y a los 6 meses de tratamiento en la pierna derecha (imagen 2). El estudio no corresponde al paciente de la figura 44.**



Sólo se apreció un único caso de elevación de enzimas hepáticas después de la movilización celular, que se normalizó a las 2 semanas. El paciente no presentaba enfermedad hepática previa, y las serologías virales realizadas previamente a la inclusión en el estudio fueron negativas. No se apreciaron otros efectos adversos durante la técnica de movilización y/o el proceso de aféresis. Tan sólo un paciente presentó edema de extremidad en el postoperatorio inmediato, sin síndrome compartimental asociado. Se realizó estudio mediante ecografía de partes blandas y sonda doppler, que descartó trombosis venosa profunda. Este edema se atribuyó al incremento del volumen compartimental secundario a la implantación intramuscular.

No se han identificado complicaciones hematológicas ni oncológicas derivadas de la movilización, ni de la implantación de progenitores hematopoyéticos, durante el seguimiento. El único paciente que presentó como causa final de muerte, complicaciones derivadas de un proceso oncológico, fue diagnosticado de neoplasia pulmonar a los 6 años del tratamiento con progenitores hematopoyéticos; se trataba de

un paciente varón, EPOC y con antecedente de tabaquismo activo, por lo que no creemos probable la relación causa-efecto entre el tratamiento aplicado y el diagnóstico de neoplasia pulmonar.

#### **5.4.2 Datos Biológicos**

Se determinó peso y talla de los pacientes en cada sesión de aféresis, así como la superficie corporal. Se realizaron determinaciones analíticas basales y en el momento de la aféresis, con el fin de determinar el rendimiento de la movilización celular en sangre periférica tras la administración de G-CSF. Se realizaron determinaciones analíticas de la celularidad del inóculo implantado en cada uno de los casos.

El modelo de recogida de datos y los resultados analíticos para cada una de las extremidades tratadas se exponen en las tablas 16, 17 y 18 del Anexo 1.

##### **5.4.2.1 Análisis de la celularidad basal y rendimiento celular.**

Los datos de celularidad basal y post movilización celular para cada una de la extremidades tratadas se exponen en las tablas 16 y 17 del anexo 1. La media de los datos analíticos se exponen en las tablas 55, 56, 57 y 58. No se apreciaron diferencias significativas en la celularidad basal de los pacientes, agrupados según la variable Amputación.

Tras el tratamiento con G-CSF, se produjo un rendimiento positivo de las cifras de leucocitos, neutrófilos, linfocitos absolutos y monocitos absolutos, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (tabla 59). En el análisis de datos agrupados

según la variable amputación, no se apreciaron diferencias significativas entre los grupos (tabla 60).

**Tabla 55: Media de la celularidad basal en sangre periférica de los pacientes sometidos a terapia angiogénica**

	Estadísticos descriptivos			
	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
<b>Leucocitos 10*3/microL</b>	4,93	22,16	9,1648	3,41688
<b>Neutrofilos 10*3/microL</b>	2,20	17,50	6,2100	2,91375
<b>Linfocitos 10*3/microL</b>	0,70	3,80	2,0540	0,79655
<b>Monocitos 10*3/microL</b>	0,20	1,50	0,6258	0,27885
<b>Hemoglobina g/dl</b>	8,90	16,40	13,0540	1,80237
<b>Hematocrito %</b>	29,20	50,00	39,3644	4,94098
<b>Hematías 10*6/microL</b>	3,18	5,69	4,5094	0,56454
<b>Plaquetas 10*3 / microL</b>	123,00	483,00	246,6248	83,51063

**Tabla 56: Celularidad basal. Estratificación según variable amputación**

	Estadísticos de grupo					
	Amputación	N	Media	Desviación típ.	Error típico	p
<b>Leucocitos 10*3/microL</b>	No	30	8,5683	2,29073	0,41823	0,357
	Si	20	10,0595	4,54925	1,01724	
<b>Neutrofilos 10*3/microL</b>	No	30	5,6767	1,95690	0,35728	0,400
	Si	20	7,0100	3,86358	0,86392	
<b>Linfocitos 10*3/microL</b>	No	30	2,0413	0,75002	0,13693	0,890
	Si	20	2,0730	0,88154	0,19712	
<b>Monocitos 10*3/microL</b>	No	30	0,6147	0,29445	0,05376	0,881
	Si	20	0,6425	0,26020	0,05818	
<b>Hemoglobina g/dl</b>	No	30	12,9767	1,69958	0,31030	0,913
	Si	20	13,1700	1,98630	0,44415	
<b>Hematocrito %</b>	No	30	38,8740	4,23391	0,77300	0,692
	Si	20	40,1000	5,88647	1,31625	
<b>Hematías 10*6/microL</b>	No	30	4,5333	0,53913	0,09843	0,692
	Si	20	4,4735	0,61321	0,13712	
<b>Plaquetas 10*3 / microL</b>	No	30	239,4080	77,92661	14,22739	0,526
	Si	20	257,4500	92,25735	20,62937	

**Tabla 57: media de celularidad en sangre periférica tras movilización con G-CSF, en los pacientes sometidos a terapia angiogénica.**

	Estadísticos descriptivos			
	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Leucocitos aféresis 10*3/microL	6,94	63,00	33,1276	12,72938
Neutrofilos aféresis 10*3/microL	4,60	47,60	26,5084	10,51206
Linfocitos aféresis 10*3/microL	0,00	9,20	2,8680	1,97639
Monocitos aféresis 10*3/microL	0,20	2,70	1,1390	0,64995
Hemoglobina aféresis g/dl	8,80	16,40	12,8880	1,69497
Hematocrito aféresis %	27,50	50,00	38,5080	4,98131
Hematies aféresis 10*6/microL	2,99	6,85	4,4662	0,72220
Plaquetas aféresis 10*3/microL	89,00	656,00	243,9600	111,02031

**Tabla 58: Celularidad post-movilización. Estratificación según variable amputación.**

	Amputación	Estadísticos de grupo				
		N	Media	Desviación típ.	Error típico	p
Leucocitos aféresis 10*3/microL	No	30	34,8090	12,86454	2,34873	0,332
	Si	20	30,6055	12,41474	2,77602	
Neutrofilos aféresis 10*3/microL	No	30	27,0967	10,22382	1,86661	0,692
	Si	20	25,6260	11,13894	2,49074	
Linfocitos aféresis 10*3/microL	No	30	3,0890	2,17345	0,39682	0,649
	Si	20	2,5365	1,63422	0,36542	
Monocitos aféresis 10*3/microL	No	30	1,1037	0,61508	0,11230	0,721
	Si	20	1,1920	0,71208	0,15923	
Hemoglobina aféresis 10*3/microL	No	30	12,7200	1,64073	0,29956	0,685
	Si	20	13,1400	1,78573	0,39930	
Hematocrito aféresis %	No	30	37,6500	4,88190	0,89131	0,181
	Si	20	39,7950	4,97091	1,11153	
Hematies aféresis 10*6/microL	No	30	4,5090	0,85387	0,15589	0,707
	Si	20	4,4020	0,47439	0,10608	
Plaquetas aféresis 10*3/microL	No	30	235,8333	99,43533	18,15432	0,539
	Si	20	256,1500	128,19856	28,66607	

**Tabla 59: rendimiento celular en sangre periférica tras tratamiento con G-CSF.**

	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. típ.</b>	<b>p</b>
<b>Rendimiento leucocitos</b>	-1,01	54,76	23,9628	12,87350	0,000
<b>Rendimiento neutrófilos</b>	-1,00	42,90	20,2984	10,72245	0,000
<b>Rendimiento linfocitos absolutos</b>	-3,80	7,00	0,8140	1,89747	0,002
<b>Rendimiento monocitos absolutos</b>	-0,40	2,30	0,5132	0,65313	0,000
<b>Rendimiento Hemoglobina</b>	-2,30	6,30	-0,1660	1,34458	0,000
<b>Rendimiento Hematocrito</b>	-7,40	16,80	-0,8564	4,41955	0,047
<b>Rendimiento Hematíes</b>	-1,03	2,35	-0,0432	0,65375	0,047
<b>Rendimiento Plaquetas</b>	-151,00	173,00	-2,6648	63,31457	0,302

**Tabla 60: Rendimiento Celular. Estratificación según variable amputación.**

<b>Estadísticos de grupo</b>						
	<b>Amputación</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación típ.</b>	<b>Error típico</b>	<b>p</b>
<b>Rendimiento leucocitos</b>	No	30	26,2407	12,34350	2,25360	0,322
	Si	20	20,5460	13,20481	2,95268	n.s
<b>Rendimiento neutros</b>	No	30	21,4200	9,68843	1,76886	0,627
	Si	20	18,6160	12,17659	2,72277	n.s
<b>Rendimiento linfocitos absolutos</b>	No	30	1,0477	2,07699	0,37921	0,322
	Si	20	0,4635	1,57648	0,35251	n.s
<b>Rendimiento monocitos absolutos</b>	No	30	0,4890	0,59362	0,10838	0,953
	Si	20	0,5495	0,74829	0,16732	n.s
<b>Rendimiento Hemoglobina</b>	No	30	-0,2567	1,58407	0,28921	0,134
	Si	20	-0,0300	0,89449	0,20001	n.s
<b>Rendimiento Hematocrito</b>	No	30	-1,2240	5,09647	0,93048	0,082
	Si	20	-0,3050	3,19300	0,71398	n.s
<b>Rendimiento Hematíes</b>	No	30	-0,0243	0,78807	0,14388	0,322
	Si	20	-0,0715	0,39101	0,08743	n.s
<b>Rendimiento Plaquetas</b>	No	30	-3,5747	45,86628	8,37400	0,559
	Si	20	-1,3000	84,40448	18,87341	n.s

#### 5.4.2.2 Análisis del inóculo

Los datos de la composición del inóculo para cada una de las extremidades tratadas se exponen en la tabla 18 del anexo 1. En la tabla 61 se expone la media de las células implantadas en el inóculo.

**Tabla 61: media de las células implantadas en el inóculo**

	Estadísticos descriptivos				
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
<b>Inóculo: Leucos 10<sup>3</sup> / ul</b>	50	3.60	111.00	43.2546	23.01654
<b>Inóculo: Plaquetas 10<sup>3</sup> / ul</b>	50	72.00	8,800.00	677.7720	1,207.96512
<b>Inóculo: CNT (10<sup>6</sup>/ml)</b>	50	36.00	1,110.00	432.5980	230.25717
<b>Inóculo: CNT (10<sup>8</sup>)</b>	50	34.20	555.00	223.4028	108.55461
<b>Inóculo: CMN (10<sup>8</sup>)</b>	50	17.79	442.71	194.6992	88.08298
<b>Inóculo: CMN (10<sup>8</sup>/kg)</b>	50	0.21	8.27	2.6884	1.48109
<b>Inóculo: CD34 (10<sup>6</sup>)</b>	50	0.79	368.16	72.1094	72.76723
<b>Inóculo: CD34 (10<sup>6</sup>/kg)</b>	50	0.01	6.88	1.0230	1.19235

La media del volumen de sangre procesada durante las sesiones de aféresis fue de 9.778,41±876,53 ml. La media del volumen del inóculo extraído fue de 55,22±13,8ml. El tiempo medio desde el proceso de aféresis hasta el proceso de implantación quirúrgica fue de 0,6±0,4 días.

En el análisis de datos agrupados según la variable Amputación, se apreció diferencias en cuanto al porcentaje total de CD34+ del inóculo implantado (CD34 totales %: No Amputados 0,38±0,34 -vs- Amputados 0,23±0,12 p= 0,034). No se apreciaron diferencias significativas en el resto de variables analizadas dentro del inóculo implantado, si bien se identificó una tendencia a la significación en la distribución de las

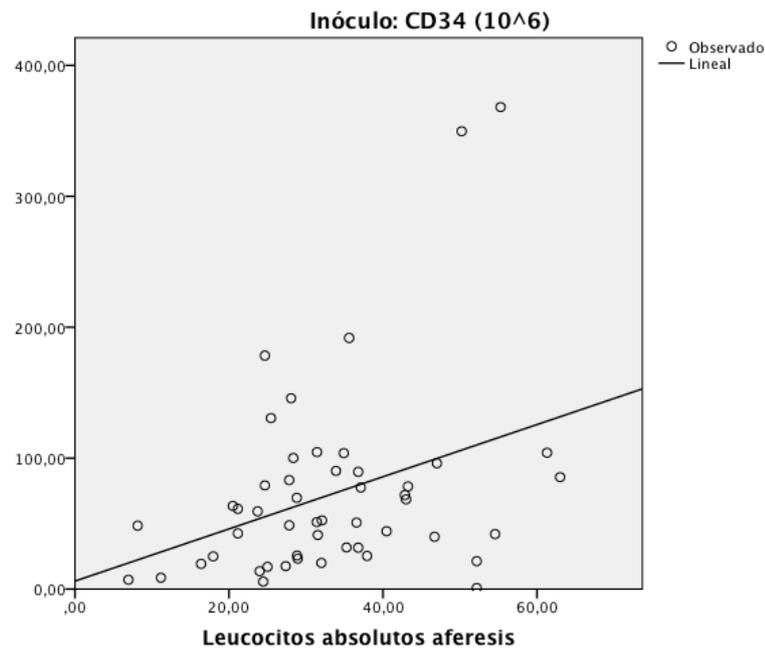
medias de CD34+ (CD34+ x 10<sup>6</sup>/ml: No Amputados 87,94±84,64 -vs- Amputados 54,78±39,05 p=0,069). Al aplicar test no paramétricos (Kolmogorov-Smirnov) , este resultado adquiriría significación estadística (p=0,043) (Tabla 62)

**Tabla 62: Test de Kolmogorov-Smirnov. Estratificación según variable amputación.**

Estadísticos de grupo						
	Amputación	N	Media	Desviación típ.	Error típico	p
<b>Inóculo: Leucos 10<sup>3</sup> / ul</b>	No	30	46.1280	26.03532	4.75338	0,723
	Si	20	38.9445	17.29277	3.86678	
<b>Inóculo: Plaquetas 10<sup>3</sup> / ul</b>	No	30	789.7667	1,538.14830	280.82617	0,723
	Si	20	509.7800	320.19662	71.59814	
<b>Inóculo: CNT (10<sup>6</sup>/ml)</b>	No	30	461.3667	260.48040	47.55700	0,723
	Si	20	389.4450	172.92774	38.66782	
<b>Inóculo: CNT (10<sup>8</sup>)</b>	No	30	234.2080	126.39150	23.07582	0,723
	Si	20	207.1950	74.47893	16.65399	
<b>Inóculo: CMN (10<sup>8</sup>)</b>	No	30	200.5860	100.12094	18.27950	0,950
	Si	20	185.8690	67.61774	15.11979	
<b>Inóculo: CMN (10<sup>8</sup>/kg)</b>	No	30	2.7970	1.69926	0.31024	0,361
	Si	20	2.5255	1.09702	0.24530	
<b>Inóculo: CD34 (10<sup>6</sup>)</b>	No	30	87.9407	84.64264	15.45356	0,043
	Si	20	54.7890	39.05486	8.73293	
<b>Inóculo: CD34 (10<sup>6</sup>/kg)</b>	No	30	1.2033	1.40346	0.25624	0,230
	Si	20	0.7525	0.72919	0.16305	
<b>Inóculo: CD (10<sup>7</sup>)</b>	No	28	886.4600	591.41326	111.76660	0,977
	Si	15	737.1573	447.37347	115.51133	
<b>Inóculo: CD3 (10<sup>7</sup>/kg)</b>	No	28	12.4893	9.92821	1.87625	0,997
	Si	15	10.6973	7.29649	1.88395	

Se comprobó una relación lineal entre el rendimiento en sangre periférica de leucocitos, neutrófilos y monocitos, y la composición de CD34+ del inóculo. No se identificó una correlación positiva entre el rendimiento de plaquetas en sangre periférica y la composición del CD34+ del inóculo.

**Figura 46 A: correlación lineal Leucocitos - CD 34+**



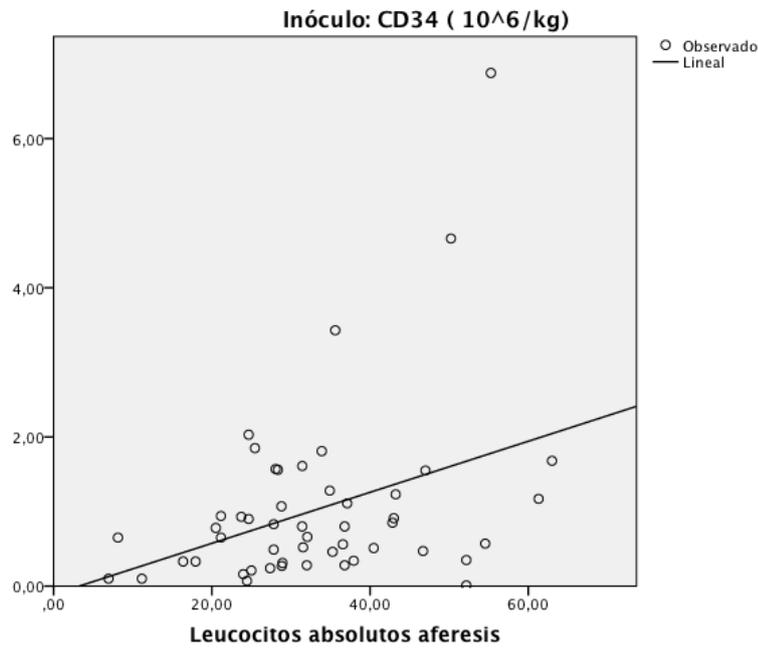
Resumen del modelo			
R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típico de la estimación
0,349	0,122	0,103	68,910

La variable independiente es Leucocitos absolutos aferesis.

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	31525,094	1	31525,094	6,639	0,013
Residual	227933,325	48	4748,611		
Total	259458,419	49			

La variable independiente es Leucocitos absolutos aferesis.

**Figura 46 B: correlación lineal Leucocitos - CD 34+/Kg**



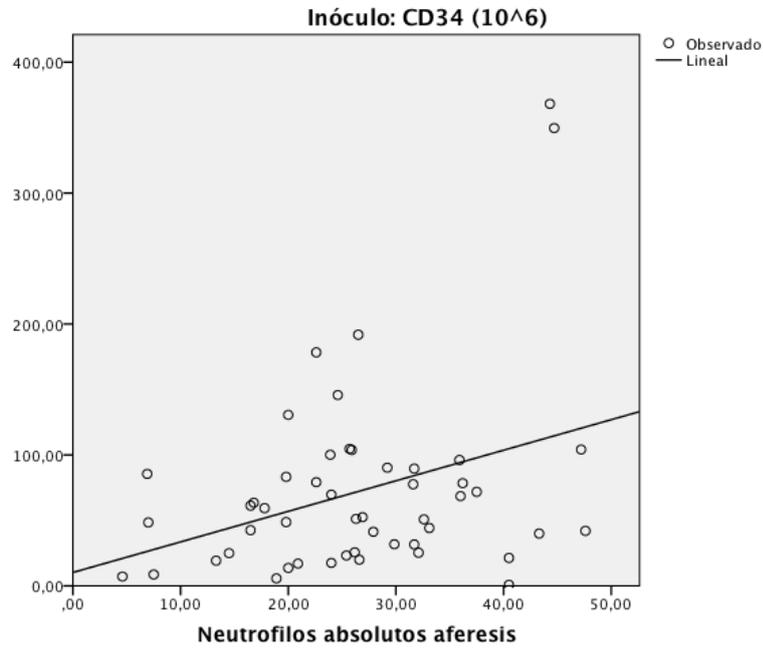
Resumen del modelo			
R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típico de la estimación
0,365	0,133	0,115	1,121

La variable independiente es Leucocitos absolutos aferesis.

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	9,294	1	9,294	7,390	0,009
Residual	60,369	48	1,258		
Total	69,663	49			

La variable independiente es Leucocitos absolutos aferesis.

**Figura 47 A: correlación lineal neutrófilos - CD34+**



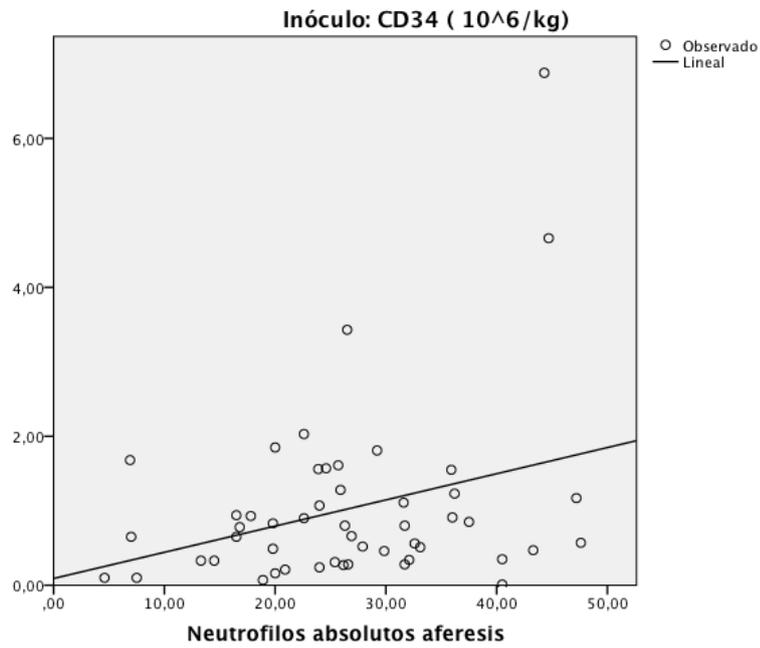
Resumen del modelo			
R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típico de la estimación
0,337	0,114	0,095	69,215

La variable independiente es Neutrófilos absolutos aferesis.

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	29504,806	1	29504,806	6,159	0,017
Residual	229953,613	48	4790,700		
Total	259458,419	49			

La variable independiente es Neutrófilos absolutos aferesis.

**Figura 47 B: correlación lineal neutrófilos - CD34+/kg**

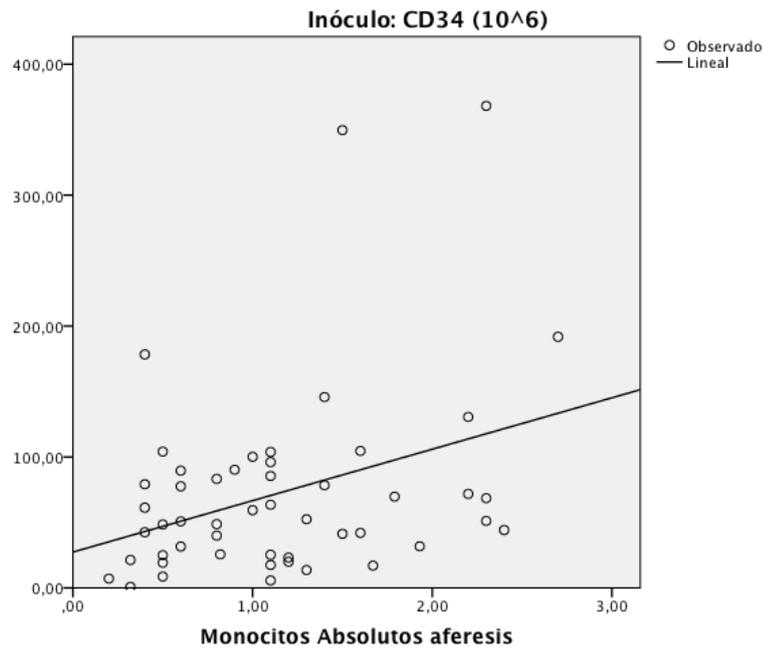


Resumen del modelo			
R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típico de la estimación
0,310	0,096	0,077	1,145

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	6,693	1	6,693	5,102	0,028
Residual	62,971	48	1,312		
Total	69,663	49			

La variable independiente es Neutrófilos absolutos aferesis.

**Figura 48 A: correlación lineal monocitos - CD34+**

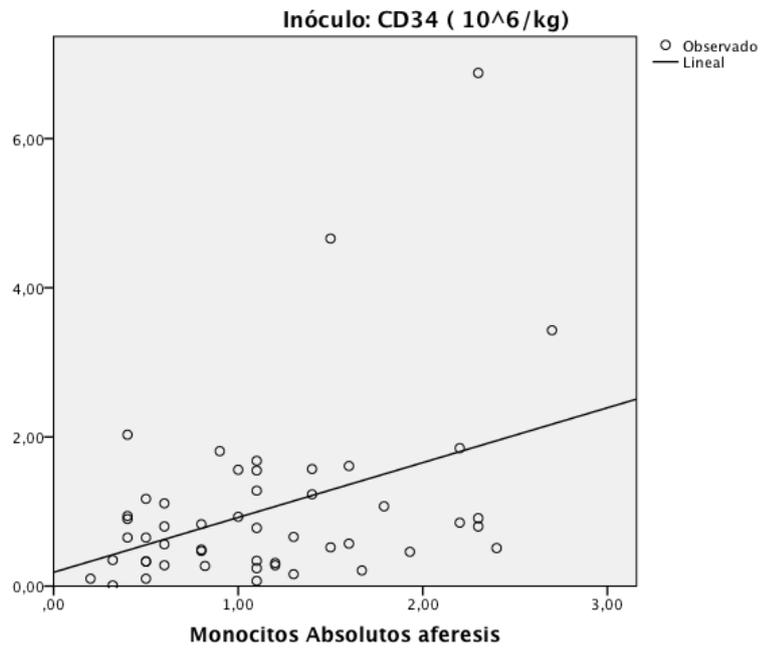


Resumen del modelo			
R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típico de la estimación
0,351	0,123	0,105	68,847

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	31939,992	1	31939,992	6,738	0,012
Residual	227518,426	48	4739,967		
Total	259458,419	49			

La variable independiente es Monocitos Absolutos aféresis.

**Figura 48 B: correlación lineal monocitos - CD34+/Kg**



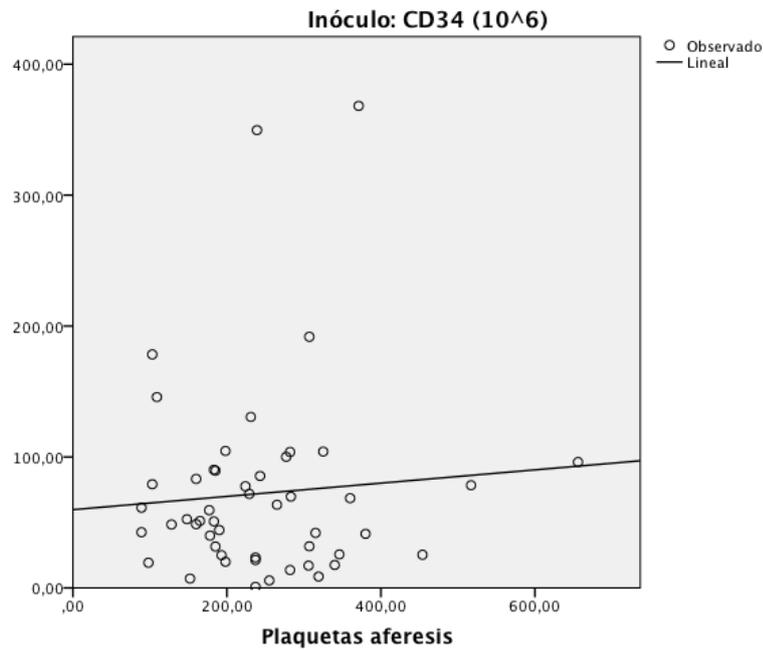
Resumen del modelo			
R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típico de la estimación
0,401	0,161	0,143	1,104

La variable independiente es Monocitos Absolutos aféresis.

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	11,188	1	11,188	9,183	0,004
Residual	58,476	48	1,218		
Total	69,663	49			

La variable independiente es Monocitos Absolutos aféresis.

**Figura 49: correlación lineal plaquetas / CD34+**



Resumen del modelo			
R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típico de la estimación
0,077	0,006	-0,015	73,301

La variable independiente es Plaquetas aféresis.

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	1551,805	1	1551,805	0,289	0,593
Residual	257906,613	48	5373,054		
Total	259458,419	49			

La variable independiente es Plaquetas aféresis.

#### 5.4.2.3 Tasa de Salvamento de extremidad: análisis por composición del

##### inóculo.

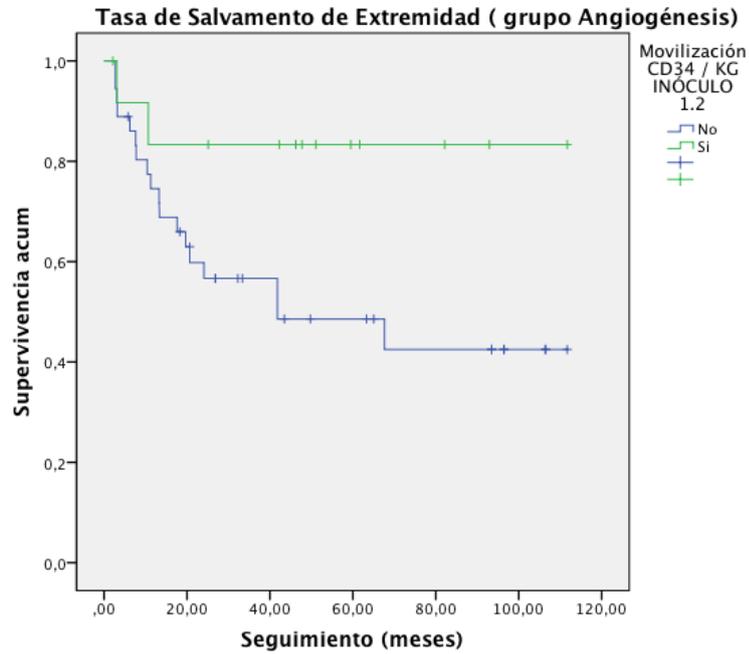
Se intentó identificar dinteles de celularidad dentro del inóculo que permitiesen pronosticar una mejor evolución de las extremidades tratadas. Aquellos pacientes con un inóculo superior a  $1,2 \times 10^6$  CD34/kg presentaron menor proporción de amputación respecto a aquellos pacientes con inóculos más pobres (Amputados  $CD34 \geq 1,2 \times 10^6$ /kg: 15,38% -vs- Amputados  $CD34 < 1,2 \times 10^6$ /kg: 48,64% RR 0,192 IC95% 0,037-0,988  $p=0,05$ ).

Se intentó identificar parámetros de celularidad similares en la población leucocitaria y plaquetar, sin identificar resultados significativos.

En el análisis de Kaplan-Meier (figura 50) se apreció una mayor tasa de salvamento de extremidad en aquellos pacientes con inóculos de CD34+ superiores a  $1,2 \times 10^6$ /kg. La tasa de salvamento de extremidad entre aquellos pacientes con movilizaciones de CD34+ superiores a  $1,2$ /kg, fue del 83,3% a los 12 meses del tratamiento, frente al 74,6% de aquellas extremidades tratadas con inóculos más pobres (media de tiempo en meses:  $CD34/kg > 1,2$   $94,22 \pm 11,28$  -vs-  $CD34/kg < 1,2$   $59,78 \pm 8,43$   $p=0,058$ ). Esta tasa se mantuvo durante todo el seguimiento: tasa de salvamento al final del seguimiento (110 meses) :  $CD34+/kg > 1,2$  83% -vs-  $CD34+/kg < 1,2$  42%  $p=0,058$ .

La tabla de eventos se expone en el anexo 1 (tabla 19).

**Figura 50: tasa de salvamento de extremidad agrupada por CD34+ > 6 < 1,2x10^6/kg**



Medias y medianas del tiempo de supervivencia								
Movilización CD34 / KG INÓCULO 1.2	Media <sup>a</sup>				Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
No	59,785	8,432	43,259	76,311	41,800	27,650	0,000	95,994
Si	94,228	11,287	72,105	116,351	.	.	.	.
Global	68,742	7,264	54,505	82,980	.	.	.	.

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	3,604	1	0,058
El vector de ponderaciones de tendencia es -1, 1. Éste es el valor por defecto.			



## **DISCUSIÓN**



## 6. DISCUSIÓN

La enfermedad arterial oclusiva de los miembros inferiores, o enfermedad arterial periférica (EAP), constituye una de las patologías con mayor incidencia en la calidad de vida de la población actual. Con el aumento de la esperanza de vida, la prevalencia de la enfermedad ha aumentado y con ello las consecuencias derivadas de la misma. La EAP se puede clasificar en distintos estadios (Estadios de Fontaine y Clasificación de Rutherford) según su severidad, que van desde la existencia de enfermedad asintomática (sin claudicación intermitente), hasta la presencia de lesiones tróficas (gangrena) con o sin dolor de reposo. La Isquemia Crítica de Miembros Inferiores (ICMI) constituye el estadio más avanzado de la EAP con grave riesgo de pérdida de extremidad y en el que la cirugía de revascularización no debe ser demorada. El objetivo fundamental del tratamiento de la ICMI es evitar la pérdida de la extremidad y conseguir el alivio de los síntomas [18, 62]. Con la instauración de los procedimientos de revascularización percutáneos (angioplastia), la aparición de las nuevas derivaciones protésicas y el uso de homoinjertos vasculares, se dispone de una mayor cantidad de recursos técnicos para realizar la revascularización de estos pacientes.

Sin embargo, hasta un 30% de los pacientes con isquemia crítica que no se pueden beneficiar de estas técnicas [232], bien porque no existen lechos arteriales distales aptos para revascularizar o porque ya han sido agotadas todas las opciones quirúrgicas revascularizadoras. En estos pacientes es preciso un tratamiento médico basado en el control del dolor y de las lesiones tróficas, unido a la farmacoterapia que intente aumentar la perfusión de la extremidad. En estos pacientes sin posibilidades de cirugía de revascularización, la tasa anual de amputación mayor en el primer año puede ser de hasta el 50% [8, 233].

De acuerdo con los resultados demostrados en este trabajo, el tratamiento mediante trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos, aplicados por vía intramuscular, constituye un tratamiento eficaz en aquellos pacientes con diagnóstico de ICMI, que no presenten posibilidades de revascularización, obteniendo tasas de salvamento de extremidad del 58% tras 60 meses de seguimiento.

La investigación en el campo del desarrollo de nuevos vasos que atenuen las secuelas clínicas de la ICMI no es nueva, y se ha venido realizando desde el conocimiento de los procesos de neoangiogénesis tumoral a principios de los años 70 [22]. La respuesta fisiológica al estímulo isquémico supone la movilización de múltiples familias celulares, (entre las que se incluyen células progenitoras), y la liberación de múltiples factores reguladores de la angiogénesis, en un proceso complejo y altamente regulado [160, 195, 227, 230]. Los resultados obtenidos con el uso aislado de factores angiogénicos, bien como proteínas recombinantes o mediante terapia génica, han hecho que las investigaciones iniciadas en la década de los años 90 con células pluripotenciales hayan captado el interés de la mayoría de los grupos de investigación [232-241].

El concepto de la médula ósea como reserva general de células madre ha hecho que sea muy frecuentemente utilizada en las distintas investigaciones (tabla 63). Las células mononucleadas constituyen una reserva celular con capacidad para modular su fenotipo de acuerdo a las condiciones locales y necesidades fisiológicas, y son consideradas como precursores hematopoyéticos con capacidad de diferenciación endotelial [147-155, 232]. Dentro de este grupo celular, las que presentan capacidad progenitora endotelial se identifican inmunofenotípicamente por su marcador de superficie CD34+.

Las células CD34+ presentan capacidad angioblástica y sintetizan eNOS (óxido nítrico sintetasa endotelial), lo que determina su capacidad de producir óxido nítrico en respuesta a acetilcolina y VEGF de manera dosis-dependiente [147-155]. De manera fisiológica, existen células progenitoras endoteliales (CPE) circulantes, en una proporción inferior al 1% [230] de las células mononucleadas circulantes. En respuesta a determinados estímulos (entre los que se incluye la terapia hormonal con G-CSF) se produce un aumento de los niveles circulantes de estas células, debido a: 1) un incremento de la movilización celular de las CPE desde la médula ósea a sangre periférica y, 2) un incremento de la diferenciación de las células CD34+ hacia células de estirpe endotelial. Todo esto determina su reclutamiento en el tejido isquémico, contribuyendo a la formación de una red capilar funcionante. Este proceso se ve regulado no solo por las CPE movilizadas y reclutadas dentro del tejido isquémico, sino también por células estromales, linfocitos, neutrófilos y otras células del sistema monocito-macrófago encargadas de regular todo este proceso mediante la degradación de la matriz extracelular y la liberación de citocinas proangiogénicas y antiangiogénicas, en un proceso de alta complejidad y extremadamente regulado. El correcto proceso de regulación determina una red capilar normofuncionante en situaciones fisiológicas de reparación tisular, como pueden ser cicatrización de heridas y otros procesos inflamatorios. Sin embargo, la pérdida de la regulación determinará la aparición de neovascularización no deseada, como puede ocurrir en los procesos oncológicos.

**Tabla 63 : Estudios de terapia celular en isquemia crítica. Tomado de : Furmston J et al. J Cardiovasc Surg 2014; 55 (5): 641-654. [ref. 136]**

Author, Year	Type of study	Treatment	Patient characteristics	Follow-up (months)	Outcomes
Dong, 2013 <sup>14</sup>	Patient series	CD34 <sup>+</sup> cells	25 CLI patients	18 +/- 7	Pain free walking time , ABPI , TcPO <sub>2</sub> ,
Gupta, 2013 <sup>15</sup>	Double-blind RCT	BM-MSCs	20 CLI patients (10 in treatment arm, 10 received placebo)	24	ABPI , rest pain , amputation
Dubsky, 2013, <sup>16</sup>	Patient series	BM and PB-MNCs	28 diabetic patients with CLI (17 treated with BM-MNCs and 11 with PB-MNCs)	6	TcPO <sub>2</sub> , amputation
Losordo, 2012 <sup>17</sup>	Double-blind RCT	CD34 <sup>+</sup> cells	28 CLI patients (7 low dose cells, 9 high dose cells and 12 placebo)	12	Amputation
Ozturk, 2012 <sup>18</sup>	Randomised, controlled	PB-MNCs	40 diabetic patients with CLI (20 in treatment, 20 received placebo)	12	Fontaine grade , ABPI , TcPO <sub>2</sub> , 6-min walking distance , Pain , ulcer healing
Klepanec, 2012 <sup>19</sup>	Randomised, non-controlled	BM-MNCs	41 CLI patients (21 intramuscular vs 20 intra-arterial delivery)	6	Pain , QoL , TcPO <sub>2</sub> ,
Schiavetta, 2012 <sup>20</sup>	Patient series	BM aspirate	60 CLI or short distance claudication	12	Laser Doppler blood flow , TcPO <sub>2</sub> ,
Walter , 2011 <sup>21</sup> (PROVASA)	Randomised, double-blind placebo controlled	BM-MNCs	40 CLI patients (19 in treatment arm, 21 received placebo)	6	ABPI , Ulcer healing , Limb salvage , Rest pain
Ruiz-Salmeron, 2011 <sup>22</sup>	Patient series	BM-MNCs	20 diabetic patients with CLI	12	Collateral formation , ABPI ,
Murphy, 2011 <sup>23</sup>	Patient series	BM-MNCs	29 CLI patients	12	Toe pressure , toe-brachial index , ABPI , rest pain , QoL
Powell, 2012 <sup>24</sup> (RESTORE-CLI)	Randomised, placebo controlled	BM- MSCs and macrophages ('Ixmyelocel-T')	77 patients (48 in treatment arm, 24 placebo)	12	Amputation-free survival , ulcer healing
Gabr, 2011 <sup>25</sup>	Patient series	BM-MNCs	20 CLI patients	3	ABPI , walking distance
Benoit, 2011 <sup>26</sup>	Double-blind RCT	BM-MNCs	48 CLI (34 in treatment arm, 14 received placebo)	6	Amputation-free survival
Lu, 2011 <sup>27</sup>	Placebo controlled	BM-MSCs or BM-MNCs	41 diabetic patients with bilateral CLI patients with (received BM-MNCs, BM-MSCs or placebo)	24	Pain free walking , ABPI , TcPO <sub>2</sub> , Rest pain , amputation in BM-MSCs vs BM-MNCs
Idei, 2011 <sup>28</sup>	Non-randomised, case controlled series	BM-MNCs	97 CLI (26 patients with Buerger's Disease in treatment arm, 46 placebo)	48	Amputation-free survival , ABPI , TcPO <sub>2</sub>
Iafrafi, 2011 <sup>29</sup>	Double-blind RCT	BM aspirate	48 CLI (34 in treatment arm, 14 received placebo)	12	Amputation , pain , ABPI
Lara-Hernandez, 2010 <sup>30</sup>	Patient series	GCSF mobilised CD34/CD133 <sup>+</sup> cells	28 CLI patients	14	ABPI , Pain ,

**Tabla 63 ( continuación)**

Prochazka, 2010 <sup>31</sup>	Randomised controlled	BM stem cell concentrate	96 CLI patients (42 in treatment arm, 54 received standard medical care)	4	Amputation , ABPI
Amann, 2009 <sup>32</sup>	Patient series	BM-MNCs	51 CLI patients	6	ABPI , TcPO <sub>2</sub>
Motukuru, 2008 <sup>33</sup>	Patient series	BM-MNCs	36 (Buerger's disease, severity of ischaemia not specified)	6	ABPI , TcPO <sub>2</sub> , Ulcer healing
Van Tongeren, 2008 <sup>34</sup>	Patient series	BM-MNCs	27 (IC or CLI)	12	ABPI , Pain score , Pain free walking
Motukuru, 2008 <sup>33</sup>	Patient series	BM-MNCs	36 (CLI)	6	ABPI , TcPO <sub>2</sub> , ulcer healing
Gu, 2008 <sup>35</sup>	Patient series	BM-MNCs	32 (severity of ischaemia not specified). 16 intramuscular and 16 intra-arterial injections	12	ABPI , TcPO <sub>2</sub> , Rest pain , collaterals , limb salvage
Chochola, 2008 <sup>36</sup>	Patient series	BM-MNCs	24 CLI patients	12	Fontaine grade , collaterals , QoL
Huang, 2007 <sup>37</sup>	Randomised, non-controlled	PB-MNCs	150 (AO, severity of ischaemia not specified)	3	ABPI , TcPO <sub>2</sub> , Rest pain , Pain free walking
Huang, 2007 <sup>37</sup>	Randomised, non-controlled	BM-MNCs	150 (AO, severity of ischaemia not specified)	3	ABPI , TcPO <sub>2</sub> , Rest pain , Pain free walking
Durdu 2006 <sup>38</sup>	Patient series	BM-MNCs	28 (rest pain +/- ulcers)	17 +/- 8	ABPI , Rest pain , QoL , collaterals
Kawamura, 2006 <sup>39</sup>	Patient series	PB-MNCs	92 (75 CLI, 11 IC, 6 asymptomatic)	9	Limb salvage for Fontaine I-III
Tateno, 2006 <sup>40</sup>	Patient series	PB-MNCs	29 (Fontaine III/IV)	12	ABPI , Pain , Pain free walking , Ulcer healing
Huang, 2005 <sup>41</sup>	RCT	PB-MNCs	28 (CLI, various cases)	3	ABPI , Pain , Laser Doppler perfusion , Ulcer healing , Pain free walking
Kawamura, 2005 <sup>42</sup>	Patient series	PB-MNCs	30 (CLI, various cases)	6 +/- 5	Limb salvage
Yang, 2005 <sup>43</sup>	Patient series	PB-MNCs	62 (various severities of ischaemia)	6	ABPI , TcPO <sub>2</sub> , Rest pain , Pain free walking
Tateishi-Yuyama, 2002 (TACT Investigators) <sup>44</sup>	Pilot Study Double-blind RCT	BM-MNCs	25 vs 24 controls 21 (bilateral ischaemia) – Chronic limb ischaemia +/- rest pain/ulcers & ABPI <0.6	6 6	ABPI , TcPO <sub>2</sub> , Rest pain , Pain free walking
Tateisha-Yuyama, 2002 <sup>44</sup>	Controlled trial	PB-MNCs	21 (bilateral ischaemia) – Chronic limb ischaemia +/- rest pain/ulcers & ABPI <0.6	6	ABPI , TcPO <sub>2</sub> , Rest pain , Pain free walking

Desde la publicación en 2002 del estudio de Tateishi-Yuyama y colaboradores [114] han sido numerosos los trabajos donde se ha utilizado la terapia con progenitores hematopoyéticos como método para incrementar la perfusión de las extremidades con EAP. Este trabajo ha sido referenciado en múltiples publicaciones y podría ser considerado la base de los posteriores estudios de terapia celular en isquemia crítica de miembros inferiores. En nuestro caso, nos basamos en la metodología de este estudio para desarrollar nuestro trabajo, con dos objetivos: *aplicabilidad* a la actividad asistencial diaria y *seguridad* para el paciente, evitando procedimientos invasivos innecesarios. Con estas dos premisas, y en colaboración con el servicio de Hematología y Hemoterapia, decidimos la movilización celular y la utilización de sangre periférica, como fuente para la obtención de células hematopoyéticas y endoteliales, evitando así la necesidad de la anestesia general para la realización del aspirado medular.

En 2010, Fadini y colaboradores [232] publicaron un metaanálisis realizado sobre 40 artículos, en donde se trataron a más de 700 pacientes con EAP no tributarios de tratamiento revascularizador por causa de enfermedad difusa o afectación múltiple. La forma de obtener el inóculo celular fue mediante aspirado medular o tras movilización celular con G-CSF y posterior aféresis. Las vías de administración utilizadas fueron intramuscular, intrarterial (vía femoral) o combinada. El número medio de células mononucleadas implantadas fue de  $3,56 \pm 2,81 \times 10^9$ , mientras que la media de células CD34+ trasplantadas fue de  $5 \pm 1,48 \times 10^7$ . Para conseguir la movilización de las células CD34+, el protocolo más utilizado fue el de  $5 \mu\text{g}$  de G-CSF por Kg de peso del paciente y día, durante un periodo de 4 ó 5 días. Los tratamientos concomitantes utilizados en los distintos estudios fueron el tratamiento médico óptimo máximo (control de factores de riesgo vascular clásicos, antiagregación, hemorreológicos y

estatinas) de acuerdo con las guías de consenso establecidas, y el desbridamiento mecánico de las heridas. El seguimiento medio fue de 6 meses.

Los resultados publicados por este metaanálisis demostraron:

1. Mejoría del ITB en todos los estudios con terapia celular: (media ITB  $0,46 \pm 0,004$  basal -vs-  $0,63 \pm 0,04$  postratamiento ;  $p = 0,011$ )

2. Mejoría de la TcO<sub>2</sub>: (media TcO<sub>2</sub> mmHg:  $22,8 \pm 2,8$  basal -vs-  $35,8 \pm 2,9$  postratamiento ;  $p=0,002$ )

3. Aumento de la distancia de claudicación: (media en metros:  $75,7 \pm 19,4$  basal -vs-  $402 \pm 70,9$  postratamiento;  $p < 0,0001$ )

4. Disminución del dolor, objetivado por escala EVA (0-10): (media EVA:  $6,35 \pm 0,43$  basal -vs-  $2,11 \pm 0,37$  postratamiento;  $p < 0,001$ ).

No se detallaron los resultados de las tasas de amputación pero se apreció mejoría en la incidencia de cicatrización de las heridas en comparación con placebo (OR 3,54 IC95% 1,09-11,51  $p = 0,032$ ). Se compararon los resultados obtenidos con el uso de células aspiradas y movilizadas, apreciando mayores beneficios en términos de ITB y reducción de escala EVA con el tratamiento de células movilizadas ( $p=0,006$ ). Por otro lado, el uso de células aspiradas se relacionó con una mayor cicatrización de las heridas ( $p=0,038$ ). En el análisis entre aplicación intrarterial (vía femoral) o intramuscular, se apreció mayor mejoría en el ITB y TcO<sub>2</sub>, así como en la cicatrización de las heridas, en los pacientes con implantación intramuscular, en comparación con la aplicación intrarterial ( $p=0,029$ ). En términos de seguridad, de los 726 pacientes tratados, se produjeron 21 muertes, con una mortalidad atribuible del 2,76%.

Otros metaanálisis han sido publicados con posterioridad [133,134 136, 233] y todos ellos con resultados comparables.

El metanálisis publicado por Wang y colaboradores [233] en julio de 2014, se realizó sobre más de 1200 pacientes con diagnóstico de ICMI sometidos a tratamiento con progenitores hematopoyéticos (células mononucleadas). Las vías de administración fueron intramuscular e intrarterial. El rango de las dosis utilizadas varió entre  $10^6$  y  $10^9$ . El objetivo del estudio fue demostrar la eficacia del tratamiento basado en la tasa de salvamento de extremidad. En el metaanálisis también se analizaron los cambios en el ITB, TcO<sub>2</sub> y escala visual analógica del dolor (EVA 0-10). Se analizaron más de 31 artículos, con un rango de seguimiento que osciló entre 2 y 24 meses, objetivando mejoría del ITB y TcO<sub>2</sub> en todos los pacientes tratados. En el análisis de la escala EVA se objetivó una reducción de más de 3 puntos al final del seguimiento ( $p=0,001$ ). Se objetivó mayores tasas de salvamento de extremidad entre los pacientes sometidos a terapia celular en comparación con los grupos control (OR 8,05% IC95% 3,58-18,08  $p<0,00001$ ).

Con el diseño prospectivo de nuestro estudio, nuestro objetivo principal fue demostrar la mejoría en el salvamento de extremidad de los pacientes tratados con este protocolo, intentando identificar la dosis celular y la composición del inóculo adecuada para conseguir este objetivo. Nuestros resultados preliminares, publicados en 2010 [230] sobre un total de 28 pacientes y con un seguimiento medio de 14 meses, ya mostraron unos resultados satisfactorios en términos de salvamento de extremidad y mejoría del control del dolor. Asimismo demostramos que esta terapia presentaba mejores resultados que el tratamiento clásico de soporte, con una técnica de movilización e implantación sin complicaciones ni efectos secundarios en la población tratada. Nuestros resultados preliminares han sido referenciados en algunos otros textos, incluidos metaanálisis. A pesar de los datos aportados, y sin críticas respecto a la metodología empleada, si que se han interpretado con cautela los resultados obtenidos,

al carecer en un primer momento de un grupo control, como ha ocurrido con otros muchos trabajos publicados con anterioridad o posteriormente al nuestro. Esto hizo que nos planteásemos obtener una mayor población de pacientes tratados y con una población control, con el fin de poder dar mayor rigurosidad a nuestros resultados.

Un aspecto muy interesante respecto a la efectividad y seguridad de la terapia con células mononucleadas para la creación de nuevos vasos (angiogénesis) es la vía de administración (intrarterial o intramuscular), y la forma de obtención del inóculo celular (aspirado directo o células movilizadas).

Respecto a la vía de administración, la implantación intramuscular presenta una serie de beneficios teóricos respecto de la administración intrarterial. La administración intramuscular permite la colocación de depósitos celulares dentro del tejido isquémico, lo que permitiría aportar la actividad paracrina de las células progenitoras, así como un cierto grado de incorporación directa en la neovascularización en fase de formación [136, 242]. En el lado opuesto, la administración intrarterial sólo permitiría el depósito de las células progenitoras en las zonas circundantes al tejido isquémico [243]. Por otro lado, con las técnicas de imagen tipo SPECT, PET-TAC y RMN-perfusión, se ha comprobado que la mayor parte de las células administradas por vía intrarterial acaban secuestradas en el tejido esplénico y hepático, lo que podría suponer una disminución de sus efectos terapéuticos [113, 136, 242, 243]. Con el fin de determinar la eficacia de la aplicación intrarterial como vía de administración de la terapia celular, se diseñó el estudio PROVASA [244]. En este estudio multicéntrico, 40 pacientes fueron aleatorizados en régimen 1:1 con el fin de evaluar los resultados de la administración de progenitores hematopoyéticos (células mononucleadas de médula ósea) en comparación

con placebo en pacientes con ICMI. La hipótesis del estudio fue demostrar que la administración intrarterial de células mononucleadas se asociaba al incremento de la perfusión de la extremidad objetivada por un incremento del ITB, reduciendo el dolor isquémico y mejorando la cicatrización de las heridas. Tras la obtención del aspirado medular, se realizaba la infusión del inóculo en arteria femoral superficial o en arteria femoral profunda, en función de la topografía de las lesiones arteriográficas. Los resultados ofrecidos no demostraron diferencias en el ITB entre el grupo de tratamiento y el grupo placebo, y no se objetivaron diferencias en la evolución de la enfermedad en términos de mortalidad ni salvamento de extremidad. Durante el momento de la redacción del presente texto, han sido publicados los resultados finales del estudio JUVENTAS [374]. En este estudio aleatorizado, doble-ciego, y con control con placebo, se incluyeron 160 pacientes con diagnóstico de isquemia crítica de miembros inferiores no revascularizable, a los que se les sometió a 3 inyecciones intrarteriales separadas por intervalos de 3 semanas, de células mononucleadas de médula ósea o placebo. El objetivo primario del estudio fue determinar si la administración repetida de células mononucleadas por vía intrarterial, podía evitar la amputación mayor de la extremidad a los 6 meses del tratamiento. Se apreció mayor tasa de amputación entre los pacientes sometidos a tratamiento celular (19% frente a 13% en pacientes sometidos a placebo ) sin que estas diferencias tuvieran significación estadística. La conclusión final de este estudio ha sido que la administración intrarterial repetida no aporta beneficios en términos de salvamento de extremidad, sin embargo, y en base a las publicaciones existentes, los autores no descartan el efecto beneficioso de la terapia celular en pacientes con isquemia crítica, asumiendo que al no estar adecuadamente definidas las poblaciones celulares a infundir y las vías de administración, serán necesarios más

estudios para poder evaluar el efecto terapéutico en pacientes con enfermedad arterial avanzada.

De acuerdo con todo lo anteriormente expuesto y en base a la bibliografía publicada [232, 243, 245] podríamos considerar que la implantación intramuscular de progenitores hematopoyéticos constituye la primera opción como vía de administración de la terapia celular en pacientes con ICMI.

En el diseño de nuestro estudio hemos contemplado la vía intramuscular exclusivamente por los motivos fisiopatológicos descritos. Los resultados obtenidos en nuestro proyecto con la implantación intramuscular son satisfactorios, y se vería apoyado por los resultados publicados en otros metanálisis. No podemos afirmar categóricamente que la aplicación intramuscular es el método de implantación de elección al no haber comparado dos grupos (aplicación intramuscular y aplicación intrarterial). Sin embargo, creemos que a pesar de que la aplicación intrarterial, conceptualmente, supondría llegar a una mayor extensión de territorio isquémico, la posibilidad de secuestro celular por parte de otros órganos, como ha sido apuntado anteriormente, supondría una limitación de la eficacia de la terapia. Esto podría explicar los resultados del estudio JUVENTAS, en el que a pesar de haber realizado inyecciones repetidas, no se ha conseguido mejorar la tasa de amputación. En el lado opuesto, la aplicación intramuscular repetida propuesta por Tateishi-Yuyama [114], sí que mejoró los resultados, lo que nos lleva a pensar que la aplicación intramuscular no se ve afectada por el secuestro sistémico. Por lo tanto, de acuerdo con los resultados de esta tesis doctoral y la bibliografía disponible, mientras no se realice un estudio comparativo entre las dos vías de administración con una adecuada potencia estadística, deberíamos considerar que la aplicación intramuscular de progenitores hematopoyéticos constituye la vía de administración de elección.

Respecto al impacto que las diferencias cualitativas y cuantitativas del inóculo celular tiene en los resultados de estos pacientes, cabe señalar que en el estudio publicado en 2002 por Tateishi-Yuyama y colaboradores [114], se analizó la eficacia del trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (implantados por vía intramuscular). Si bien no se realizó el diseño del estudio con el fin de evaluar las diferencias entre inóculos, en su análisis se comparó los resultados del inóculo obtenido directamente por aspirado, con los del inóculo obtenido de sangre periférica mediante movilización celular y posterior aféresis. Se analizaron los resultados sobre 20 pacientes. Si bien se obtuvieron buenos resultados con ambos inóculos, la mejoría fue mayor en las extremidades tratadas con inóculo de aspirado medular, en base a los resultados del ITB (0,09 puntos de diferencia a favor del aspirado medular, IC95% 0,06-0,11 ;  $p < 0,0001$ ), Tc02 ( 13 unidades de diferencia a favor del aspirado medular [9-17]  $p < 0,0001$ ) y escala del dolor (0,85 puntos menos en EVA a favor del aspirado [1,6-0,12]  $p < 0,0001$ ).

En el año 2007, Huang y colaboradores [246] realizaron un estudio aleatorizado, en el que se comparó el uso de células mononucleadas obtenidas por aspirado medular con las obtenidas por aféresis de sangre periférica tras movilización celular, con el fin de determinar cual era el inóculo más óptimo. Fueron incluidos 150 pacientes con diagnóstico de isquemia crónica de miembros inferiores: 74 pacientes fueron sometidos a tratamiento con células mononucleadas obtenidas de aspirado medular y 76 pacientes lo fueron con células mononucleadas obtenidas de sangre periférica tras movilización celular y posterior aféresis. Los pacientes fueron seguidos durante 3 meses. El objetivo primario fue determinar la seguridad y eficacia de ambos tratamientos, basándose en el ITB y el dolor en reposo. A pesar de observarse mejoría clínica en ambos grupos, el estudio comparativo demostró una mayor mejoría en los pacientes tratados con células obtenidas de sangre periférica, evaluado por la mejoría en el ITB ( diferencia  $0,06 \pm 0,01$

$p < 0,0001$  ) y EVA para dolor en reposo ( diferencia  $0,57 \pm 0,15$   $p < 0,0001$ ). La conclusión final a la que llegaron los autores del estudio fue que, si bien ambas formas de obtención del inóculo mejoraba la sintomatología isquémica, el tratamiento mediante células obtenidas de sangre periférica era más práctico.

Por otra parte, Fadini y colaboradores [232], en el meta-análisis publicado en el año 2010 objetivó una mejoría mayor, en términos cuantitativos, en el ITB ( $p=0,006$ ) y EVA del dolor ( $p=0,006$ ) en aquellos pacientes sometidos a tratamiento con células movilizadas de sangre periférica en comparación con los pacientes tratados con células obtenidas de aspirado medular. Estos resultados se han corroborado en posteriores publicaciones [135, 230, 247].

Las células obtenidas por aspirado de la médula ósea se extraen mediante punción en las crestas iliacas posteriores. Estas punciones se efectúan a través de orificios en la piel bajo anestesia general, ya que permite que el procedimiento sea más cómodo para el paciente. La duración aproximada de una aspiración de médula ósea es de 1 hora. En algunos casos se puede reponer parte del volumen de sangre extraído mediante una autotransfusión que se administra durante el procedimiento. Para ello, se le realiza al donante una extracción de sangre unos días antes de la aspiración de médula ósea.

El uso de concentrados celulares obtenidos tras aspirado medular para el tratamiento de la isquemia crítica de miembros inferiores ya ha sido descrito por Kolvenbach [375] y Amann [376]. En ambos casos el sistema utilizado para la obtención del concentrado celular es el sistema Smart Prep BMAC. El sistema SmartPREP2® Bone Marrow Aspirate Concentrate ( Harvest, Plymouth, MA, USA) consiste en una centrífuga automatizada controlada por microprocesador, con capacidad de decantación, que permite el procesado de la médula ósea del paciente. La centrífuga es portátil y el

procesado de la médula ósea se realiza en el mismo acto quirúrgico del aspirado medular, proporcionando un concentrado autólogo de células nucleadas para su inyección inmediata [375]. Es necesario un volumen de 120 ml de aspirado medular para obtener un concentrado de 20ml. Este concentrado es implantado por vía intramuscular en el territorio isquémico. Este método podría simplificar la obtención del inóculo celular, sin necesidad de someter al paciente a dos procedimientos anestésicos. Sin embargo, en nuestra opinión, su principal limitación radica en que no se realiza un análisis del inóculo previo a su implantación. En nuestro trabajo, el análisis cuantitativo del inóculo previo a la implantación se ha realizado en todos los casos tratados, desestimando los inóculos con celularidad inferiores a los estipulados (ver sección *Material y métodos*). En nuestro trabajo se han llegado a desestimar inóculos con pobre rendimiento celular, postponiendo la implantación hasta una segunda movilización y aféresis. En nuestra opinión creemos que es fundamental conocer la composición celular del inóculo implantado con el fin de poder asegurar la eficacia del tratamiento aplicado, evitando que se convierta en un tratamiento placebo.

En el caso de las células obtenidas de sangre periférica, es necesario movilizar estas células desde la médula ósea, porque en condiciones normales su número circulante es escaso. Los pacientes deben recibir durante cinco días una inyección diaria de G-CSF, tras lo cual son sometidos a un proceso de aféresis mediante venopunción directa o a través de catéter venoso central. La duración de una aféresis es de aproximadamente 1 a 3 horas. Es un procedimiento bien tolerado y, a diferencia del aspirado medular, se realiza de forma ambulatoria sin necesidad de anestesia general.

La obtención de células progenitoras hematopoyéticas mediante aféresis sanguínea prácticamente ha pasado a ser el procedimiento estándar frente al aspirado de médula

ósea como fuente de obtención de células para el trasplante autólogo o alogénico [248].

Las principales ventajas de utilizar sangre periférica son [249-251] :

1. Los procedimientos de aféresis se realizan sin necesidad de quirófano o anestesia
2. Ocasiona menores complicaciones para el paciente porque se evita la punción ósea
3. El coste del procedimiento es menor
4. El paciente tiene una recuperación hematológica más rápida, sin necesidad de transfusiones
5. Se obtiene mayor cantidad de células CD34

Por su facilidad de obtención y por permitir una recuperación de la función medular más rápida, los progenitores de sangre periférica son utilizados en la práctica totalidad de los trasplantes autólogos en el mundo [248, 251] y en España constituyen el 99,8% de los trasplantes autólogos de progenitores hematopoyéticos, según datos facilitados en la Memoria de Actividad 2013 de la Organización Nacional de Trasplantes ([www.ont.es](http://www.ont.es)) [252].

La movilización de los progenitores hematopoyéticos para su posterior recolección mediante aféresis sanguínea evita la invasividad del aspirado medular [253]. El G-CSF continúa siendo la citocina más ampliamente utilizada para esta función [243, 254]. Estudios en modelos animales [255, 256] han demostrado que las células CD34+ movilizadas por el G-CSF tienen mayor capacidad para formar estructuras tubulares tras su expansión in vitro, en comparación con las células obtenidas directamente de aspirado medular. Por otra parte, el uso de G-CSF proporciona entre 60 y 100 veces más

concentración de unidades formadoras de colonias que el aspirado medular [254, 257]. Todos estos datos, han llevado a sugerir que la médula ósea puede no ser una fuente óptima para la obtención de células progenitoras endoteliales [258].

Inicialmente diseñado para disminuir los efectos adversos de la neutropenia inducida por quimioterapia, el G-CSF se usó por primera vez como fármaco para conseguir la movilización de células progenitoras hematopoyéticas en 1988 [259, 260]. Tras la publicación de los resultados de los primeros estudios aleatorizados, su uso se fue extendiendo y actualmente es considerado el "patrón oro" de los tratamientos para conseguir la movilización de células progenitoras [254]. La preocupación inicial por la posibilidad de activar enfermedades malignas linfohematopoyéticas en individuos sanos genéticamente predispuestos, desapareció tras la publicación de los seguimientos a largo plazo [261]. Actualmente, se considera que el uso de G-CSF como fármaco inductor de la movilización celular en el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos, es más seguro que la realización de un aspirado medular [254, 262, 263].

Hasta el momento, se han publicado tasas del 0,6% de efectos adversos relacionados con el uso de G-CSF [254]. Entre los efectos adversos publicados destacan mialgias, artralgias, cefaleas y fiebre, y otros más graves como rotura esplénica espontánea y anemia de células falciformes [232, 254, 264]. Otros efectos adversos se han relacionado con el incremento de la densidad sanguínea producida por la hiper celularidad secundaria a la movilización celular, en forma de procesos trombóticos arteriales [200, 264, 265], por lo que se desaconseja su uso en pacientes portadores de stent coronarios de primera generación [266, 267].

En nuestra serie no se han registrado efectos adversos derivados de la técnica de movilización relacionados con el uso de G-CSF. Durante el seguimiento tampoco se han registrado causas de mortalidad que pudieran relacionarse con el uso de G-CSF, por lo

que nuestros resultados sostienen la seguridad del uso de G-CSF de acuerdo a la bibliografía publicada.

El G-CSF es producido por una amplia variedad de células, entre las que se incluyen monocitos, células endoteliales y fibroblastos [268], y su expresión está altamente regulada. En situación fisiológica, los niveles circulantes son inferiores a 30 picogramos/ml. Sin embargo en situaciones de stress biológico sus concentraciones pueden superar los 2000 pg/ml. La fórmula recombinante es la actualmente utilizada, y el protocolo de movilización celular habitualmente utilizado es de 5 a 10 microgramos/Kg/día [232]. La utilización de G-CSF en modelos de lesión isquémica ha demostrado su beneficio tanto en modelos preclínicos como clínicos, siendo utilizado no solo en modelos de isquemia de extremidades, sino también en modelos neuroisquémicos, donde ha demostrado disminución del volumen de área infartada [269-271], y en modelos de isquemia miocárdica, donde ha demostrado mejoría en la fracción de eyección secundaria al incremento de músculo miocárdico perfundido [272]. En el caso de los modelos de isquemia de miembros inferiores se planteó su uso en monoterapia, sin necesidad de aféresis y posterior implantación intramuscular. La hipótesis en la que se basaron los diferentes estudios fue que la movilización celular determinaría su adhesión a los territorios isquémicos. Los resultados con el uso aislado de G-CSF no han sido satisfactorios [243, 253, 271], lo que sugiere que los mecanismos de reclutamiento celular pueden estar alterados en aquellos pacientes con enfermedad arterial avanzada, como así ha sido referenciado por otros autores [164, 202]. En nuestro trabajo, todos los pacientes presentaban afectación arterial periférica de ambos miembros inferiores, pero sólo fueron tratadas las extremidades en situación de isquemia crítica. El uso de G-CSF no supuso mejoría clínica en las extremidades no tratadas, lo que sugiere que su uso aislado no es suficiente para conseguir el efecto

terapéutico, y justificaría la necesidad de realizar depósitos celulares en el tejido isquémico favoreciendo así el reclutamiento local, lo que apoyaría los resultados obtenidos con la vía de implantación intramuscular y explicaría los resultados contradictorios obtenidos con la vía intrarterial.

Por lo tanto, y de acuerdo con todo lo anteriormente expuesto, creemos justificada la metodología de nuestro trabajo, tanto en forma de obtener el inóculo celular, como en su forma de su administración.

Dentro de los métodos de control del inóculo, el uso de la citometría de flujo constituye el "patrón oro" para determinar el número EPC. Hasta la fecha de la redacción del presente texto, no se ha identificado un marcador específico de EPC, por lo que su identificación se basa en una combinación de 2 o 3 marcadores, entre los que se incluyen CD34, CD133, Flk-1/KDR, CXCR4 y CD105. La citometría de flujo se considera el mejor método para obtener datos cuantitativos de EPC, por su sensibilidad, especificidad y reproducibilidad [273, 274].

Respecto al diseño del tamaño muestral y el grupo control, creemos justificado el tamaño muestral calculado, de acuerdo al error  $\alpha$  y asumiendo una pérdida estimada en el seguimiento del 10% de los casos. Respecto al grupo control, hemos realizado un análisis comparativo con una cohorte retrospectiva sometida a tratamiento convencional, con el fin de determinar la eficacia del nuevo tratamiento. Esto puede llevar a establecer la discusión respecto a la conveniencia de contar con una cohorte prospectiva sometida a tratamiento placebo.

En el ámbito de la investigación, el uso de placebos queda restringido a los estudios de fármacos o procedimientos terapéuticos, con el fin de determinar su eficacia. Sin

embargo, su uso plantea en muchas ocasiones problemas éticos [275]. De acuerdo con diversos autores [275-277], el uso de grupos de control con placebo puede ser éticamente cuestionado cuando se cumplen alguna de las siguientes cláusulas:

- Existen terapias adecuadas para la enfermedad
- El uso de placebo puede infligir riesgos no aceptables.

El compromiso de cualquier estudio de salud es eliminar terapias inferiores y peligrosas, y ofrecer las terapias contrastadas más beneficiosas, tanto para pacientes actuales como para futuros [275]. De acuerdo con Beauchamp y colaboradores [277], los estudios clínicos deben cumplir las siguientes condiciones:

- Deben diseñarse para determinar diferencias entre alternativas terapéuticas con el objetivo de obtener un resultado.
- Un Comité Ético de Investigación debe aprobar el protocolo y certificar que ningún médico tiene conflicto de intereses.
- Debe tener un Consentimiento Informado
- No puede usar placebo si existen pruebas de que existe un tratamiento adecuado.

La Declaración de Helsinki [278] afirma que a todos los pacientes sometidos a estudios o ensayos clínicos, incluidos los del grupo control, se les debe asegurar el mejor método diagnóstico y terapéutico probado, lo que puede ser interpretado como que ningún paciente deben ser privado de tratamiento efectivo [279]. Si aceptamos que un placebo puede ser un tratamiento que actualmente se considera ineficaz pero que fue considerado eficaz en la época que fue usado [280, 281], podríamos aceptar desde el punto de vista metodológico, la utilización de una cohorte histórica de pacientes con el mismo diagnóstico y características demográficas comparables, como grupo de control de nuestro estudio clínico. De acuerdo con Lyons [282] el estudio aleatorizado

controlado con placebo tiene la ventaja de determinar la eficacia y seguridad absolutas, pero existen otros métodos válidos para obtener el mismo objetivo, como pueden ser la demostración de superioridad en un estudio con control activo y la demostración de la relación dosis-respuesta.

La existencia de una base bibliográfica que demostraba los beneficios del trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos en el tratamiento de los procesos isquémicos de extremidades inferiores, planteaba la duda de establecer un grupo control tratado con placebo. Si la tasa de amputación mayor en los pacientes con isquemia crítica no revascularizable puede ser mayor del 50% al año [8, 233], utilizar como grupo control a una cohorte histórica de pacientes con el mismo diagnóstico médico, estaría justificado desde el punto de vista ético y metodológico, por las siguientes razones:

1. No privaríamos a un grupo de pacientes del posible efecto beneficioso de un tratamiento, al ser incluidos en un grupo de tratamiento placebo.
2. Ofreceríamos a aquellos pacientes incluidos en nuestro estudio, el beneficio posible de evitar la amputación mayor y mejorar el control analgésico, sin riesgos potencialmente graves para su vida, basándonos en la experiencia previa acumulada en los autotrasplantes de progenitores hematopoyéticos.
3. Ofreceríamos rigor estadístico en nuestros resultados, al poder determinar el beneficio o el fracaso del tratamiento, al comparar los datos de nuestra serie prospectiva con los de una cohorte histórica de pacientes que no hubieran tenido acceso a dicha terapia. Dado que la única diferencia entre los grupos sería la introducción del nuevo tratamiento, cualquier cambio en los resultados sería atribuible a la nueva variable (tratamiento) sometida a estudio.

Al aplicar los métodos estadísticos adecuados se pueden realizar análisis comparativos entre cohortes históricas y prospectivas, que permitan extraer datos válidos para valorar la posibilidad de utilizar una terapia, en base al beneficio o no del tratamiento aplicado. Uno de los sesgos que deben ser identificados en un primer análisis estadístico es el de selección. En nuestro caso, se realizó un análisis de Probabilidad de Pertenencia a Grupo, también conocido como Propensity Score. Mediante este análisis, se pudo objetivar que no existió un sesgo de selección, proporcionando a nuestro estudio un rigor estadístico que justificaría los resultados expresados al final del análisis.

Por todas estas razones, creemos justificado el diseño de nuestro estudio desde un punto de vista ético y metodológico, y creemos que los resultados aportados se ajustan a un análisis estadístico riguroso, ordenado y acorde al Método Científico, que ha permitido llevarnos a una serie de conclusiones.

En el análisis descriptivo de los grupos, se apreciaron diferencias significativas en la media de edad, con una media mayor en el grupo control (media edad: 61 años grupo angiogénesis –vs- 72 años grupo control  $p = 0,001$ ). Este dato podría sugerir que la mayor proporción de amputación de extremidad en el grupo control podría deberse a una población más envejecida. Al analizar los datos demográficos respecto a la media de edad, encontramos la siguiente distribución de pacientes por edades:

- Menores a 40 años: 1 en grupo control y 4 en grupo angiogénesis.
- Entre 40 y 50 años: 7 en grupo control y 3 en grupo angiogénesis
- Entre 50 y 60 años: 9 en grupo control y 13 en grupo angiogénesis
- Entre 60 y 70 años: 17 en grupo control y 9 en grupo angiogénesis

Agrupados por edad, encontramos la siguiente distribución:

- Menores de 40 años: 1 en grupo control y 4 en grupo angiogénesis
- Menores de 50 años: 8 en grupo control y 7 en grupo angiogénesis
- Menores de 60 años: 17 en grupo control y 20 en grupo angiogénesis
- Menores de 70 años: 35 en grupo control y 29 en grupo angiogénesis
- Mayores de 70 años: 85 en grupo control y 16 en grupo angiogénesis

Como se puede apreciar, la distribución de pacientes por edades entre ambos grupos es homogénea hasta los 60 años. A partir de los 60 años, se produce un incremento de la media de edad entre los pacientes del grupo control, siendo a partir de los 70 años cuando esta media se incrementa más debido a la diferencia de tamaño muestral. Cuando se realizó el análisis estadístico por grupos de edad, no encontramos diferencias con significación estadística en las medias de edad de los pacientes, agrupados según hubiesen sufrido amputación mayor o no. Por otro lado, la diferencia de edad entre el grupo control y grupo angiogénesis podría justificar una mayor mortalidad en el grupo control, sin embargo esta diferencia no tuvo significación estadística.

En el análisis descriptivo entre los grupos, también se apreciaron diferencias significativas en la distribución del hábito tabáquico (grupo control 35% -vs- grupo angiogénesis 55%  $p=0,031$ ), de la diabetes (grupo control 73% -vs- grupo angiogénesis 48%  $p=0,005$ ), y de la Insuficiencia Renal Crónica (grupo control 20% -vs- grupo angiogénesis 11%  $p=0,013$ ).

El hábito tabáquico se asocia con una mayor severidad de la EAP [6, 8]. Sin embargo, ni en el análisis estadístico global ni en el análisis por grupos, se apreció relación entre tabaquismo y amputación mayor de la extremidad, ni entre tabaquismo y exitus.

Respecto a la diabetes, es conocida que la amputación mayor es más frecuente entre los pacientes diabéticos respecto a los que no lo son [8, 12]. Este resultado puede hacer

pensar que la mayor frecuencia de amputación entre los pacientes del grupo control viene dada por la mayor proporción de pacientes diabéticos. Sin embargo, el análisis de los pacientes del grupo control, no reveló diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la proporción de amputación entre los pacientes diabéticos y no diabéticos: 32 pacientes no diabéticos (96,8% amputados) -vs- 88 pacientes diabéticos (96,5% amputados) ( $p=1$ ). Por otro lado, en el análisis de los pacientes del grupo angiogénesis, sí que se estableció una relación significativa entre diabetes y amputación mayor de extremidad, objetivado en el análisis univariante y multivariante, así como en las tablas de Kaplan-Meier, donde se apreció una mayor tasa de amputación entre los pacientes diabéticos. Este dato nos lleva a la conclusión que la mayor frecuencia de diabetes entre los pacientes del grupo control no justifica la mayor frecuencia de amputación en este grupo y por lo tanto, a pesar de las diferencias en cuanto a su distribución entre los grupos, no puede ser interpretada como un factor de confusión.

Respecto a la insuficiencia renal crónica, ésta ha sido descrita como factor de riesgo de enfermedad cardiovascular [8, 283]. La mayor afectación de los lechos distales, puede deberse a la alteración del metabolismo calcio/fósforo que determina una mayor calcificación de estos vasos, lo que origina lesiones arterioscleróticas similares a las producidas en los pacientes diabéticos. La permeabilidad de los procedimientos revascularizadores es menor cuanto más avanzada es la enfermedad renal [284]. De la misma forma, se ha visto que la carbamilación de la LDL en los pacientes con enfermedad renal crónica, determina una alteración de los mecanismos celulares de reparación endotelial, lo que explica la mayor severidad de la enfermedad arteriosclerótica en estos pacientes [164]. En nuestro trabajo no se ha podido determinar una relación positiva entre enfermedad renal y amputación mayor de la extremidad, en ninguno de los análisis realizados en la población global, ni en los análisis de los

subgrupos poblacionales, por lo que no creemos que esta diferencia de distribución entre los grupos haya podido influir en el resultado de nuestras conclusiones.

En el análisis de los resultados, el tratamiento mediante trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos ha demostrado ser un tratamiento eficaz para aquellos pacientes sin posibilidades de realizar ninguna técnica revascularizadora. En los pacientes tratados con terapia celular se han conseguido tasas de salvamento de extremidad a 12 y 24 meses del 76,8% y 63,6% respectivamente. Estas tasas son muy superiores a las obtenidas en nuestros controles, con cifras del 19,2% y del 7,9% respectivamente. La tasa de salvamento de extremidad de nuestra población control, es similar a las publicadas en series históricas y metanálisis [8, 232, 285, 286], por lo que los resultados obtenidos nos permite realizar un análisis comparativo que nos lleva a esta conclusión.

Entre las comorbilidades que han podido influir en los resultados del tratamiento angiogénico, la diabetes y la hepatopatía se asociaron a un mayor riesgo de amputación, sin embargo, en el análisis multivariante, tan solo la diabetes fue identificada como factor de riesgo de amputación en los pacientes sometidos a tratamiento angiogénico. Este resultado también se ha repetido en los análisis realizados en la población global y en el subgrupo de pacientes que no tuvieron antecedente de cirugía de revascularización. Sin embargo, este resultado no ha sido hallado en el estudio de la población control.

Cuando se compararon los porcentajes de amputación entre los pacientes diabéticos del grupo angiogénesis y el grupo control, se apreció un menor porcentaje de amputaciones en los pacientes diabéticos sometidos a tratamiento angiogénico (Amputación diabéticos grupo Angiogénesis 56,2% -vs- Amputación diabéticos grupo Control 96,6%  $p=0,000$ ).

A pesar de ser considerada la diabetes como factor de riesgo para la amputación, el tratamiento con terapia celular en los pacientes diabéticos disminuyó el porcentaje de amputación en comparación con aquellos diabéticos no tratados. Cabe la posibilidad de que el mejor control de la diabetes en los últimos años haya contribuido a evitar las complicaciones derivadas de la enfermedad, sin embargo y al no haber sido comparado los niveles de hemoglobina glicosilada entre los dos grupos, esta afirmación podría considerarse especulativa.

La diabetes mellitus es un factor de riesgo independiente para el desarrollo mas severo de complicaciones de la EAP, siendo un factor pronóstico independiente para la viabilidad de la extremidad con isquemia crítica [6, 8, 287]. La diabetes provoca disfunción endotelial, aumento de la agregación plaquetaria y alteración de la función fibrinolítica [287], que contribuyen al desarrollo de la EAP. Los pacientes diabéticos presentan alteraciones de la respuesta inflamatoria y de los mecanismos de reparación endotelial implicados en la homeostasis del sistema circulatorio, que explican la mayor severidad de afectación de los vasos diabéticos [288]. A nivel celular, se ha documentado la deplección progresiva y paulatina de células progenitoras de la médula ósea durante la evolución temporal de la diabetes, lo que determina una menor proporción de células progenitoras circulantes en comparación con los pacientes no diabéticos [202, 289], y por tanto una reducción de la capacidad de reparación vascular [290-292]. En el mismo sentido, el incremento en la neovascularización se relaciona no solo con el número de células progenitoras, sino también con los efectos paracrinos de las células progenitoras [293-294]. Este hecho fue demostrado por Ramos y colaboradores [295] en modelos animales de isquemia; Se objetivó un incremento de la perfusión tisular a las 48h de la implantación de CD34+, pero el efecto máximo de la

terapia se consiguió a las 4 semanas de la implantación, debido a los efectos paracrinos moduladores de estas células.

Las CD34<sup>+</sup> liberan múltiples factores de crecimiento que modulan el funcionamiento de otras células, entre las que se incluyen las CD14<sup>+</sup> [296]. La expresión de HGF, IL-8, y MCP-1 aumenta la producción de PGI-2 y disminuye la producción de Tromboxano A<sub>2</sub>, y determina la expresión de ciclooxigenasa (COX1) activando la angiogénesis por vía de la activación del receptor peroxisómico ( PPAR ) [297]. Las CD34<sup>+</sup> de los pacientes diabéticos tienen un perfil secretor distinto, y presentan alteraciones en la respuesta a la hipoxia, en su función vasodilatadora, paracrina y migratoria, tal y como demostraron Jarajapu y colaboradores en su estudio publicado en 2014 [298]. En él analizaron las muestras de células mononucleadas obtenidas de 69 individuos diabéticos y las compararon con las obtenidas de 46 individuos no diabéticos. La secreción de factores angiogénicos (SCF, HGF y TPO) tuvieron niveles más bajos en los individuos diabéticos en comparación con los no diabéticos, y presentaron una menor capacidad de respuesta en situación de hipoxia tisular, objetivada por la menor expresión de HIF 1 $\alpha$  en los individuos diabéticos (HIF-1 $\alpha$  regula la expresión de los receptores para SDF 1 $\alpha$  y VEGF, responsables de la activación del proceso angiogénico en situación de hipoxia tisular). Por otra parte, también se ha demostrado una menor capacidad de proliferación ex-vivo de las CD34<sup>+</sup> de pacientes diabéticos. Martin-Ramirez y colaboradores [299] demostraron una tasa de proliferación de colonias formadoras de células endoteliales (CFEC) del 15% en pacientes diabéticos, muy lejos del 80% de los pacientes no diabéticos. Las CD34<sup>+</sup> de los pacientes diabéticos presentan menor capacidad de la expresión de factores angiogénicos (SCF, HGF, TPO), mayor expresión de factores inflamatorios (GM-CSF, IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ ), y una disminución de la capacidad de respuesta al estímulo hipóxico [300-304].

En nuestro trabajo no hemos realizado estudios comparativos de funcionalidad de las CD34+ entre pacientes diabéticos y no diabéticos. La posibilidad de evaluar la funcionalidad de los progenitores hematopoyéticos en función del control glucémico y de los fármacos antidiabéticos empleados, podría ser una futura línea de investigación. Sería de gran interés conocer de manera fehaciente hasta que punto se produce una disfunción en la angiogénesis fisiológica de estos pacientes, con el fin de poder diseñar estrategias que permitan controlar estos mecanismos y mejorar los procesos de reparación tisular en los pacientes diabéticos.

Aunque las CD34+ son una fuente práctica de células en las que no es requerida una expansión ex-vivo, en pacientes diabéticos su funcionalidad está limitada y por tanto su utilidad terapéutica podría ser limitada [298]. A pesar de todo, en nuestro trabajo se han demostrado mejores tasas de salvamento de extremidad en pacientes diabéticos tratados con progenitores hematopoyéticos, en comparación con los pacientes del grupo control. Sin embargo, la diabetes mellitus constituye un factor de mal pronóstico para el éxito de la terapia celular en estos pacientes. Una de las posibles alternativas podría ser la manipulación ex-vivo de estas células previamente a su reinfusión, con el fin de restaurar su funcionalidad, posibilidad ya sugerida por otros autores [298].

En el estudio de los resultados en los pacientes con antecedente de hepatopatía crónica no hemos encontrado bibliografía publicada al respecto. Sin embargo, y en base a nuestra serie (tasa de salvamento de extremidad en pacientes hepatópatas del 0%), creemos que no está indicado este tratamiento en este subgrupo de pacientes. No hemos podido identificar una causa que justifique el fracaso de la terapia en estos pacientes, por lo que esta podría ser otra vía de investigación dentro de nuestro trabajo.

Mención especial merecen los pacientes con diagnóstico clínico de Enfermedad de Buerger. En nuestra serie, este subgrupo de pacientes (n=13) ha presentado los mejores resultados, en términos de salvamento de extremidad y control del dolor. Diferentes autores ya han mostrado resultados similares [78, 118, 350], siendo publicadas series de más de 50 pacientes, con excelentes resultados. Entre las explicaciones aportadas, los distintos autores justifican los resultados en base a que el abandono del hábito tabáquico por parte de estos pacientes es fundamental para permitir el desarrollo de los nuevos vasos, al tiempo que la desaparición de la respuesta inflamatoria asociada a la enfermedad contribuye a mejorar las condiciones óptimas para el reclutamiento celular y las distintas acciones paracrinas.

Se podría considerar que el hecho de utilizar pacientes con isquemia crítica de etiología no aterosclerótica podría mejorar los resultados de nuestro estudio. Sin embargo, y si excluimos estos pacientes del análisis estadístico, los resultados aportados continúan siendo claramente superiores a la de nuestra población control y a los publicados en la bibliografía.

El éxito del tratamiento de los pacientes con ICMI se basa en la cicatrización de las heridas, el alivio del dolor de reposo isquémico, el salvamento de la extremidad, y en la mejoría de la calidad de vida general [305]. En nuestro trabajo, y a pesar de analizar la eficacia del tratamiento basándonos en las tasas de salvamento de extremidad, creíamos necesario establecer un control objetivo de la mejoría de la perfusión de la extremidad.

El ITB, constituye el método más utilizado para evaluar el grado de severidad de la EAP, por su elevada sensibilidad y especificidad [1, 2, 6, 8, 306]. Su limitación puede venir dada en aquellos pacientes que presenten calcificación arterial, en cuyo caso, y en ausencia de la medición de la presión transcutánea de oxígeno (Tc O<sub>2</sub>), el uso de la

fotopleetismografía (PPG) puede ser una herramienta diagnóstica equiparable al ITB [306].

En nuestro trabajo el ITB se utilizó como herramienta diagnóstica no invasiva para evaluar el incremento de la perfusión de la extremidad. En casos seleccionados (calcificación arterial definida por la imposibilidad de colapsar el flujo al aplicar el manguito de presión, o ITB > 1,4) la PPG se utilizó con el fin de evaluar los cambios en la morfología de la onda o en la ganancia aplicada para evaluar la fasicidad de la misma. Nuestros resultados mostraron una mejoría de las cifras del ITB en los pacientes tratados mediante terapia celular respecto a su situación basal ( $p=0,063$ ). A pesar de que estas diferencias no adquirieron significación estadística, y de acuerdo con los resultados clínicos obtenidos en términos de salvamento de extremidad y mejoría del control del dolor, creemos que un mayor número de casos tratados podría corregir este dato estadístico. La disponibilidad de la TcO<sub>2</sub> habría sido una herramienta más que nos hubiese permitido mostrar la mejoría de la perfusión tisular, lo que hubiese proporcionado mayor rigurosidad a nuestro trabajo. Otras técnicas diagnósticas, como el láser doppler, también podrían ser eficaces. En este momento consideramos que el uso de esta tecnología supondrá una mejora cualitativa del protocolo, por lo que es considerada una de las principales áreas de mejora de nuestro estudio.

En los casos en los que se utilizó la PPG, se apreció una tendencia a la fasicidad de onda tras la aplicación del tratamiento, aunque no podemos utilizar este dato como método objetivo para evaluar el efecto beneficioso del tratamiento, al no haber realizado un estudio estadístico comparativo adecuado, por lo que esta afirmación se basa en la observación clínica.

Con el fin de objetivar el aumento de vasos colaterales formados tras la aplicación del tratamiento, y siguiendo el protocolo realizado por Tateishi-Yuyama y colaboradores [114] realizamos controles arteriográficos a los 12 meses postimplantación en los primeros 5 casos. A pesar de apreciar incrementos del número de vasos colaterales formados, se decidió abandonar el control arteriográfico de estos pacientes, debido a la calidad de las imágenes ofrecidas por los equipos de radiodiagnóstico empleados al inicio del estudio, y al grado de subjetividad implícito en la valoración de los vasos de calibre inferior a 1-2mm, derivados de la cantidad de contraste empleado y los tiempos de escopia, como ya ha sido señalado por otros autores [159, 307-310]. En un caso se realizó un estudio comparativo de la perfusión de la musculatura gemelar mediante resonancia de difusión/perfusión, que evidenció mayor perfusión de la musculatura tratada tras la aplicación del tratamiento con progenitores hematopoyéticos.

En la actualidad, el desarrollo de la tecnología aplicada a los equipos de radiodiagnóstico portátil ha permitido tener intensificadores de alta resolución que permiten incrementar los campos de visión disminuyendo la radiación y la cantidad de contraste empleado. Con la aparición de los quirófanos híbridos es posible realizar estudios de mejor calidad obteniendo imágenes con una resolución 10 veces mayor que con las unidades portátiles [309-310]. Una alternativa a la angiografía convencional sería el uso de CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) como medio de contraste. Su uso requiere de un equipamiento adicional y la calidad de las imágenes en el territorio infragenicular es muy inferior a la obtenida con contraste yodados [310], especialmente en los casos de afectación arterial difusa, por lo que no creemos justificado su uso en la evaluación de la microcirculación.

La Tomografía Axial Computerizada con contraste endovenoso (AngioTAC), podría ser una alternativa a la angiografía convencional. Los nuevos aparatos de TAC permiten

estudios rotacionales de espesores inferiores a 1 mm tomados en fracciones de tiempo de 0,3 segundos, lo que se traduce en rapidez y alta resolución a la hora de obtener los estudios. La resolución de las imágenes obtenidas tras su procesado en las estaciones de trabajo ha hecho que en muchos casos el TAC ofrezca imágenes que puedan asemejarse a la angiografía convencional. Sin embargo hay que tener en cuenta que las imágenes ofrecidas por las estaciones de trabajo son reconstrucciones sujetas a la subjetividad del operador y de los artefactos producidos durante las reconstrucciones volumétricas, sobretodo en la visualización de los troncos infragéniculares de menor calibre [309, 311]. A esto hay que añadir las altas dosis de radiación aplicadas y los mayores volúmenes de contraste necesarios para obtener imágenes adecuadas (150-180 cc frente a 40-80 cc de la arteriografía convencional).

La Resonancia Magnética Nuclear con contraste (AngioRMN) ha sido propuesta como alternativa por la posibilidad de administrar contraste no nefrotóxico (gadolinio) y no utilizar radiación ionizante. Al igual que el angioTAC, las imágenes finales son el resultado del procesamiento de unas imágenes obtenidas durante un periodo rotacional, por lo que pueden estar sujetas a cierto grado de subjetividad. Por otro lado es frecuente la contaminación venosa cuando se trata de evaluar las arterias infragéniculares. Ha sido descrita la Dermatopatía Fibrosante Nefrogénica en pacientes con insuficiencia renal crónica a los que se les ha administrado gadolinio [312, 313]. Esta reacción adversa es dosis dependiente y consiste en un engrosamiento e hiperpigmentación cutánea similar a la esclerodermia, pudiendo afectar a órganos y causando la muerte. No existe tratamiento específico salvo tratamiento anti-inflamatorio, esteroides y hemodiálisis, por lo que su uso está contraindicado en pacientes con aclaramientos de creatinina inferiores a 30 ml/min o en insuficiencia renal aguda. Tampoco creemos indicada su utilización en nuestra población de pacientes donde la prevalencia de IRC es elevada.

Otras técnicas que se han descrito para evaluar de manera visual la formación de nuevos vasos han sido la Tomografía de Emisión de Positrones (PET) y la Tomografía de Emisión de Fotón Único (SPECT) [314-317]. Ambas técnicas han sido ampliamente utilizadas en el estudio de enfermedades cardiovasculares en los últimos 30 años. Sin embargo, la limitación que presentan ambas técnicas es la baja resolución de las imágenes y la exposición de los pacientes a radiaciones ionizantes. La calidad de las imágenes se ha visto mejorada sustancialmente con la incorporación de las técnicas de tomografía axial computerizada (PET-TAC , SPECT-TAC), lo que ha permitido la obtención de imágenes anatómicas con menores artefactos y mayor resolución. La aplicación de las técnicas de microPET y microSPECT han supuesto un paso más, permitiendo su aplicación en el análisis de la neovascularización producida durante los procedimientos de Angiogénesis Terapéutica [316, 317], utilizando trazadores que se adhieren a los receptores celulares de VEGF [318, 319], o a las integrinas  $\alpha v \beta 3$  expresadas en la superficie de las células endoteliales en fase de proliferación [320, 321], pudiendo obtener imágenes de la actividad angiogénica en desarrollo. Sin embargo, estas técnicas de imagen se han aplicado en modelos animales, por lo que todavía son necesarios estudios más desarrollados para su aplicación en la práctica clínica, donde todavía precisan de optimizar y corregir los defectos relacionados con los movimientos asociados del ciclo cardíaco y la respiración. Además, la exposición adicional al uso de trazadores ionizantes con las técnicas de TAC, hacen que estas técnicas de imagen deban ser correctamente analizadas previamente a su aplicación en la práctica clínica [315].

Las imágenes obtenidas mediante Resonancia Nuclear Magnética de Difusión (RMNd) permiten obtener un valor cuantitativo de la perfusión de la extremidad [322]. Esta técnica permite utilizar el agua de la sangre como trazador endógeno para la obtención de imágenes. La base sobre la que se desarrolla la técnica es la capacidad de difusión de las moléculas de agua en los territorios correctamente vascularizados, mientras que se ve enlentecida en aquellos territorios isquémicos. Esto se traduce en patrones de perfusión a los que se les asignan escalas de intensidad de color en base al cual se identifican los territorios más o menos perfundidos. La principal ventaja de esta técnica es la ausencia de radiaciones ionizantes y la no dependencia de contrastes endovenosos. En los últimos años, distintas publicaciones han apuntado la posibilidad de utilizar la RMNd, para evaluar el incremento de la perfusión de las extremidades tratadas con terapias angiogénicas [323-325]. El objetivo de esta técnica radiológica no sería la identificación de los vasos neoformados, sino demostrar el incremento de la perfusión tisular mediante técnicas de imagen fácilmente interpretables por cualquier docente o personal facultativo.

A pesar de que en estos momentos nuestro hospital dispone de una sala híbrida que nos permitiría evaluar la formación de nuevos vasos en los pacientes tratados, creemos que el uso de la RMNd podría ser de mayor utilidad a la hora de establecer una imagen radiológica que objetive el incremento de la perfusión de la extremidad. Hay que tener en cuenta que la angiografía tiene como finalidad evaluar lesiones arteriales con el fin de determinar posibilidades de revascularización, y es considerada la "técnica oro" para la planificación de la cirugía de revascularización.

Dado que los pacientes sometidos a trasplante con progenitores hematopoyéticos, son pacientes ya angiografiados en los que se ha desestimado la revascularización, la RMNd podría ser una técnica de imagen que nos permitiría objetivar el beneficio de la técnica. Ésta podría ser un área de mejora en el desarrollo futuro de este protocolo, para la evaluación radiológica de la efectividad del tratamiento en nuevos casos.

Además de la mejoría de la situación clínica de los pacientes con ICMI, la mejora en la calidad de vida constituye uno de los objetivos del tratamiento de esta enfermedad [8]. En los estudios de terapia angiogénica, dada la dificultad para demostrar desde el punto de vista radiológico el crecimiento de los nuevos vasos [326], la evaluación de la calidad de vida constituye uno de los objetivos de todos los estudios, con el fin de evaluar la eficacia de la terapia. Existen multitud de cuestionarios de calidad de vida, entre los que se incluyen el SF-36 [327], el EQ-5D [328], entre otros. En el SF-36, el paciente debe responder a 35 cuestiones que abarcan a 8 aspectos de la salud general. La suma de todas las puntuaciones se transforma en una escala que varía de 0 (peor estado de salud) a 100 (mejor estado de salud). El EQ-5D, se compone de 5 cuestiones que abarcan 5 aspectos de la salud (movilidad, autosuficiencia, actividades diarias, dolor/molestias, y ansiedad/depresión). Cada cuestión tiene tres posibles respuestas: Sin problemas (nivel 1), algunos problemas (nivel 2) y muchos problemas (nivel 3). La combinación de respuestas puede dar lugar a 243 ( $3^5$ ) posibles resultados de salud. En todos ellos se evalúa la repercusión en el ámbito físico y mental del paciente, asignando puntuaciones a una serie de preguntas que determinarán una gradación dentro de una escala validada sobre la que se establecerá el grado de repercusión de la enfermedad en la calidad de vida del paciente. En todos ellos, la cuantificación del dolor constituye una de las variables analizadas que mayor repercusión presenta sobre la puntuación final.

Pisa y colaboradores, en su estudio publicado en 2012 sobre más de 200 pacientes entrevistados con diagnóstico de ICMI [329], determinaron que el dolor crónico era el tercer factor que mayor repercusión tenía sobre la percepción de la calidad de vida (15%), tan sólo por detrás de la indicación de amputación de extremidad (33%) y la capacidad de realizar acciones independientes (25%). Sprengers y colaboradores [330] publicaron un estudio en 2010 donde se comparó la puntuación obtenida en la escala visual analógica para el dolor (EVA) y los resultados de las puntuaciones de los cuestionarios SF-36 y EQ-5D realizados en pacientes con ICMI. En este estudio, se demostró que existe relación entre el nivel de dolor determinado por EVA, y la calidad de vida referida en ambos cuestionarios, con niveles de correlación de  $R^2 = 0,454$  para el SF-36 y  $R^2=0,398$  para el EQ-5D ( $p<0,05$ ). La conclusión a la que llegan los autores es que el manejo del dolor es fundamental para conseguir mejorar la calidad de vida de estos pacientes, requiriendo incluso un manejo multidisciplinar en aquellos pacientes sin opciones de revascularización. Esta relación entre el grado de dolor referido por escala visual analógica y la calidad de vida referida en los distintos cuestionarios ha sido publicada con posterioridad por otros autores [331-334]. Algunas publicaciones han hecho incapié en que la multitud de variables de la que constan estos cuestionarios, o su diseño, puede ser un factor limitante para su correcta cumplimentación por parte de ciertos pacientes, sobre todo aquellos de mayor edad [334], o nivel cultural medio-bajo. Algunos autores han cuestionado la validez de estos exámenes a la hora de determinar el nivel de calidad de vida [334, 335], argumentando que la cumplimentación incompleta o incorrecta no determina correctamente la baremación, sobretodo en pacientes de edad avanzada.

Teniendo en cuenta que la EVA se trata de una escala validada para la determinación objetiva del grado de dolor [335] y dado que el dolor constituye una variable de máxima

influencia en los cuestionarios de salud [329-334], creimos más sencillo evaluar la calidad de vida referida en términos de control del dolor. Por su sencillez y simplicidad, creemos que la EVA ha sido capaz de evaluar de manera objetiva la mejoría clínica del tratamiento mediante trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos.

Respecto a los datos biológicos, nuestro trabajo presenta una serie de resultados que podrían ser considerados novedosos respecto a la bibliografía publicada hasta el momento de la redacción del texto.

En primer lugar, se ha establecido la relación positiva entre la movilización celular producida por la administración de G-CSF, y el número de CD34+ obtenidas en el inóculo. La concentración de CD34+ del inóculo utilizado, es directamente proporcional a la concentración de leucocitos, monocitos y neutrófilos de sangre periférica. Este dato, aunque conocido en el trasplante de células madre para el tratamiento de enfermedades hematológicas, no ha sido referenciado en ningún trabajo publicado sobre terapia angiogénica mediante el uso de células mononucleadas de sangre periférica. Además, se ha comprobado que existe una menor frecuencia de amputación mayor entre aquellos pacientes con mejores rendimientos de movilización celular tras el tratamiento con G-CSF. Esta observación clínica podría explicarse por el hecho de que no se han utilizado inóculos purificados, y por tanto, la mayor concentración de células accesorias CD34- podrían beneficiar el proceso angiogénico mediante la secreción de citocinas y factores de crecimiento que contribuirán a la maduración de las estructuras vasculares formadas por las CD34+, hecho ya observado por otros autores [337]. La fracción de células mononucleadas CD34- , no solo sintetizan factores de crecimiento angiogénico, sino también Angiopoyetina 1, citocina implicada en los procesos de maduración y

mantenimiento del sistema vascular [338], por lo que la combinación de los efectos de ambos tipo celulares llevarían a la formación de capilares estables.

En segundo lugar, se ha demostrado que la respuesta terapéutica se relaciona con el número de CD34+ implantadas. Estudios publicados anteriormente [232, 243, 244, 338-341] ya han sugerido un efecto dosis-dependiente en el beneficio clínico del tratamiento con células progenitoras hematopoyéticas, sin que se hayan establecido rangos de inóculos celulares o concentraciones mínimas de CD34+ para ser infundidas. Se han utilizado dosis altas ( $10^9$ ) y bajas ( $10^5$ ) de inóculos celulares, sin obtener una relación estadísticamente significativa entre el número total de CD34+ infundidas y los resultados clínicos [341]. En nuestro estudio hemos demostrado que inóculos de  $10^6$  son suficientes para conseguir el efecto terapéutico deseado (media de CD34+ totales infundidas: No amputados  $85.33 \times 10^6$  -vs- Amputados  $52.27 \times 10^6$ ,  $p=0,043$ ). Este es un dato que permite establecer un punto inicial en cuanto a la dosis total mínima de células CD34+ que deben ser infundidas.

En tercer lugar, todos los trabajos publicados en este ámbito, no hacen referencia a las dosis de CD34+ ajustadas según el peso del paciente. La categorización del inóculo referido por peso del paciente es una variable analizada de manera sistemática en todos los procesos de trasplante de progenitores hematopoyéticos para el tratamiento de enfermedades hematológicas. Al igual que con los tratamientos farmacológicos, decidimos analizar la dosis de CD34+ infundidas en relación al peso del paciente, con el fin de identificar la concentración mínima de CD34+ del inóculo necesaria para conseguir un efecto terapéutico positivo. En nuestro trabajo hemos hallado la dosis celular mínima para conseguir una buena evolución clínica con nuestra técnica y esta dosis mínima de CD34+ necesaria para evitar la amputación de la extremidad en riesgo

es de  $1,2 \times 10^6$  CD34+/Kg peso paciente. Si se revisan los últimos metaanálisis publicados entre 2010 y 2014 [136, 164, 203, 232, 233], en todos ellos se describe una relación positiva entre el número de células CD34+ infundidas y el beneficio terapéutico, sin embargo, este dato no había sido definido y la cuestión fundamental permanecía sin respuesta: ¿cuál es la dosis mínima necesaria para establecer el efecto terapéutico ?

Nuestro resultado establece cual es la dosis celular mínima necesaria en el tratamiento mediante trasplante de progenitores hematopoyéticos en pacientes con ICMI. Su importancia radica en que establecer un mínimo de células para el trasplante nos permite no prolongar los procedimientos de extracción y movilización en el paciente. Esto supone un dato novedoso y hasta la fecha no publicado, lo que permite establecer un punto de partida para investigaciones posteriores.

La siguiente cuestión que queda por resolver es la necesidad de utilizar inóculos purificados. En este trabajo queda demostrado que los inóculos no purificados obtienen buenos resultados en el tratamiento de la isquemia crítica de miembros inferiores, por lo que cuestionamos la necesidad de realizar purificación de células CD133+, tal y como realizan otros grupos de trabajo [377]. Creemos que el inóculo no purificado aporta las ventajas de la acción paracrina de las células accesorias, sobretodo monocitos y plaquetas. Por otro lado, simplifica técnicamente el procedimiento y disminuye su coste. Se ha intentado establecer la relación entre el beneficio terapéutico y la concentración de otras poblaciones celulares del inóculo (neutrófilos, linfocitos, monocitos y plaquetas). A pesar de apreciar mejores resultados clínicos con la implantación de mayores concentraciones de neutrófilos y monocitos en los inóculos, no se ha podido identificar puntos de corte con significación estadística. Teniendo en cuenta que se ha

hablado de los posibles efectos paracrinos de las poblaciones celulares accesorias, el efecto de las distintas fracciones celulares del inóculo podría ser una nueva línea de investigación para futuros estudios prospectivos.

Sanchez-Guijo y colaboradores [377] compararon los resultados obtenidos con el uso de inóculos purificados (CD133+) frente al uso de células mononucleadas no purificadas, en un modelo animal de isquemia de extremidad. Se apreció una capacidad de angiogénesis similar con el uso de ambos inóculos, sin embargo, este efecto terapéutico no se produjo por un fenómeno de diferenciación celular, por lo que sugerían que esta capacidad podía venir determinada las citoquinas y factores de crecimiento secretados por las células transplantadas, lo que sugiere un efecto paracrino. Pelosi [378] y Yoder [379], en sus correspondientes revisiones, hacen hincapié en la necesidad de definir los métodos para caracterizar correctamente los progenitores endoteliales. Mientras que la caracterización fenotípica de estas células se base en la combinación de diferentes marcadores de superficie, la utilización de inóculos purificados nos llevará a desestimar células con capacidad de desarrollo endotelial. En opinión de este investigador, y de acuerdo con la metodología descrita, los inóculos no deben ser purificados. El proceso angiogénico no viene determinado sólo por los progenitores endoteliales, sino también por otras poblaciones celulares que, mediante sus efectos paracrinos, contribuirán a establecer el entorno necesario para el desarrollo y maduración de los nuevos vasos formados, mediante la producción y liberación de factores de crecimiento y citocinas, implicadas en el proceso de maduración de los vasos. En este sentido, otros autores han sugerido que la carencia de poblaciones linfocitarias en los inóculos administrados, puede ser un factor implicado en el fracaso del tratamiento, sugiriendo suplementar los inóculos linfopénicos con plaquetas [342]. Siguiendo esta línea de investigación, en nuestro trabajo hemos intentado relacionar el número de plaquetas incluidas en el

inóculo utilizado con los resultados obtenidos en términos de salvamento de extremidad, sin que se haya podido establecer una asociación positiva entre el número de plaquetas y una mejor tasa de salvamento de extremidad.

Han sido publicados estudios donde la administración aislada de células mononucleadas de sangre periférica han conseguido desarrollar nuevos vasos [338, 343-345], aunque este efecto ha sido más potente cuando se han añadido CD34+ [344] lo que apoya la hipótesis de que el mecanismo de neovascularización se produce por la acción combinada de las células CD34+ (progenitores endoteliales) responsables de la formación de los nuevos vasos, y la población mononucleada CD34- (células mononucleadas, neutrófilos y derivadas del sistema monocito-macrófago) responsable de la producción de factores de crecimiento. Otros trabajos publicados han evaluado la eficacia del tratamiento combinado con células nucleadas derivadas de médula ósea (plaquetas, linfocitos, células hematopoyéticas, células mesenquimales, y células progenitoras endoteliales) con resultados prometedores [346-348]. Estas acciones paracrinas de las distintas poblaciones celulares implicadas en los procesos de mantenimiento de los nuevos vasos se ha visto, no sólo en el tejido muscular isquémico, sino también en otros tejidos como el neuronal, bajo el nombre de efecto espectador o Bystander Effect [349]. En estos casos, se ha podido comprobar el efecto colaborador de células progenitoras hematopoyéticas en respuesta al estímulo inflamatorio producido durante los procesos isquémicos neuronales, migrando hasta estos tejidos lesionados y colaborando con la secreción de citocinas que mantengan las condiciones ambientales necesarias para la reparación del tejido isquémico. De acuerdo con otros autores [93-102, 137, 349], la formación de nuevos vasos requiere la interacción de múltiples poblaciones celulares, lo que apoya el uso de inóculos no purificados. Sería necesario un estudio aleatorizado que comparase ambas técnicas, con el fin de poder

llegar a una conclusión definitiva, por lo que esta podría ser una futura línea de investigación en el desarrollo del protocolo establecido en nuestro hospital.

En cuarto lugar, se han presentado los resultados de un seguimiento a largo plazo. La media de seguimiento en nuestra serie de pacientes tratados con terapia angiogénica ha sido de 41 meses. Junto a la serie publicada por Idai y colaboradores en 2011 [350], que mostraron un seguimiento de 48 meses, constituye uno de los mayores seguimientos registrados, si revisamos los estudios publicados hasta el año 2014 referentes a terapia celular [133-136, 160, 232, 233, 243, 245, 247, 348].

Este seguimiento a largo plazo ha permitido demostrar que el tratamiento aplicado presenta beneficios a largo plazo, sin efectos adversos atribuibles. Por otro lado, permite afirmar que se trata de una técnica con resultados mantenidos en el tiempo (tasa de salvamento de extremidad del 58% a 60 meses), sin necesidad de repetir nuevas dosis, con el fin de mantener el efecto terapéutico deseado. Este dato es importante desde un punto de vista económico, logístico y de comodidad para el paciente.

En este trabajo no se ha fijado como parte de los objetivos realizar un estudio coste/efectividad, pero la situación económica actual nos lleva a evaluar brevemente los costes del tratamiento sometido a nuestro estudio.

De acuerdo con los precios de los Grupos Relacionados por Diagnóstico (GRD) publicados en el Boletín Oficial de las Islas Baleares (BOIB) en julio de 2014 (BOIB 1 Julio 2014, número 89, páginas 30153 a 30196), en el caso de la amputación de la extremidad su valor asciende a 13.164 €. Si ajustamos el precio por proceso, este valor desciende a 6.439 €. En cualquier caso, la amputación mayor de extremidad supone un importante impacto en la economía sanitaria, que debe costear no sólo el proceso

quirúrgico de la amputación, sino también el material ortoprotésico y procesos de rehabilitación del paciente hasta que le permitan un desplazamiento independiente. En comparación con estos datos, el coste por proceso del trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos supone 1.891 €, en donde se incluye el proceso de aféresis (830 €) y la estancia quirúrgica de 24 horas a razón de 1.061€.

De acuerdo con estos datos, estaría justificado desde un punto de vista económico la utilización de esta terapia en aquellos pacientes no tributarios de cirugía de revascularización.

Este trabajo puede presentar diversas limitaciones, entre las que se encuentran:

1. No haber presentado un grupo tratado con placebo
2. Presentar diferencias entre los grupos comparados
3. No disponer de un cuestionario de calidad de vida
4. No disponer de medición de la presión transcutánea de oxígeno como método para cuantificar la severidad de la isquemia de extremidad.

Las dos primeras suposiciones han sido defendidas en el inicio de esta discusión, y en opinión del investigador no deberían ser consideradas limitaciones de nuestro estudio en base a la argumentación antes señalada. En el tercer supuesto, el uso de cuestionarios de calidad de vida habría supuesto una mayor calidad a la hora de exponer los resultados. En estos momentos existen cuestionarios de calidad de vida mas sencillos, como pueden ser el SF-12 [333, 335], lo que deberá ser tomado en consideración para futuros estudios. Respecto al uso de la  $TcO_2$ , permitiría evaluar correctamente aquellos

pacientes que muestren índices calcificados, por lo será incluida como herramienta diagnóstica en la revisión del protocolo.

En la actualidad, se están evaluando distintas estrategias para mejorar la eficacia de las terapias celulares:

El uso de células autólogas en pacientes de edad avanzada y con múltiples comorbilidades, pueden influir en los resultados del tratamiento, como así han observado distintos autores [136, 339, 351]. La disfunción de las células utilizadas o la apoptosis celular inducida por el medio severamente isquémico han sido identificadas como posibles factores asociados con el fracaso de la terapia celular [136, 352]. Se ha sugerido la posibilidad de modificar las células mononucleadas previamente a su infusión mediante la aplicación ex vivo de catalizadores que incrementen la producción de eNOS. El objetivo es mejorar la capacidad de migración, adhesión y proliferación de estas células incrementando su capacidad para la formación de nuevos vasos [353]. Otros autores han sugerido la posibilidad de precondicionar al inóculo mediante su exposición a medios con baja saturación de oxígeno, intentado simular la situación del tejido isquémico, (donde la concentración de oxígeno es menor al 1%), con el fin de evitar la apoptosis celular [136, 354]. En este sentido, y con el fin de preservar la mayor cantidad del inóculo, se ha sugerido la posibilidad de encapsular las células dentro de matrices poliméricas semipermeables, evitando la agresión del medio isquémico sobre estas células al tiempo que permita el paso al tejido de los factores de crecimiento secretados. [352, 355]

### *Perspectivas futuras dentro de la medicina regenerativa*

Este estudio se enmarca dentro de la Medicina Regenerativa. Esto hace que desde el inicio del diseño de este trabajo (año 2002) hasta el momento de su redacción (año 2014), se hayan publicado distintos trabajos utilizando distintas líneas celulares con el mismo objetivo: reparar el tejido lesionado. En el ámbito de las enfermedades cardiovasculares además de las células mononucleadas (tanto de médula ósea como de sangre periférica), otras líneas celulares también han sido objeto de estudio.

Las *células madre mesenquimales (MSC)* son otra fracción dentro de la médula ósea y se diferencian de las células hematopoyéticas por su capacidad para diferenciarse hacia una línea osteogénica [97], sin embargo distintas publicaciones han demostrado la capacidad terapéutica de estas células para evitar la pérdida de la extremidad en modelos animales [136, 356]. Esta acción se cree debida a una actividad paracrina, liberando distintos mediadores inmunomoduladores y factores de crecimiento que favorecerían el mantenimiento de los vasos neoformados, al tiempo que estas células se incorporan en el tejido muscular lesionado adquiriendo sus características fenotípicas tras un proceso de diferenciación [357]. El interés de los distintos investigadores por las MSC, se basa en las siguientes razones: (1) pueden ser fácilmente extraídas de médula ósea y ser expandidas *ex-vivo*, (2) no requieren de inmunosupresión, por lo que pueden ser utilizadas como tejido alogénico, (3) pueden ser modificadas por transfección génica con el fin de liberar factores requeridos en neovascularización y (4) pueden ser administradas por vía sistémica o local [247, 358, 359]. En la actualidad, se están llevando a cabo estudios de fase I y II, con resultados contradictorios [136, 247].

Las *células madre del tejido adiposo (ASC)* están siendo ampliamente estudiadas [233, 234-241], dada su facilidad de aislamiento durante el proceso de liposucción, sin que se vea afectada la viabilidad de la célula. Estas células han sido utilizadas por su alta capacidad de segregar factores angiogénicos, y por su capacidad para diferenciarse en pericitos, implicados en la conferir estabilidad en los vasos neoformados. Sin embargo, los estudios publicados hasta el momento corresponden a estudios de Fase I, y los estudios de Fase II se encuentran en desarrollo en el momento de la redacción del presente texto, por lo que no se pueden extraer conclusiones definitivas sobre la eficacia y seguridad del tratamiento con estas células [136].

Los monocitos constituyen otro tipo celular de interés para los grupos de investigación. Constituyen una fracción dentro de la población leucocitaria, implicados en la neovascularización producida en los procesos inflamatorios. En respuesta al estímulo inflamatorio producido en los tejidos isquémicos, los monocitos favorecen la proliferación endotelial y la migración de otras células endoteliales mediante la producción de factores de crecimiento y proteasas que degradan la matriz extracelular, formando túneles que posteriormente serán endotelizados, dando lugar a la formación de nuevos vasos [360-362]. Caracterizados por sus marcadores de superficie CD14 y CD16, se diferencian en 3 subtipos en función de fenotipo inflamatorio, anti-inflamatorio y de remodelación tisular, y es conocido que presentan capacidad para diferenciarse hacia células endoteliales [164, 363]. Han demostrado una gran capacidad pro-angiogénica en modelos tumorales y en modelos animales de isquemia de extremidad, por lo que se ha sugerido su aplicación en terapia angiogénica [363-365].

Las *células madre pluripotentes inducidas (iPSC)* son un tipo de células madre con características pluripotenciales derivadas artificialmente de células fibroblásticas que inicialmente no era pluripotenciales [136,366-368]. Su capacidad de diferenciación es similar a las células embrionarias con una capacidad ilimitada para la expansión y la clonación [136, 369]. En estudios animales han demostrado su capacidad para generar nuevos vasos y nuevas células musculares en modelos isquémicos [366-371]. Las principales ventajas de las iPSC es que pueden obtenerse de multitud de fuentes como son piel o cabello, por lo que permiten realizar implantación autóloga en aquellos individuos que lo precisen, evitando las reacciones inmunes producidas por los injertos alogénicos [136]. Sin embargo, su uso no está exento de posibles efectos adversos, como pueda ser la oncogénesis derivada de los genes utilizados durante el proceso de reprogramación celular [136, 372].

Como ya se ha comentado con anterioridad, el proceso angiogénico es un proceso complejo, regulado por multitud de líneas celulares. El uso de diferentes tipos celulares combinados en un inóculo, podría ser una nueva línea de investigación para futuros tratamientos. En la actualidad se estudia la combinación de MSC y MNC obtenidos por aspirado medular [373], por lo que sus resultados pueden abrir nuevas vías de estudio.

## CONCLUSIONES



## 7. CONCLUSIONES

Como consecuencia del análisis de los resultados obtenidos, se pueden obtener las siguientes conclusiones.

1. La isquemia crítica de miembros inferiores (ICMI), sin posibilidad de revascularización, presenta una incidencia de amputación mayor de la extremidad muy alta, con tasas de salvamento de extremidad a 1, 2 y 5 años del 18,4%, 7,9% y 0%.
2. El tratamiento mediante trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos produce una disminución estadísticamente significativa de la incidencia de amputación mayor, mostrando tasas de salvamento de extremidad a 1, 2 y 5 años del 76,8%, 63,6% y 58,1% respectivamente.
3. La diabetes mellitus es un factor independiente de mal pronóstico para la supervivencia de la extremidad. En este grupo de pacientes, el tratamiento con progenitores hematopoyéticos produce una mejora estadísticamente significativa en la tasa de salvamento de extremidad, comparada con la población control.
4. El éxito del tratamiento se relaciona directamente con la cantidad de CD34+ infundidas, requiriendo una concentración mínima por inóculo de  $1,2 \times 10^6$  CD34+/kg.
5. No se han producido reacciones adversas derivadas del tratamiento, y no se han apreciado diferencias significativas en la proporción de exitus entre ambos grupos.

Estas conclusiones permiten elevar la hipótesis planteada a la categoría de tesis, pudiendo afirmar que:

***El tratamiento de la ICMI, sin posibilidades de revascularización, mediante el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos es una terapia eficaz y segura, que permite obtener tasas de salvamento de extremidad muy superiores a las publicadas con el tratamiento convencional.***



## **BIBLIOGRAFIA**



## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Lara Hernández R, Lozano Vilardell P. Isquemia crítica de miembros inferiores: una enfermedad cada vez más prevalente. *Med Clin (Barc)* 2011; 136(3): 106-108. (editorial)
2. Santaera Omar A. Tratamiento de la isquemia crítica de miembros inferiores. *Rev Argent Cardiol* 2010; 78 (2). 106-107 (editorial)
3. Criqui MH, Fronek A, Barrett-Connor E, Klauber MR, Gabriel S, Goodman D. The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population. *Circulation* 1985;71(3):510-51.
4. Hiatt WR, Hoag S, Hamman RF. Effect of diagnostic criteria on the prevalence of peripheral arterial disease. The San Luis Valley Diabetes Study. *Circulation* 1995; 91(5):1472-9.
5. Selvin E, Erlinger TP. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2000. *Circulation* 2004; 110(6):738-43.
6. Fowkes FG, Housley E, Cawood EH, Macintyre CC, Ruckley CV, Prescott RJ. Edinburgh Artery Study: prevalence of asymptomatic and symptomatic peripheral arterial disease in the general population. *Int J Epidemiol* 1991; 20(2): 384-92.
7. Hirsch A, Criqui M, Treat-Jacobson D, Regensteiner J, Creager M, Olin J, et al. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA* 2001; 286(11): 1317-24.
8. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FGR on behalf of the TASC II working group. Inter-Society Consensus for the

- Management of Peripheral Arterial Disease. ( TASC II ). Eur J Vasc Endovasc Surg 2007; 33: s5-s75.
9. Dormandy J, Mahir M, Ascady G , Balsano P, De Leeuw P, Blombery P, et al. Fate of the patient with chronic leg ischaemia. A review article. J Cardiovasc Surg (Torino) 1989; 30 (1) : 50-7 .
  10. Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR. Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. Ann Intern Med 2004;141(6):421-31.
  11. Muntner P, Wildman RP, Reynolds K, Desalvo KB, Chen J, Fonseca V. Relationship between HbA1c level and peripheral arterial disease. Diabetes Care 2005;28(8):1981-1987.
  12. ADA Peripheral arterial disease in people with diabetes. Diabetes Care 2003;26(12): 3333-3341.
  13. Senti M, Nogues X, Pedro-Botet J, Rubies-Prat J, Vidal-Barraquer F. Lipoprotein profile in men with peripheral vascular disease. Role of intermediate density lipoproteins and apoprotein E phenotypes. Circulation 1992; 85(1): 30-36.
  14. D'Agostino Sr RB, Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M. General CardioVascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. Circulation 2008; 117: 743-753
  15. Pencina MJ, D'Agostino Sr RB, Larson MG, Massaro JM, Vasan RS. Predicting the 30-year risk of cardiovascular disease: the Framingham Heart Study. Circulation 2009; 119: 3078-3084
  16. Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homo- cysteine,

- lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. JAMA 2001;285(19):2481-5.
17. Brito V, Alcaráz A, Augustovski F, Picho-Riviere A, García Martí S, Bardach A, et al. Proteína C Reactiva ultrasensible como biomarcador pronóstico de enfermedad cardiovascular. Documentos de Evaluación de Tecnologías Sanitarias. Informe Técnico Breve n°47. Buenos Aires. Argentina. Agosto 2013. Disponible en [www.iecs.org.ar](http://www.iecs.org.ar)
  18. Nehler MR, Wolford H. Evolución natural y tratamiento no quirúrgico de la isquemia crónica de la extremidad inferior. En: Cronenwett JL, Gloviczki P, Johnston KW, Krupski WC, Ouriel K, Sidawy AN, editores. Rutherford Cirugía Vascul ar 6ª edición. Madrid: Elsevier-Saunders; 2006. cap 77 p 1083-1094
  19. Lozano-Vilardell P, Corominas-Roura C, Gomez-Ruiz FT, Manuel-Rimbau E, Juliá-Montoya J. Evolución natural de la isquemia crítica de los miembros inferiores. Angiología 2003; 55 (Supl 1): S38-S46
  20. Strandness DE Jr, Sumner DS. Exercise ankle pressure measurements in arterial disease. En : Bernstein EF (ed): Noninvasive Diagnostic Techniques in Vascular Disease, 4th ed. St. Louis. Mosby-Year Book 1993. p 547
  21. Zierler RE. Sumner DS. Evaluación fisiológica de las enfermedades oclusivas de las arterias periféricas. En : Cronenwett JL, Gloviczki P, Johnston KW, Krupski WC, Ouriel K, Sidawy AN, editores. Rutherford Cirugía Vascul ar 6ª edición. Madrid: Elsevier-Saunders; 2006. Cap 14. p 197-222
  22. Girolami B, Bernardi E, Prins MH. Treatment of intermittent claudication with physical training, smoking cessation, pentoxifylline or nafronyl: A meta-analysis. Arch Intern Med 1999; 159: 337-345

23. CAPRIE. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet* 1996;348(9038):1329-1339.
24. Michaud S, Dussault S, Haddad P, Groleau J, Rivard A. Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis* 2006; 187: 423–432.
25. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* . 1994;344 (8934) :1383-1389
26. Badimon L, Vilahur G. Beneficio clínico de las estatinas: ¿hemos cubierto todo el espectro? *Rev Esp Cardiol Supl* 2011;11(B): 3-13
27. Rodríguez Morata A, Esteban Gracia C, Fernández Heredero A, Riera Vázquez R, Vaquero Lorenzo F, March García JK. Farmacoterapia en el paciente con claudicación intermitente. *Angiología* 2011; 63: 113-118
28. Puras E, Cairols M, Vaquero F. Estudio piloto de prevalencia de la enfermedad arterial periférica en atención primaria. *Angiología* 2006; 58 (2); 119-125.
29. Manzano L, García-Díaz J, Gómez-Cerezo J, Mateos J, Del Valle FJ, Medina-Asensio J, et al. Valor de la determinación del ITB en pacientes de riesgo vascular sin enfermedad aterotrombótica conocida: estudio vitamin. *Rev Esp Cardiol* 2006; 59 (7):662-670
30. Puras E, Gutiérrez M, Cáncer S, Alfayate JM, de Benito L, Perera M et al. Estudio de prevalencia de la enfermedad arterial periférica y diabetes en España. *Angiología* 2008 ; 60 (5): 317-326
31. Dormandy J, Heck L, Vig S. Predicting which patients will develop chronic critical leg ischaemia. *Semin Vasc Surg* 1999; 12 : 138-141

32. Wolfe JH, Wyatt MG. Critical and subcritical ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 13: 578-582.
33. Brewster D. Reconstrucción directa de la enfermedad oclusiva aortoiliaca. En : Cronenwett JL, Gloviczki P, Johnston KW, Krupski WC, Ouriel K, Sidawy AN, editores. *Rutherford Cirugía Vascul ar* 6ª edición. Madrid: Elsevier-Saunders; 2006. cap 79 . p 1106-1136
34. Critical Limb Ischemia: Management and Outcome: Report of a national survey. The Vascular Surgical Society of Great Britain and Ireland. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1995;10:108-113
35. Adam DJ, Beard JD, Cleveland T, Bell J, Bradbury AW, Forbes JF. BASIL trial participants. Bypass versus Angioplasty in severe Ischaemia of the Leg (BASIL): Multicentre, Randomized, Controlled Trial. *Lancet* 2005; 366: 1925-1934
36. Bradbury AW. Bypass versus Angioplasty in severe ischaemia of the leg. (BASIL) trial in perspective. *J Vasc Surg* 2010; 51: 1S-4S
37. Bradbury AW, Adam DJ, Bell J, Forbes JF, Fowkes GR, Gillespie I, Ruckley CV, Raab GM, on behalf of the Basil Trial participants. Bypass versus Angioplasty in severe ischaemia of the leg ( BASIL ) trial: an intention-to-treat analysis of amputation-free and overall survival in patients randomized to a bypass surgery-first or a balloon angioplasty-first revascularization strategy. *J Vasc Surg* 2010; 51: 5S-17S
38. Antoniou G, Chalmers N, Georgiadis G, Lazarides M, Antoniou S, Serracino-Inglott F, et al. A meta-analysis of endovascular versus surgical reconstruction of femoro-popliteal arterial disease. *J Vasc Surg* 2013; 57: 242-253
39. Ihnat DM, Duong ST, Taylor ZC, Leon LR, Mills JL, Goshima KR, et al. Contemporary outcomes after superficial femoral artery angioplasty and stenting:

- the influence of TASC classification and runoff score. *J Vasc Surg* 2008; 47: 967-974
40. Mamode N, Scott RN. Tipo de injertos para la cirugía de revascularización femoropoplítea (Revisión Cochrane traducida). En: La Biblioteca Cochrane Plus, 2008 Número 4. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de The Cochrane Library, 2008 Issue 3. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.).
41. Rowlands T.E, Donnelly R. Medical Therapy for intermittent claudication. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007; 34: 314-321.
42. Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Eklom P, Kemler R, et al. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic –stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 1988; 102 (3): 471-8.
43. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med* 1971; 285: 1182.
44. Folkman J, D'Amore P.A. Blood vessel formation : what is its molecular basis ?. *Cell* 1996; 87: 1153-1155
45. Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell* 1998; 93:661-664
46. Risau W. Mechanism of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674
47. Van Oostrom MC, van Oostrom O, Quax PHA, Verhaar MC, Hoefler IE. Insights into mechanisms behind arteriogenesis: what does the future hold? *J Leukoc Biol* 2008; 84 : 1379-1391
48. Chinoy MR. Lung growth and development. *Front Biosci* 2003; 8:392-415
49. Rodriguez Quesada A, Medina Torres MA, Muñoz-Chápuli Oriol R. Angiogénesis. Edita: Consejo Social de la Universidad de Málaga. Servicio de

Publicaciones de la Universidad de Málaga. D.L.: MA-666-04 ISBN 84-9747-035-4

50. Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 12607-12613
51. Rivard A, Isner JM. Angiogenesis and vasculogenesis in treatment of cardiovascular disease. *Mol. Med.* 1998; 4: 429-444
52. Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin. Invest* 1993; 91: 2235-2243
53. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 1992; 114: 521-532
54. Folkman J, Brem H. Angiogenesis and inflammation. En: Gallin J.I, Goldstein IM, Snyderman R, Eds. *Inflammation: Basic principles and Clinical Correlates.* Raven Press, New York 1992, Pags 821-839
55. Drake C.J. Hungerford J.E. Little C.D. Morphogenesis of the first blood vessels. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1998; 857, 155-179
56. 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; 275:964-967

57. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularisation by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 1999; 18: 3964-3972
58. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearny M, et al. Ischemia and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Nat Med* 1999; 5: 434-438
59. Young MR, Kolesiak K, Wright M.A, Gabrilovich D.I. Chemoattraction of femoral CD34+ progenitor cells by tumor-derived vascular endothelial cell growth factor. *Clin. Exp. Metastasis* 1999; 17: 881-888
60. 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; 85: 221-228
61. Nomi M, Atala A, De Coppi P, Soker S. Principals of neovascularization for tissue engineering. *Mol Aspects Med* 2002; 23: 463-483
62. Oren M, Tepper BA, Galiano RD, Kalka C, Gurtner GC. Endothelial progenitor cells: The promise of vascular stem cells for Plastic Surgery. *Plast Reconstr Surg* 2003; 111: (2):846-854.
63. Collinson DJ, Donnelly R. Therapeutic angiogenesis in peripheral arterial disease: Can biotechnology produce an effective collateral circulation? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004; 28: 9-23.
64. Zammaretti P, Zisch AH. Adult endothelial progenitor cells. Renewing Vasculature. *Int J Biochem Cell Biol* 2005 ; 37 : 493-503.
65. YoshidaWB. Angiogenesis, arteriogenesis and vasculogenesis: treatment of the future for lower limb critical ischemia? *Braz Vasc J* 2005; 4: (2): 209-211

66. Mauriz JL, Linares P, González P, Culebras JM. Tratamiento Antiangiogénico del Cáncer. *Cir. Esp.* 2005; 78(1):3-11
67. Khosravi Shahi P, Del Castillo Rueda A, Pérez Manga G. Angiogénesis Neoplásica. *An. Med. Interna (Madrid)* 2008; 25:366-369.
68. Vale PR, Losordo DW, Symes JF, Isner JM. Factores de Crecimiento para la angiogénesis terapéutica en las enfermedades cardiovasculares. *Rev. Esp. Cardiol* 2001;54:1210-1224.
69. Ragalopalan S, Mohler E, Lederman RJ, Saucedo J, Mendelsohn FO, Olin J, et al. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor (VEGF) in peripheral arterial disease: Design of the RAVE trial. *Am Heart J* 2003; 145: 1114-1118
70. Baffour R, Berman J, Garb J; Rhee S, Kaufman J, Friedmann P. Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant bFGF in a rat model of acute lower limb ischaemia: dose response effect of bFGF. *J Vasc Surg* 1992; 2: 181-191.
71. Morishita R, Nakamura S, Hayashi S, Taniyama Y, Moriguchi A, Nagano T et al. Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in a rabbit hind limb ischaemia model as cytokine supplement therapy. *Hypertension* 1999; 33: 1379-1384.
72. Henry T, Annex B, McKendall G, Azrin M, Lopez J, Giordano F et al. The VIVA Trial: VEGF in ischaemia for vascular angiogenesis. *Circulation* 2003; 107: 1359-1365.
73. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, et al. Site-specific therapeutic angiogenesis after systemic administration of vascular endothelial growth factor. *J Vasc Surg* 1995; 21: 315-325.

74. Lederman R.J, Mendelsohn F, Anderson R.D, Saucedo J.F, Hermiller JB. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet* 2002; 359: 2053-2058.
75. Vale P, Isner J, Rosenfield K. Therapeutic angiogenesis in critical limb and myocardial ischaemia. *J Intervent Cardiol* 2001; 14: 511-528
76. Hedman M, Hartikainen J, Sylvanne M, Stjernvall J, Hedman A, Kivela A, et al. Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary VEGF gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischaemia: Phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation* 2003; 107: 2677-2683.
77. Akhavani MA, Sivakumar B, Paleolog E, Kang N. Angiogenesis and plastic surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2008; 61: 1425-1437
78. Isner JM, Baumgartner I, Rauh G. Treatment of thromboangiitis obliterans ( Buerger's disease ) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J Vasc Surg.* 1998; 28: 964-975.
79. Shyu KG, Chang H, Wang BW, Kuan P. Intramuscular vascular endothelial growth factor gene therapy in patients with chronic critical leg ischaemia. *Am J Med* 2003;114:85-92.
80. Ragalopalan 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 claudication. *Circulation* 2003; 108: 1933-1938.

81. Nikol S, Baumgartner I, Van Belle E, Diehm C, Visona A, Capogrossi MC. Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *Mol Ther* 2008;16:972-978
82. Van Belle E, Nikol S, Norgren L, Baumgartner I, Driver V, Hiatt WR, Belch J. Insights on the role of diabetes and geographic variation in patients with critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001; 42: 365-373.
83. Belch J, Hiatt WR, Baumgartner I, Driver IV, Nikol S, Norgren L, Van Belle E. Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: a randomized placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischemia. *Lancet* 2011; 377:1929-1937.
84. Fowkes GR, Price JF. Gene therapy for critical limb ischaemia: the TAMARIS trial. *Lancet* 2011; 377:1894-1896
85. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145.
86. Weissman IL, Baltimore D. Disappearing stem cells, disappearing science. *Science* 2001; 292: 601.
87. Flax JD, Aurora S, Yang C. Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons and express foreign genes. *Nat. Biotechnol.* 1998; 16 (11): 1033-9.
88. Kalka C, Masuda H, Takahashi T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2000; 97 (7): 3422-7.
89. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 2000; 288 (5471): 1660-3.
90. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000; 287: 1433-8.

91. To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 1997; 89 (7) :2233-58.
92. Jones PH, Watt FM. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* 1993; 73 (4): 713-24.
93. Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, Rama P, De Luca M. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol* 1999; 145 (4): 769-782
94. Bjornson C, Rietze R, Reynolds B, Magli M, Vescovi A. Turning brain into blood: A hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1999; 283: 534-537
95. Johanson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999; 96: 25-34
96. Kuhn HG, Svendsen CN. Origins, functions, and potential of adult neural stem cells. *Bioessays* 1999; 21: 625-630.
97. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147
98. Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K, Ivanova S, Streubel B, Hauser E, et al. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl)* 1999; 199 (5): 391-396
99. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-1530

100. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103 (5): 697-705
101. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170
102. Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1999; 96: 14482-14486
103. Wie L, Keogh C, Whitaker VR, Theus MH, Yu SP. Angiogenesis and Stem Cell transplantation as a potential treatments of cerebral ischemic stroke. *Pathophysiology* 2005; 12: 47-63
104. Van Royen N, Piek J, Schaper W; Fulton W. A Critical Review of Clinical Arteriogenesis Research. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55: 17-25
105. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S. Bone Marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705
106. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R. Transendocardial autologous bone marrow cell transplantation for severe chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003; 107: 2294-2302.
107. Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, et al. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial-contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003; 108 (18): 2212-2218

108. Leistner DM, Fischer-Rasokat V, Honold J, Seeger FH, Schächinger V, Lehmann R, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy. *Clin Res Cardiol* 2011; 100 (10):925-934
109. Rausher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH. Aging progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation* 2003; 108: 457-463
110. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001. 103: 2885-90.
111. Simons M. Angiogenesis. Where do we stand now? *Circulation* 2005; 111: 1556-1566
112. Yang Z, von Ballmoos MW, Diehm N, Baumgartner I, Kalka C, Di Santo S. Call for a reference model of chronic hind limb ischemia to investigate therapeutic angiogenesis. *Vascul Pharmacol* 2009; 51:268-274
113. Asahara T, Kalka C, Isner JM. Stem Cell Therapy and Gene Transfer for regeneration. *Gene Ther* 2000; 7: 451-457
114. Yuyama ET, 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 randomized controlled trial. *Lancet* 2002. 360: 427-435
115. Matoba S, Tatsumi T, Murohara T. Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells ( Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial ) in patients with chronic limb ischemia. *Am Heart J* 2008; 156: 1010-1018

- 116.Kawamura A, Horie T, Tsuda I. Prevention of limb amputation in patients with limbs ulcers by autologous peripheral blood mononuclear cell implantation. *Ther Apher Dial* 2005; 9: 59-63
- 117.Huang PP, Li SZ, Han MZ. Autologous transplantation of peripheral blood stem cells as an effective therapeutic approach for severe arteriosclerosis obliterans of lower extremities. *Thromb Haesmost.* 2004; 91: 606-609
- 118.Durdu S, Akar AR, Arat M, Sancak T, Eren NT, Ozyurda U. Autologous Bone-marrow mononuclear cell implantation for patients with Rutherford grade II-III Thromboangiitis obliterans. *J Vasc Surg* 2006; 44:732-739
- 119.Kawamura A, Horie T, Tsuda I, Abe Y, Yamada M, Egawa H. Clinical study of therapeutic angiogenesis by autologous peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation in 92 patients with critically ischemic limbs. *J Artif Organs* 2006; 9 (4): 226-233
- 120.Debin L, Youzhao J, Ziwen L, Xiaoyan L, Zhonghui Z, Bing C. Autologous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on diabetic patients with lower limb ischemia. *Journal of Medical Colleges of PLA* 2008; 23: 106–115
- 121.Eton D, Yu H. Enhanced cell therapy strategy to treat chronic limb-threatening ischemia. *J Vasc Surg* 2010;52:199-204
- 122.Huang P, Li S, Han M. Autologous Transplantation of Granulocyte Colony–Stimulating Factor–Mobilized Peripheral Blood Mononuclear Cells Improves Critical Limb Ischemia in Diabetes. *Diabetes Care* 2005;28: 2155-2160.
- 123.Murohara T. Therapeutic angiogenesis: cellular approach from bone marrow, cord blood and peripheral blood. *International Congress Series* 2004: 1262; 332–338.

124. Nagai K, Matsumaru I, Fukushima T, Miyazaki T, Yamaguchi H, Kamihira S, et al. Therapeutic angiogenesis by autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells for peripheral artery disease. *International Congress Series* 2007; 1299: 203–209.
125. Oda M, Toba K, Ozawa T, Kato K, Yanagawa T, Ikarashi N, et al. Establishment of culturing system for ex-vivo expansion of angiogenic immature erythroid cells, and its application for treatment of patients with chronic severe lower limb ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 49: 347–353
126. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; 89 (1): 1-7
127. Comerota AJ, Link A, Douville J, Burchardt ER. Upper extremity ischemia treated with tissue repair cells from adult bone marrow. *J Vasc Surg* 2010;52:723-9.
128. Sprengers RW, Moll FL, Teraa M, Verhaar MC; JUVENTAS study Group. Rationale and design of the JUVENTAS trial for repeated intra-arterial infusion of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg* 2010; 51: 1564-1568
129. Teraa M, Sprengers RW, Westerweel PE, Gremmels H, Goumans MJ, Teerlink T, Moll FL, Verhaar MC; JUVENTAS Study Group. Bone Marrow alterations and low endothelial progenitor cell numbers in critical limb ischemia patients. *PLoS One*. 2013;8(1):e55592. doi: 10.1371/journal.pone.0055592.
130. Teraa M, Fledderus JO, Rozbeh RI, Leguit RJ, Verhaar MC; **Juventas** Study Group. Bone marrow microvascular and neuropathic alterations in patients with critical limb ischemia. *Circ Res* 2014; 114(2): 311-314

- 131.Powell RJ, Comerota AJ, Berceli SA, Guzman R, Henry TD, Tzeng E, et al. Interim analysis results from the RESTORE-CLI, a randomized, double-blind multicenter phase II trial comparing expanded autologous bone marrow-derived tissue repair cells and placebo in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg* 2011; 54: 1032-1041
- 132.Powell RJ, Marston WA, Berceli SA, Guzman R, Henry TD, Longcore AM, et al. Cellular Therapy with Ixmyelo-T to treat Critical Limb Ischemia: the randomized, double-blind, placebo-controlled RESTORE-CLI trial. *Mol Ther* 2012; 20(6): 1280-1286
- 133.Teraa M, Sprengers RW, van der Graff Y, Peters CE, Moll FL, Verhaar MC. Autologous Bone-Marrow derived cell therapy in patients with critical limb ischemia: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Ann Surg* 2013; 258(6):922-929
- 134.Benoit E, O'Donnell TF, Patel AN. Safety and Efficacy of autologous cell therapy in critical limb ischemia: a systematic review. *Cell Transplant* 2013; 22 (3): 545-562
- 135.Shimamura M, Nakagami H, Koriyama H, Morishita R. Gen therapy and cell-based therapies for therapeutic angiogenesis in peripheral arterial disease. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 186215 doi:10.1155/2013/186215
- 136.Furmston J, Patel A, Ludwinski F, Zuzel V, Bajwa A, Saha P, et al. Angiogenic cell therapy for critical limb ischaemia: an update on concepts and trials. *J Cardiovasc Surg* 2014; 55 (5): 641-654
- 137.Schatteman G. Adult Bone Marrow-Derived Hemangioblasts, Endotelial Cell Progenitors, and EPCs. *Curr Top Dev Biol* 2004; 64: 141-180.

138. Weissman IL. Stem Cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000; 100:157-168
139. Dormer P, Ucci G. Pluripotent stem cells do not completely maintain normal human steady-state haemopoiesis. *Cell Tissue Kinet* 1984; 17:367-374
140. Takano H, Ema H, Sudo K, Nakauchi H. Asymmetric division and lineage commitment at the level of haematopoietic stem cells: inference from differentiation in daughter cell and granddaughter cell pairs. *J Exp Med* 2004; 199:295-302.
141. Hueper HC, Russell MA. Capillary-like formations in tissue culture of leukocytes. *Arch Exp Zellforsch* 1932; 12: 407-424.
142. White GC, Parshley MS. Growth of in vitro blood vessels from bone marrow of adult chickens. *Am J Anat* 1950; 89: 321-345.
143. Scott SM, Barth MG, Gaddy LR, Ahl ET. The role of circulating cells in the healing of vascular prostheses. *J Vasc Surg* 1994; 19: 584-593
144. Shi Q, Wu M, Hayashida N, Wechezak AR, Clowes AW, Sauvage LR. Proof of fallout endothelialization of impervious Dacron grafts in the aorta and inferior vena cava of the dog. *J Vasc Surg* 1994; 20: 546-556
145. González León L. Transferencia Génica a Progenitores Hematopoyéticos caninos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Dpto de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid 2005. ISBN:84-669-2850-2
146. 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 Trans Med* 2012; 1: 403-408

147. Fernandez-Pujol B, Lucibello FC, Gehling UM, Lindemann K, Weidner N, Zuzarte ML, et al. Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation* 2000; 65: 287-300
148. Fernandez-Pujol B, Lucibello FC, Zuzarte ML, Lutjens P, Muller R, Havemann K. Dendritic cells derived from peripheral monocytes express endothelial markers and in the presence of angiogenic growth factors differentiate into endothelial-like cells. *Eur J Cell Biol* 2001; 80: 99-110
149. Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, Hartley RS, Schatteman GC. CD34 (-) blood-derived human endothelial cell progenitors. *Stem Cells* 2001; 19: 304-312
150. Schmeisser A, Garlicks CD, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, et al. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 671-680
151. Schmeisser A, Strasser RH. Phenotypic overlap between hematopoietic cells with suggested angioblastic potential and vascular endothelial cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2002 ; 11: 69-79
152. Fujiyama S, Amano K, Uehira K, Yoshida M, Nishiwaki Y, Nozawa Y, et al. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res.* 2003; 93( 10): 980-9
153. Nakul-Aquarone D, Bayle J, Frelin C. Coexpression of endothelial markers and CD14 by cytokine mobilized CD34+ cells under angiogenic stimulation. *Cardiovasc Res.* 2003; 57: 816-823

- 154.Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003; 107: 1164-1169
- 155.Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* 2003; 108: 2511-2516
- 156.Zhao Y, Glesne D, Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2003; 100: 2426-2431
- 157.Krenning G, van Luyn MJA, Harmsen M. Endothelial progenitor cell-based neovascularization: implications for therapy. *Trends Mol Med* 2009; 15(4): 180-9
- 158.Magri D, Vasilas P, Muto A, Fitzgerald TN, Fancher TT, Feinstein AJ, et al. Elevated Monocytes in Patients with Critical Limb Ischemia Diminish after Bypass Surgery . *J Surg Res* 2011; 167: 140-150
- 159.Tongers J, Roncalli J, Losordo D. Role of Endothelial Progenitor Cells during ischemia- induced vasculogenesis and collateral formation. *Microvasc Res* 2010; 79: 200-206
- 160.Sprengers R, Moll F, Verhaar Y. Stem Cell Therapy in PAD. *Eur. J Vasc Endovasc Surg* 2010; 39: s38-s43
- 161.Sepúlveda P, Martínez-León J, García-Verdugo JM. Neoangiogenesis with endothelial precursors for the treatment of ischemia. *Transplant Proc* 2007; 39: 2089-2094
- 162.Mukalla N, Akahoria T, Komakid M, Lia Q, Kanayasu-Toyodae T, Ishii-Watabee A, et al. A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp Cell Res* 2008; 314: 430-440

- 163.Sen S, McDonald SP, Coates PT, Bonder CS. Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)* 2011; 120:263-283
- 164.Du F, Zhou J, Gong R, Huang X, Pansuria M, Virtue A, et al. Endothelial progenitor cells in atherosclerosis. *Front Biosci* 2012; 17:2327-2349
- 165.Dignat-George F, Sampol J, Lip G, Blann AD. Circulating Endothelial Cells: realities and promises in vascular disorders. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33:495-499
- 166.Chen MC, Chen CJ, Yang CH, Liu WH, Fang CY, Hsieh YK. Relationship of the percentage of circulating endothelial progenitor cell to the severity of coronary artery disease. *Heart Vessels* 2008; 23:47-52
- 167.Aicher A, Zeiher A, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension* 2005; 45: 321-325
- 168.Schattman GC, Dunnwald M, Jiao C. Biology of bone marrow derived endothelial cell precursors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292:1-18
- 169.Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H, et al. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* 2006; 133:1543-1551
- 170.Aicher A, Rentsch M, Sasaki K, Ellwart JW, Fandrich F, Siebert R, et al. Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia. *Circ Res* 2007; 100:581-589
- 171.Romagnani P, Annunziato F, Liotta F, Lazzeri E, Mazzinghi B, Frosali F, et al. CD14<sup>+</sup>CD34<sup>low</sup> cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating endothelial progenitors. *Circ Res* 2005; 97:314-322

172. Stellos K, Gawaz M. Platelets and stromal cell-derived factor-1 in progenitor cell recruitment. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33: 159-164.
173. Stellos K, Langer H, Daub K, Schoenberger T, Gauss A, Geisler T, et al. Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells. *Circulation* 2008; 117:206-215
174. Kamihata H, Matsubara H, Nishine T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 2001; 104: 1046-1052
175. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003; 102:1340-1346
176. Honold J, Lehmann R, Heeschen C, Walter DH, Assmus B, Sasaki K, et al. Effects of granulocyte colony stimulating factor on functional activities of endothelial progenitor cells in patients with chronic ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2238-2243
177. Ishizawa K, Kubo H, Yamada M, Kobayashi S, Suzuki T, Mizuno S, et al. Hepatocyte growth factor induces angiogenesis in injured lungs through mobilizing endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324; 276-280
178. Huang P, Chen YH, Wang CH, Chen JS, Tsai HY, Lin FY, et al. Matrix metalloproteinase-9 is essential for ischemia-induced neovascularization by modulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 1179-1184

179. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* 2004; 103: 921-926
180. Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, Hanley A, Kearney M, Aikawa R, et al. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation* 2003; 108: 3115-3121
181. Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, Sasaki K, Kaiser R, El Makhfi N, et al. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med* 2005;201:63-72
182. Chavakis E, Hain A, Vinci M, Carmona G, Bianchi ME, Vajkoczy P, et al. High-mobility group box 1 activates integrin-dependent homing of endothelial progenitor cells. *Circ Res* 2007; 100: 204-212
183. Li Calzi S, Neu MB, Shaw LC, Kielazewski JL, Moldovan NI, Grant MB. EPC and pathological angiogenesis: when good cells go bad. *Microvasc Res* 2010;79:207-216
184. Xu Q. The impact of progenitor cells in atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; 3: 94-101
185. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348: 593-600
186. Tso C, Martinic G, Fan WH, Rogers C, Rye KA, Barter PJ. High-density lipoproteins enhance progenitor-mediated endothelium repair in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1144-1149

187. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005; 353: 999-1007.
188. Tie G, Yan J, Yang Y, Park BD, Messina JA, Raffai RL, et al. Oxidized low-density-lipoprotein induces apoptosis in endothelial progenitor cells by inactivating the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *J Vasc Res* 2010; 47:519-530
189. Jan M, Meng S, Chen NC, Mai J, Wang H, Yang XF. Inflammatory and autoimmune reactions in atherosclerosis and vaccine design informatics. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 459798 doi: 10.1155/2010/459798
190. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu Rev Immunol* 2009;27:165-197
191. Ma FX, Zhou B, Chen Z, Ren Q, Lu SH, Sawamura T, Han ZC. Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cells by regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Lipid Res* 2006; 47:1227-1237
192. Di Santo S, Diehm N, Ortmann J, Volzmann J, Yang Z, Keo HH, et al. Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cell function by downregulation of E-selectin and integrin alpha(v)beta5. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373:528-532
193. Carracedo J, Merino A, Briceno C, Soriano S, Buendia P, Calleros L, et al. Carbamylated low-density lipoprotein induces oxidative stress and accelerated senescence in human endothelial progenitor cells. *Faseb J* 2011; 25:1314-1322
194. Tang D, Lu J, Walterscheid JP, Chen HH, Engler DA, Sawamura T, et al. Electronegative LDL circulating in smokers impairs endothelial progenitor cell

- differentiation by inhibiting Akt phosphorylation via LOX-1. *J Lipid Res* 2008;49:33-47
195. Whalberg E. Angiogenesis and arteriogenesis in limb ischemia. *J Vasc Surg* 2003; 38: 198-203.
196. McGrath J, McDonald JK. Nicotina transdérmica para la inducción de la remisión en la colitis ulcerosa. ( Revisión Cochrane traducida ). En: La Biblioteca Cochrane Plus, 2008 Número 4. Oxford: Update Software Ltd.
197. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, et al. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 2004; 24: 1442-1447
198. Shankar K, Vaidya VS, Wang T, Bucci TJ, Mehendale HM. Streptozotocin-induced diabetic mice are resistant to lethal effects of thioacetamide hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;188: 122-34.
199. Gallagher KA, Goldstein L J, Thom SR, Velazquez OC. Hyperbaric oxygen and bone marrow-derived endothelial progenitor cells in diabetic wound healing. *Vascular* 2006; 14: 328-37.
200. Velázquez O. Angiogenesis and vasculogenesis: Inducing the growth of new blood vessels and wound healing by stimulation of bone marrow-derived progenitor cell mobilization and homing. *J Vasc Surg* 2007; 45: 37A-47A
201. Fadini GP, Boscaro E, de Kreutzenberg S, Agostini C, Seeger F, Dimmeler S, et al. Time Course and Mechanisms of Circulating Progenitor Cell Reduction in the Natural History of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2010; 33:1097-1102
202. Fadini GP, Agostini C, Sartore S, Avogaro A. Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2007; 194: 46–54

203. Napoli C, Hayashi T, Cacciatore F, Casamassimi A, Casini C, Al-Omran M, Ignarro L. Endothelial progenitor cells as therapeutic agents in the microcirculation: An update. *Atherosclerosis* 2011; 215: 9-22.
204. Zaruba MM, Franz WM. Role of the SDF-1 $\alpha$ -CXCR-4 axis in stem cell-based therapies for ischemic cardiomyopathy. *Expert Opin Biol Ther* 2010; 10: 321-335
205. Lan TT, Wang D. Stromal cell Derived Factor-1 (SDF – 1): homing factor for engineered regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther* 2011; 11: 189-197.
206. Fadini GP, Boscaro E, Albiero M, Menegazzo L, Frison V, de Kreutzenberg S, et al. The oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin increases circulating endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes: possible role of stromal-derived factor 1-alpha. *Diabetes Care* 2010; 33: 1607-1609.
207. Imanishi T, Moriwaki C, Hano T, Nishio I. Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension. *J Hypertens* 2005;23:1831– 7.
208. Fadini GP, Coracina A, Baesso I. Peripheral blood CD34+KDR+ endothelial progenitor cells are determinants of sub- clinical atherosclerosis in a middle-aged general population. *Stroke* 2006;37:2277–2282.
209. Bahlmann FH, de Groot K, Mueller O. Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists. *Hypertension* 2005;45:526–529
210. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens* 2005;23:97–104.

211. Marumo T, Uchimura H, Hayashi M, Hishikawa K, Fujita T. Aldosterone impairs bone marrow-derived progenitor cell formation. *Hypertension* 2006;48:490–496
212. Salvatore P, Casamassimi A, Sommese L, Fiorito C, Ciccodicola A, Rosiello R, et al. Detrimental effects of *Bartonella henselae* are counteracted by L-arginine and nitric oxide in human endothelial progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 9427-9432.
213. Devin JK, Young PP. The effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 on the aging cardiovascular system and its progenitor cells. *Curr Opin Investig Drugs* 2008; 9: 983-992.
214. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002; 109: 625-637.
215. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM & Dimmeler S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 2003; 9: 1370-1376.
216. Maeng YS, Choi HJ, Kwon JY, Park YW, Choi KS, Min JK, et al. Endothelial progenitor cell homing: prominent role of the IGF2-IGF2R-PLC $\beta$ 2 axis. *Blood* 2009; 113: 233-243
217. Di Bernardo G, Galderisi U, Fiorito C, Squillaro T, Cito L, Cipollaro M, et al. Dual role of parathyroid hormone in endothelial progenitor cells and marrow stromal mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 2010; 222: 474-480
218. Pagliarulo C, Salvatore P, Napoli C. Targeting vascular niche by parathyroid hormone. *Curr Med Chem.* 2008;15: 2984-2990.

219. Alaiti MA, Ishikawa M, Costa MA. Bone Marrow and circulating stem/progenitor cells for regenerative Cardiovascular Therapy. *Transl Res* 2010; 156: 112-129.
220. Walter DH, Rittig K, Bahlman FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002; 105: 3017-3024.
221. Shantsila E, Watson T, Lip GY. Statins and inflammation: Reciprocal effectors to endothelial progenitors? *Thromb Res* 2008; 123, 1-4
222. Hristov M, Fach C, Becker C, Heussen N, Liehn EA, Blindt R, et al. Reduced numbers of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease associated with long-term statin treatment. *Atherosclerosis* 2007; 192: 413-420.
223. Endres M, Laufs V. Effect of statins on endothelium and signalling mechanisms. *Stroke* 2004; 35: 2708-2011
224. Heart Protection Study Collaborative Group. Heart protection study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomized placebo controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 7-22
225. Arnaud C, Burger F, Steffens S, Veillard NR, Nguyen TH, Trono D, et al. Statins reduce interleukin-6-induced C-reactive protein in human hepatocytes. New evidence for direct anti-inflammatory effects of statins. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2005; 25: 1231-1236.
226. Veillard NR, Braunersreuther V, Arnaud C, Burger F, Pelli G, Steffens S, Mach F. Simvastatin modulates chemokine and chemokine receptor expression by

- geranylgeranyl isoprenoid pathway in human endothelial cells and macrophages. *Atherosclerosis* 2006; 188: 51-58.
- 227.Lara Hernández R, Lozano Vilardell P, Cordobés Gual J. Nuevos tratamientos de la enfermedad arterial oclusiva no revascularizable: angiogenia terapéutica. *Med Clin ( Barc )* 2008; 131; 665-669
- 228.Fujii H, Li SH, Szmitko PE, Fedak PW, Verma S. C-Reactive Protein alters antioxidant defenses and promotes apoptosis in endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:2476-2482
- 229.Devanesan AJ, Laughlan AK, Girn HRS, Homer-Vanniasinkam S. Endothelial Progenitor Cells as a Therapeutic Option in Peripheral Arterial Disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009; 38, 475-481.
- 230.Lara Hernández R, Lozano Vilardell P, Blanes P, Torreguitart N, Galmés N, Besalduch J. Safety and efficacy of therapeutic angiogenesis as a novel treatment in patients with critical limb ischemia. *Ann Vasc Surg* 2010; 24(2); 287-294
- 231.Varu V, Melissa EH, Melina RK. Critical Limb Ischemia. *J Vasc Surg* 2010; 51:230-241
- 232.Fadini G, Agostini C, Avogaro A. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease. Meta-analysis and systematic review of the literature. *Atherosclerosis* 2010; 209: 10-17
- 233.Wang ZW, Li D, Cao JX, Liu YS, Wang M, Zhang XY, et al. Efficacy of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Therapy in patients with peripheral arterial disease. *J Atheroscler Thromb* 2014; 21(11): 1183-96
- 234.Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7: 211-228

235. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007; 100: 1249-1260
236. 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; 20: 867-876
237. Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Tan J, Fishbein MC, Chen Ps, Marck KL. IFATS collection: human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction in conjunction with potent preservation of cardiac function. *Stem cells* 2009; 27: 230-237
238. Amos PJ, Shang H, Bailey AM, Taylor A, Katz AJ, Peirce SM. IFATS collection: the role of human adipose-derived stromal cells in inflammatory microvascular remodeling and evidence of a perivascular phenotype. *Stem cells* 2008; 26: 2682-2690
239. Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, et al. BH, March KL. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res* 2008; 102: 77-85
240. Lee HC, An SG, Lee HW, Park JS, 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; 76: 1750-1760
241. Bura A, Planat-Benard V, Bourin P, Silvestre JS, Gross F, Grollean JL, 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* 2014; 16: 245-257

- 242.Chavakis E, Urbich C, Dimmeler S. Homing and engraftment of progenitor cells: a prerequisite for cell therapy. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45:514-522
- 243.Raval Z, Losordo DW. Cell therapy of peripheral arterial disease: from experimental findings to clinical trials. *Circ Res* 2013; 112(9): 1288-1302
- 244.Walter DH, Krankenberg H, Balzer JO, Kalka C, Baumgartner I, Schlüter M, Tonn T, Seeger F, Dimmeler S, Lindhoff-Last E, Zeiher AM, and the PROVASA investigators. Intrarterial administration of bone marrow mononuclear cells in patients with critical limb ischemia: a randomized-start, placebo-controlled pilot trial ( PROVASA ). *Circ Cardiovasc Interv* 2011; 4: 26-37
- 245.Lawall H, Bramlage P, Amann B. Treatment of peripheral arterial disease using stem and progenitor cell therapy. *J Vasc Surg* 2011; 53: 445-453
- 246.Huang PP, Yang XF, Li SZ, Wen JC, Zhang Y, Han ZC. Randomised comparison of G-CSF mobilized peripheral blood mononuclear cells versus bone marrow-mononuclear cells for the treatment of patients with lower limb arteriosclerosis obliterans. *Thromb Haemost* 2007; 98 (6): 1335-1342
- 247.Ouma GO, Zafir B, Mohler III ER, Flugelman MY. Therapeutic angiogenesis in Critical Limb Ischemia. *Angiology* 2013; 64(6): 466-480.
- 248.Gutierrez-Aguirre CH, Salazar-Rojas R, Cantu-Rodriguez O, González-Llano O, Ríos-Solís JE, Gómez-Almaguer D. Eficacia y seguridad en la recolección de células hematopoyéticas de sangre periférica en donadores pediátricos utilizando catéter central. *Rev Hematol Mex* 2013; 14(4):173-177
- 249.Moog R. Apheresis techniques for collection of peripheral blood progenitor cells. *Transfusion and apheresis science*. *Transfus Apher Sci* 2004;31:207-220
- 250.Rinaldi C, Savignano C, Pasca S, Sperotto A, Patriarca F, Isola M, et al. Efficacy and safety of peripheral blood stem cell mobilization and collection: a

- single-center experience in 190 allogeneic donors. *Transfusion* 2012; 52: 2387-2394.
251. Baldomero H, Gratwohl M, Gratwohl A, Tichelli A, Niederwieser D, Madrigal A, Frauendorfer K; European Group for Blood and Marrow Transplantation . The EBMT activity survey 2009: trends over the past 5 years. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:485-501.
252. Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos. 2013. Memoria de Actividad. ONT 2013. <http://www.ont.es/infesp/Memorias/memoria%20tph%202013.pdf>
253. Arai M, Misao Y, Nagai H, Kawasaki M, Nagashima K, Suzuki K, et al. Granulocyte colony-stimulating factor: a noninvasive regeneration therapy for treating atherosclerotic peripheral artery disease. *Circ J* 2006; 70(9): 1093-1098.
254. Körbling M, Freireich EJ. Twenty -five years of peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2011; 117: 6411-6416.
255. Dreger P, Haferlach T, Eckstein V, Jacobs S, Suttorp M, Löffler H, et al. G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation:safety, kinetics of mobilization, and composition of the graft. *Br J Haematol* 1994; 87:609-613.
256. Takashi 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; 5: 434-438.
257. Lane TA, Law P, Maruyama M, Young D, Burgess J, Mullen M, et al. Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation. *Blood*. 1995; 85(1):275-282

258. Shah QA, Tan X, Bi S, Liu X, Hu S. Differential characteristics and in vitro angiogenesis of bone marrow- and peripheral blood-derived endothelial progenitor cells: evidence from avian species. *Cell Prolif.* 2014;47(4):290-298. doi: 10.1111/cpr.12111.
259. Socinski MA, Cannistra SA, Elias A, Antman KH, Schnipper L, Griffin JD. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet.* 1988;1(8596):1194-1198.
260. Duhrsen U, Villeval JL, Boyd J, Kannourakis G, Morstyn G, Metcalf D. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood.* 1988;72(6):2074-2081.
261. Welte K, Gabrilove J, Bronchud MH, Platzer E, Morstyn G. Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood.* 1996;88(6):1907-1929.
262. Anderlini P, Rizzo JD, Nugent ML, Schmitz N, Champlin RE, Horowitz MM; IBMTR Statistical Center of the International Bone Marrow Transplant Registry, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA; EBMT, Kiel, Germany. Peripheral blood stem cell donation: an analysis from the International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) and European Group for Blood and Marrow Transplant (EBMT) databases. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27(7):689-692.
263. McCullough J, Kahn J, Adamson J, Anderlini P, Benjamin R, Confer D, et al. Hematopoietic growth factors-use in normal blood and stem cell donors: clinical and ethical issues. *Transfusion.* 2008;48(9):2008-2025.

264. Ishida A, Ohya Y, Sakuda H, Ohshiro K, Higashiuesato Y, Nakaema M, et al. Autologous Peripheral Blood Mononuclear cell implantation for patients with peripheral arterial disease improves limb ischemia. *Circ J* 2005;69:1260-1265
265. Kawachi Y, Watanabe A, Uchida T, Yoshizawa K, Kurooka N, Setsu K. Acute arterial thrombosis due to platelet aggregation in a patient receiving granulocyte colony-stimulating factor. *Br J Haematol* 1996; 94:413-416
266. Hill JM, Syed MA, Arai AE, Powell TM, Paul JD, Zalos G, et al. Outcomes and risks of granulocyte colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 1643-1648
267. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004; 363: 751-756
268. Ting A, Mays R, Frey M, Van't Hof W, Medicetty S, Dean R. Therapeutic pathways of adult stem cell repair. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 65:81-93
269. Schabitz WR, Kollmar R, Schwaninger M, Juetter E, Bardutzky J, Schölzke MN, et al. Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke* 2003; 34:745-751
270. Bratane BT, Bouley J, Schneider A, Bastan B, Henninger N, Fisher M. G-CSF delays PWI/DWI mismatch evolution and infarct volume in permanent suture and embolic focal cerebral ischemia models in the rat. *Stroke* 2009; 40(9): 3102-3106
271. Van Royen N, Schirmer SH, Ataserver B, Behrens CY, 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; 112 (7):1040-1046.
- 272.Kang HJ, Kim MK, Lee HY, Park KW, Lee W, Cho YS, et al. Five-year results of intracoronary infusion of the mobilized peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor in patients with myocardial infarction. *Eur Heart J* 2012; 33:3062-3069
- 273.Khan SS, Solomon MA, McCoy JP. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2005; 64(1): 1-8
- 274.Fadini GP, Baesso I, Albiero M, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau. *Atherosclerosis* 2008; 197: 496-503
- 275.Franco A. Dilemas éticos sobre el uso de placebo en investigación terapéutica. *Rev Colomb Psiquiatr* 2003; 23(1): 93-107.  
Disponible: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-74502003000100007&lng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74502003000100007&lng=es).
- 276.De Deyn PP, D'Hooge R. Placebos in clinical practice and research. *J Med Ethics* 1996; 22(3): 140-146
- 277.Beauchamp T, Childress J. *Principios de Ética Biomédica*. Barcelona. Masson: 1999
278. Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. World Medical Association Annotated draft for public consultation 2014.

Disponible <http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/index.html>

(consultado el 13 de octubre de 2014 )

279. Salas SP, Russo NM. Analysis of the main ethical conflicts in the 2008 declaration of Helsinki and the proposed changes in the new version. *Rev méd Chile*. 2014;142(4):475-480

Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872014000400009&lng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872014000400009&lng=es). <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872014000400009>.

280. Vandana R, Tushar R. Placebos: current status. *Indian J Pharmacol* 2001; 33: 396-409

281. Turner JA, Deyo RA, Loeser JD, Von Korff M, Fordyce WE. The importance of placebo effects in pain treatment and research. *JAMA* 1994; 271:1609-1614

282. Lyons DJ. Use and abuse of placebo in clinical trials. *Drug Information Journal* 1999; 33:261-264 doi:10.1177/009286159903300129 Disponible en: <http://dij.sagepub.com/content/33/1.toc>

283. Suárez C, Lozano FS, coordinadores, Bellmunt S, Camafort M, Díaz S, Mancera J, Carrasco E, Lobos JM. Documento de consenso multidisciplinar en torno a la enfermedad arterial periférica. 1.a ed. Madrid: Luzán 5, S.A. 2012. pág 26

284. Owens C, Ho KJ, Kim S, Schanzer A, Lin J, Matros E, et al. Refinement of survival prediction in patients undergoing lower extremity bypass surgery: Stratification by chronic kidney disease classification. *J Vasc Surg* 2007; 45: 944-952.

285. Lep nt alo M, M t zke S. Outcome of unreconstructed chronic critical leg ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996;11:153-7.

286. Benoit E, O'Donnell TF Jr, Kitsios GD, Iafrati MD. Improved amputation-free survival in unreconstructable critical limb ischemia and its implications for clinical trial design and quality measurement. *J Vasc Surg* 2012;55:781-789
287. Martínez O, Castrillón VA. Diabetes Mellitus, factor de riesgo de severidad de enfermedad isquémica crítica arteriosclerótica y de viabilidad de miembros inferiores. *Acta Med Colomb* 2010;35:40-47 Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-24482010000200002&lng=pt](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-24482010000200002&lng=pt)
288. van Ark J, Moser J, Lexis CPH, Bekkema F, Pop I, van der Horst IC, et al. Type 2 diabetes mellitus is associated with an imbalance in circulating endothelial and smooth muscle progenitor cell numbers. *Diabetologia* 2012; 55: 2501–2512.
289. Nowak WN, Borys S, Kusińska K, Bukowska-Strakova K, Witek P, Koblik T, et al. Number of circulating pro-angiogenic cells, growth factor and anti-oxidative gene profiles might be altered in type 2 diabetes with and without diabetic foot syndrome. *J Diabetes Investig* 2014; 5: 99–107
290. Jarajapu YP, Caballero S, Verma A, Nakagawa T, Lo MC, Li Q, Grant MB. Blockade of NADPH Oxidase Restores Vasoreparative Function in Diabetic CD34+ Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52: 5098–5104.
291. Caballero S, Sengupta N, Afzal A, Chang KH, Li Calzi S, Guberski DL, et al. Ischemic vascular damage can be repaired by healthy, but not diabetic, endothelial progenitor cells. *Diabetes* 2007; 56: 960–967
292. 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; 106: 2781–2786.

293. Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, Hartley RS, Schatteman GC. CD34- blood-derived human endothelial cell progenitors. *Stem Cells* 2001; 19: 304–312.
294. Awad O, Dedkov EI, Jiao C, Bloomer S, Tomanek RJ, Schatteman GC. Differential healing activities of CD34+ and CD14+ endothelial cell progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 758–764.
295. Ramos AL, Darabi R, Akbarloo N, Borges L, Catanese J, Dineen SP, et al. Clonal analysis reveals a common progenitor for endothelial, myeloid, and lymphoid precursors in umbilical cord blood. *Circ Res* 2010; 107: 1460–1469.
296. Krenning G, van der Strate BW, Schipper M, van Seijen XJ, Fernandes BC, van Luyn MJ, Harmsen MC. CD34+ cells augment endothelial cell differentiation of CD14+ endothelial progenitor cells in vitro. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 2521–2533.
297. He T, Lu T, d’Uscio LV, Lam CF, Lee HC, Katusic ZS. Angiogenic function of prostacyclin biosynthesis in human endothelial progenitor cells. *Circ Res* 2008; 103: 80–88.
298. Jarajapu YPR, Hazra S, Segal M, Li Calzi S, Jhadoo C, Qian K, et al. Vasoreparative Dysfunction of CD34+ Cells in Diabetic Individuals Involves Hypoxic Desensitization and Impaired Autocrine/Paracrine Mechanisms. *PLoS ONE* 2014; 9(4): e93965. doi:10.1371/journal.pone.0093965
299. Martín-Ramírez J, Hofman M, van den Biggelaar M, Hebbel RP, Voorberg J. Establishment of outgrowth endothelial cells from peripheral blood. *Nat Protoc* 2012; 7: 1709–1715.
300. Zhu G, Huang L, Song M, Yu Z, Wu X, Zhao X, et al. Over-expression of hepatocyte growth factor in smooth muscle cells regulates endothelial progenitor cells differentiation, migration and proliferation. *Int J Cardiol* 2010; 138: 70–80.

301. Eguchi M, Masuda H, Kwon S, Shirakura K, Shizuno T, Ito R, et al. Lesion targeted thrombopoietin potentiates vasculogenesis by enhancing motility and enlivenment of transplanted endothelial progenitor cells via activation of Akt/mTOR/p70S6kinase signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45: 661–669.
302. Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes* 2005; 54 Suppl 2: S114–s124.
303. Brock M, Trenkmann M, Gay RE, Michel BA, Gay S, Fischler M, et al. Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type II through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway. *Circ Res* 2009; 104: 1184–1191.
304. Dubsy M, Jirkovska A, Bem R, Fejfarova V, Varga JM, Kolesar L, Pagacova L, Sykova E, Jude EB. Role of serum levels of angiogenic cytokines in assessment of angiogenesis after stem cell therapy of diabetic patients with critical limb ischemia. *Cell Transplant* 2014; 23(12): 1517-23
305. Hernández-Lahoz I, Paz-Esquete J, Vázquez-Lago JM, García-Casas R. Calidad de vida en pacientes revascularizados por isquemia crítica de miembros inferiores. *Angiología* 2010; 62(2): 51-57
306. Allen J, Overbeck K, Nath AF, Murray A, Stansby G. A prospective comparison of bilateral photoplethysmography versus the ankle-brachial pressure index for detecting and quantifying lower limb peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 2008; 47: 794-802
307. Takeshita S, Isshiki T, Mori H, Tanaka E, Eto K, Miyazawa Y, et al. Use of synchrotron radiation microangiography to assess development of small collateral arteries in a rat model of hindlimb ischemia. *Circulation*. 1997; 95(4):805-808

- 308.Faber JE, Chilian WM, Deindl E, van Royen N, Simons M. A brief etymology of the collateral circulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34(9):1854-1859.
- 309.Pomposelli F. Arterial imaging in patients with lower extremity ischemia and diabetes mellitus. *J Vasc Surg* 2010;52:81S-91S.
- 310.Chan D, Anderson ME, Dolmatch BL.Imaging evaluation of lower extremity infrainguinal disease: role of the noninvasive vascular laboratory, computed tomography angiography, and magnetic resonance angiography. *Tech Vasc Interv Radiol* 2010 Mar;13(1):11-22
- 311.Fleischmann D, Hallett RL, Rubin GD. CT angiography of peripheral arterial disease. *J Vasc Interv Radiol* 2006;17:3-26.
- 312.Saab G, Abu-Alfa A. Nephrogenic systemic fibrosis–implications for nephrologists. *Eur J Radiol* 2008; 66: 208-12.
- 313.BroomeDR. Nephrogenic systemic fibrosis associated with gadolinium based contrast agents: a summary of the medical literature reporting. *Eur J Radiol* 2008; 66: 230-4.
- 314.Dobrucki LW, Tsutsumi Y, Kalinowski L, Dean J, Gavin M, Sen S, et al. Analysis of angiogenesis induced by local IGF-1 expression after myocardial infarction using microSPECT-CT imaging. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48(6): 1071-9
- 315.Stacy MR, Maxfield MW, Sinusas AJ. Targeted Molecular Imaging of Angiogenesis in PET and SPECT: A Review. *Yale J Biol Med.* 2012; 85: 75-86
- 316.Dobrucki LW, de Muinck E, Lindner J, Sinusas AJ. Approaches to multimodality imaging of angiogenesis. *J Nuc Med* 2010;51(Suppl 1):66S-79S.

317. Dobrucki LW, Sinusas AJ. PET and SPECT in cardiovascular molecular imaging. *Nat Rev Cardiol* 2010;7(1):38-47.
318. Willmann JK, Chen K, Wang H, Paulmurugan R, Rollins M, Cai W, et al. Monitoring of the biological response to murine hindlimb ischemia with <sup>64</sup>Cu-labeled vascular endothelial growth factor-121 positron emission tomography. *Circulation*. 2008;117(7):915-922
319. Lu E, Wagner WR, Schellenberger U, Abraham JA, Klibanov AL, Woulfe SR, et al. Targeted in vivo labeling of receptors for vascular endothelial growth factor: approach to identification of ischemic tissue. *Circulation*. 2003;108(1):97-103.
320. Dobrucki LW, Dione DP, Kalinowski L, Dione D, Mendizabal M, Yu J, et al. Serial noninvasive targeted imaging of peripheral angiogenesis: validation and application of a semiautomated quantitative approach. *J Nuc Med* 2009;50(8):1356-1363.
321. Almutairi A, Rossin R, Shokeen M, Hagooley A, Ananth A, Capoccia B, et al. Biodegradable dendritic positron-emitting nanoprobe for the noninvasive imaging of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 2009; 106(3):685-690.
322. Jahng GH, Li KL, Ostergaard L, Calamante F. Perfusion Magnetic Resonance Imaging: A Comprehensive Update on Principles and Techniques. *Korean J Radiol* 2014;15(5):554-577.
323. Jiji RS, Pollak AW, Epstein FH, Antkowiak PF, Meyer CH, Weltman AL, et al. Reproducibility of rest and exercise stress contrast-enhanced calf perfusion magnetic resonance imaging in peripheral arterial disease. *J Cardiovasc Magn Reson* 2013, 15:14

324. Zheng J, Hasting MK, Zhang X, Coggan A, An H, Snozek D, et al. A pilot study of regional perfusion and oxygenation in calf muscles of individuals with diabetes with a noninvasive measure. *J Vasc Surg* 2014; 59(2): 419–426.
325. Pollak AW, Kramer CM. MRI in Lower Extremity Peripheral Arterial Disease: Recent Advancements. *Curr Cardiovasc Imaging Rep.* 2013; 6(1): 55–60
326. Choksy SA, Chan P. Therapeutic angiogenesis. *Br J Surg* 2006;93:261-263.
327. Hernández-Osma E, Cairols MA, Marti X, Barjau E, Riera S. Impact of treatment on the quality of life in patients with critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002;23:491-494.
328. Herdman M, Gudex C, Lloyd A, Janssen M, Kind P, Parkin D, et al. Development and preliminary testing of the new five-level version of EQ-5D (EQ-5D-5L). *Qual Life Res* 2011; 20(10): 1727–36
329. Pisa G, Reinhold T, Obi-Tabot E, Bodoria M, Bruggenberger B. Critical Limb Ischemia and Its Impact on Patient Health Preferences and Quality of Life: An International Study. *International J Angiol* 2012; 21: 139–146.
330. Sprengers R, Teraa M, Moll F, Ardine de Wit G, van der Graaf Y, Verhaar M, on behalf of the JUVENTAS and SMART study groups. Quality of life in patients with no-option critical limb ischemia underlines the need for new effective treatment. *J Vasc Surg* 2010; 52:843-849.
331. Stltnacke BM. Life satisfaction in patients with chronic pain - relation to pain intensity, disability, and psychological factors. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2011;7:683–689.
332. Silfvermark A, Källmén H, Molander C. Improved life satisfaction and pain reduction: follow-up of a 5-week multidisciplinary long-term pain rehabilitation programme. *Ups J Med Sci* 2014 ; 119(3): 278-286

333. Lacey RJ, Belcher J, Rathod T, Wilkie R, Thomas E, McBeth J. Pain at multiple body sites and health-related quality of life in older adults: results from the North Staffordshire Osteoarthritis Project. *Rheumatology (Oxford)* 2014; 53(11):2071-9.
334. Toth C, Brady S, Hatfield M. The importance of catastrophizing for successful pharmacological treatment of peripheral neuropathic pain. *J Pain Res* 2014; 7: 327-338.
335. Haywood KL, Garratt AM, Fitzpatrick R. Older people specific health status and quality of life: a structured review of self-assessed instruments. *J Eval Clin Prac* 2005;11:315-327.
336. Kersten P, White PJ, Tennant A. Is the Pain Visual Analogue Scale Linear and Responsive to Change? An Exploration Using Rasch Analysis. *PLoS One*. 2014; 9(6): e99485. Published online 2014 June 12. doi: 10.1371/journal.pone.0099485
337. Iba O, Matsubara H, Nozawa Y, Fujiyama S, Amano K, Mori Y, et al. Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation*. 2002;106(15):2019-2025.
338. Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tateno M, et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2001;193(9):1005-1014
339. Ruiz-Salmerón R, de la Cuesta-Díaz A, Constantino-Bermejo M, Pérez-Camacho I, Marcos-Sánchez F, Hmadcha A, Soria B. Angiographic demonstration of neoangiogenesis after intrarterial infusion of autologous bone marrow mononuclear cells in diabetic patients with critical limb ischemia. *Cell Trasplant* 2011; 20:1629-1639

- 340.Losordo DW, Kibbe MR, Mendelsohn F. Autologous CD34+ Cell Therapy for Critical Limb Ischemia Investigators. A randomized, controlled, pilot study of autologous CD34+ cell therapy for critical limb ischemia. *Circ Cardiovasc Intervent* 2012;5:821-830
- 341.Sampol A, Besalduch J, Galmes A, Bargay Lleonart J, Matamoros Flori N, Morey Sureda M, et al. CD34+ cell dose and CD33- subsets: collection and engraftment kinetics in autologous peripheral blood stem cells transplantation. *Haematologica* 1998;83(6):489-95
- 342.Procházka V, Gumulec J, Jaluvka F, Salounová D, Jonszta T, Czerný D, et al. Cell therapy, a new standard in management of chronic critical limb ischemia and foot ulcer. *Cell Transplant* 2010; 19 (11), 1413–1424.
- 343.Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, Ceradini CJ, Callaghan MJ, Kleinman ME, Gurtner GC. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow–derived cells. *Blood*. 2005; 105: 1068-1077
- 344.Li S, Zhou B, Chao Han Z. Therapeutic neovascularization by transplantation of mobilized peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. A comparison between CD34+ and CD34- mononuclear cells. *Thromb Haemost* 2006; 95(2): 301-311.
- 345.De Angelis B, Gentile P, Orlandi F, Bocchini I, Di Pasquali C, Agovino A, et al. Limb Rescue: a new autologous-peripheral blood mononuclear cells technology in critical limb ischemia and chronic ulcers. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015; 21(5): 423-35
- 346.Benoit E, O'Donnell TF Jr, Iafrati MD, Asher E, Bandyk DF, Hallett JW, et al. The role of amputation as an outcome measure in cellular therapy for critical

- limb ischemia: implications for clinical trial design. *J Transl Med* 2011;9:165.  
doi: 10.1186/1479-5876-9-165.
- 347.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;54:1650-8.
- 348.Ko SH, Bandyk DF. Therapeutic Angiogenesis for Critical Limb Ischemia. *Semin Vasc Surg* 2014; 27(1): 23-31
- 349.Cosetti C, Alfaro-Cervelló C, Donegá M, Tyzack G, Pluchino S. New perspectives of tissue remodelling with neural stem and progenitor cell-based therapies. *Cell Tissue Res.* 2012; 349(1): 321–329.
- 350.Idei N, Soga J, Hata T, Fujii Y, Fujimura N, Mikami S, et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation reduces long-term major amputation risk in patients with critical limb ischemia: a comparison of atherosclerotic peripheral arterial disease and Buerger disease. *Circ Cardiovasc Interv.* 2011; 4(1): 15–25.
- 351.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;92(1):26-36.
- 352.Dimmeler S, Leri A. Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. *Circ Res.* 2008 ;102(11):1319-1330.
- 353.Sasaki K, Heeschen C, Aicher A, Ziebart T, Honold J, Urbich C, et al. Ex vivo pretreatment of bone marrow mononuclear cells with endothelial NO synthase enhancer AVE9488 enhances their functional activity for cell therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Sep 26;103(39):14537-41.

354. Kudo T, Hosoyama T, Samura M, Katsura S, Nishimoto A, Kugimiya N, et al. Hypoxic preconditioning reinforces cellular functions of autologous peripheral blood-derived cells in rabbit hindlimb ischemia model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;444(3):370-5
355. Murua A, Portero A, Orive G, Hernández RM, de Castro M, Pedraz JL. Cell microencapsulation technology: towards clinical application. *J Control Release.* 2008;132(2):76-83
356. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation.* 2004; 109(12): 1543-9.
357. Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, Karp JM. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell.* 2012; 10(3): 244-58
358. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003; 31(10):890–896.
359. Minguell JJ, Erices A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Exp Biol Med (Maywood).* 2006; 231:39–49
360. Capoccia BJ, Gregory AD, Link DC. Recruitment of inflammatory subset of monocytes to sites of ischemia induces angiogenesis in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent fashion. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 760-768
361. Moldovan NI, Goldschmidt-Clermont PJ, Parker-Thornburg J, Shapiro SD, Kolattukudy PE. Contribution of monocytes/macrophages to compensatory neovascularization: the drilling of metalloelastase-positive tunnels in ischemic myocardium. *Circ Res* 2000; 87(5): 378-84.

362. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010;327(5966):656-661
363. Yona S, Jung S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol* 2010;17(1):53-59
364. Venneri MA, De Palma M, Ponzoni M, Pucci F, Scielzo C, Zonari E, et al. Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood*. 2007; 109(12): 5276-85
365. Patel AS, Smith A, Nucera S, Biziato D, Saha P, Attia RQ, et al. TIE2-expressing monocytes/macrophages regulate revascularization of the ischemic limb. *EMBO Mol Med* 2013; 5(6): 858-69
366. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917-20.
367. Takahashi K1, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.
368. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol*. 2008;26(11):1276-84
369. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76

370. Suzuki H, Shibata R, Kito T, Ishii M, Li P, Yoshikai T, et al. Therapeutic angiogenesis by transplantation of induced pluripotent stem cell-derived Flk-1 positive cells. *BMC Cell Biol* 2010; 11:72. doi: 10.1186/1471-2121-11-72.
371. Kohler EE, Wary KK, Li F, Chatterjee I, Urao N, Toth PT, et al. Flk1+ and VE-cadherin+ endothelial cells derived from iPSCs recapitulates vascular development during differentiation and display similar angiogenic potential as ESC-derived cells. *PLoS One*. 2013; 8(12): e85549. doi: 10.1371/journal.pone.0085549. eCollection 2013.
372. Volz KS, Miljan E, Khoo A, Cooke JP. Development of pluripotent stem cells for vascular therapy. *Vascul Pharmacol*. 2012;56(5-6):288-96.
373. Lasala GP, Silva JA, Minguell JJ. Therapeutic angiogenesis in patients with severe limb ischemia by transplantation of a combination stem cell product. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2012;144(2):377-82.
374. Teraa M, Sprengers RW, Schutgens R, Slaper-Cortenbach I, van der Graaf Y, Algra A, et al. Effect of repetitive Intra-Arterial infusion of bone marrow mononuclear cells in patients with no-option limb ischemia. The randomized, double-blind, placebo-controlled rejuvenating endothelial progenitor cells via transcutaneous intra-arterial supplementation (JUVENTAS) trial. *Circulation* 2015; 131:851-860
375. Kolvenbach R, Kreissig C, Cagiannos C, Afifi R, Schmaltz E. Intraoperative adjunctive stem cell treatment in patients with critical limb ischemia using a novel point-of-care device. *Ann Vasc Surg* 2010; 24(3): 367-372
376. Amann B, Luedemann C, Ratei R, Schmidt-Lucke A. 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; 18: 371-380
377. Sánchez-Guijo F, Oterino E, Barbado MV, Carrancio S, López-Holgado N, Muntion S, et al. Both CD133+ cells and monocytes provide significant improvement for hindlimb ischemia, although they do not transdifferentiate into endothelial cells. *Cell Transplant* 2010; 19: 103-112
378. Pelosi E, Castelli G, Testa U. Endothelial Progenitors. *Blood Cells Mol Dis* 2014, 52: 186-194
379. Yoder M. Endothelial progenitor cell: a blood cell by many other names may serve similar functions. *J Mol Med (Berl)* 2013; 91 (3): 285-295



# **ANEXOS**



## ANEXOS

**Tabla 1: Tasa de Salvamento de Extremidad. Eventos en el análisis de Kaplan-Meier de la población global. Variable amputación.**

Tabla de supervivencia						
	Tiempo	Estado	Proporción acumulada que sobrevive hasta el momento		Nº de eventos acumulados	Nº de casos que permanecen
			Estimación	Error típico		
1	,000	Si	,994	,006	1	168
2	,267	Si	,988	,008	2	167
3	,333	No	.	.	2	166
4	,400	Si	,982	,010	3	165
5	,567	Si	,976	,012	4	164
6	,767	Si	,970	,013	5	163
7	,800	Si	,964	,014	6	162
8	,833	Si	,958	,015	7	161
9	,900	Si	,952	,016	8	160
10	,933	Si	,946	,017	9	159
11	1,033	Si	,941	,018	10	158
12	1,067	Si	,935	,019	11	157
13	1,100	Si	,929	,020	12	156
14	1,167	Si	.	.	13	155
15	1,167	Si	.	.	14	154
16	1,167	Si	,911	,022	15	153
17	1,333	Si	,905	,023	16	152
18	1,367	Si	,899	,023	17	151
19	1,367	No	.	.	17	150
20	1,400	Si	,893	,024	18	149
21	1,600	Si	.	.	19	148
22	1,600	Si	.	.	20	147
23	1,600	Si	.	.	21	146
24	1,600	Si	,869	,026	22	145
25	1,633	Si	,863	,027	23	144
26	1,700	Si	,857	,027	24	143
27	1,733	Si	,851	,028	25	142
28	1,833	Si	,845	,028	26	141
29	1,867	Si	,839	,028	27	140
30	1,933	Si	,833	,029	28	139
31	2,033	Si	.	.	29	138
32	2,033	Si	,821	,030	30	137
33	2,067	Si	.	.	31	136

34	2,067	Si	,809	,030	32	135
35	2,100	Si	.	.	33	134
36	2,100	Si	,797	,031	34	133
37	2,133	Si	,791	,031	35	132
38	2,133	No	.	.	35	131
39	2,167	Si	,785	,032	36	130
40	2,233	Si	.	.	37	129
41	2,233	Si	,773	,032	38	128
42	2,233	No	.	.	38	127
43	2,267	Si	.	.	39	126
44	2,267	Si	,761	,033	40	125
45	2,300	Si	,755	,033	41	124
46	2,367	Si	,749	,034	42	123
47	2,500	Si	.	.	43	122
48	2,500	Si	,736	,034	44	121
49	2,600	Si	,730	,034	45	120
50	2,733	Si	.	.	46	119
51	2,733	Si	.	.	47	118
52	2,733	Si	.	.	48	117
53	2,733	Si	,706	,035	49	116
54	3,033	Si	,700	,036	50	115
55	3,067	Si	.	.	51	114
56	3,067	Si	,688	,036	52	113
57	3,133	Si	,682	,036	53	112
58	3,167	Si	,676	,036	54	111
59	3,233	Si	,669	,037	55	110
60	3,267	Si	,663	,037	56	109
61	3,333	Si	,657	,037	57	108
62	3,500	Si	,651	,037	58	107
63	3,667	Si	,645	,037	59	106
64	3,933	Si	,639	,037	60	105
65	4,033	Si	,633	,037	61	104
66	4,167	Si	,627	,038	62	103
67	4,200	Si	.	.	63	102
68	4,200	Si	,615	,038	64	101
69	4,267	No	.	.	64	100
70	4,367	Si	,609	,038	65	99
71	4,633	Si	,602	,038	66	98
72	4,667	Si	,596	,038	67	97
73	4,700	Si	,590	,038	68	96
74	4,767	Si	,584	,038	69	95
75	4,967	Si	.	.	70	94

76	4,967	Si	,572	,039	71	93
77	5,000	Si	,565	,039	72	92
78	5,100	Si	,559	,039	73	91
79	5,200	Si	,553	,039	74	90
80	5,633	Si	,547	,039	75	89
81	5,800	Si	,541	,039	76	88
82	5,800	No	.	.	76	87
83	6,033	Si	,535	,039	77	86
84	6,133	Si	.	.	78	85
85	6,133	Si	,522	,039	79	84
86	6,233	Si	,516	,039	80	83
87	6,767	Si	,510	,039	81	82
88	6,800	Si	,504	,039	82	81
89	6,867	Si	,497	,039	83	80
90	6,967	Si	,491	,039	84	79
91	7,233	Si	,485	,039	85	78
92	7,267	Si	,479	,039	86	77
93	7,333	Si	,473	,039	87	76
94	7,600	Si	,466	,039	88	75
95	7,633	Si	,460	,039	89	74
96	7,733	Si	,454	,039	90	73
97	7,767	Si	,448	,039	91	72
98	7,833	Si	,441	,039	92	71
99	8,300	Si	,435	,039	93	70
100	9,000	Si	,429	,039	94	69
101	9,033	Si	,423	,039	95	68
102	9,233	Si	,417	,039	96	67
103	9,467	Si	,410	,039	97	66
104	9,500	Si	,404	,038	98	65
105	9,800	Si	,398	,038	99	64
106	9,833	Si	,392	,038	100	63
107	10,400	Si	,385	,038	101	62
108	10,667	Si	,379	,038	102	61
109	10,933	Si	,373	,038	103	60
110	11,000	Si	,367	,038	104	59
111	11,267	Si	,361	,038	105	58
112	12,467	Si	,354	,038	106	57
113	12,700	Si	,348	,037	107	56
114	13,267	Si	,342	,037	108	55
115	13,333	Si	,336	,037	109	54
116	13,933	Si	,330	,037	110	53
117	14,567	Si	,323	,037	111	52

118	15,267	Si	,317	,037	112	51
119	16,367	Si	.	.	113	50
120	16,367	Si	,305	,036	114	49
121	16,500	Si	,298	,036	115	48
122	17,600	Si	,292	,036	116	47
123	17,767	Si	,286	,035	117	46
124	18,267	No	.	.	117	45
125	18,467	Si	,280	,035	118	44
126	18,867	Si	,273	,035	119	43
127	19,633	Si	,267	,035	120	42
128	19,667	Si	,261	,035	121	41
129	20,633	No	.	.	121	40
130	20,667	Si	,254	,034	122	39
131	21,833	Si	,248	,034	123	38
132	24,100	Si	,241	,034	124	37
133	25,100	No	.	.	124	36
134	26,833	No	.	.	124	35
135	26,833	No	.	.	124	34
136	27,767	Si	,234	,033	125	33
137	31,867	Si	,227	,033	126	32
138	32,267	No	.	.	126	31
139	33,367	No	.	.	126	30
140	37,767	Si	,219	,033	127	29
141	38,300	Si	,212	,033	128	28
142	39,667	Si	,204	,032	129	27
143	41,800	Si	.	.	130	26
144	41,800	Si	,189	,032	131	25
145	42,267	No	.	.	131	24
146	43,500	No	.	.	131	23
147	43,733	Si	,181	,031	132	22
148	45,300	Si	,173	,031	133	21
149	46,233	No	.	.	133	20
150	46,833	Si	,164	,031	134	19
151	47,733	No	.	.	134	18
152	49,767	No	.	.	134	17
153	51,067	No	.	.	134	16
154	59,533	No	.	.	134	15
155	60,867	Si	,153	,030	135	14
156	61,633	No	.	.	135	13
157	63,300	No	.	.	135	12
158	65,067	No	.	.	135	11
159	67,633	Si	,139	,031	136	10

160	82,133	No	.	.	136	9
161	92,933	No	.	.	136	8
162	93,467	No	.	.	136	7
163	93,467	No	.	.	136	6
164	96,467	No	.	.	136	5
165	96,467	No	.	.	136	4
166	106,467	No	.	.	136	3
167	106,467	No	.	.	136	2
168	111,700	No	.	.	136	1
169	111,700	No	.	.	136	0

**Tabla 2: Tasa de Salvamento de Extremidad. Eventos en el análisis de Kaplan-Meier según la pertenencia al grupo Angiogénesis o grupo Control. Variable amputación.**

Tabla de supervivencia							
Angiogénesis	Tiempo	Estado	Proporción acumulada que sobrevive hasta el momento		Nº de eventos acumulados	Nº de casos que permanecen	
			Estimación	Error típico			
No	1	,000	Si	,992	,008	1	119
	2	,267	Si	,983	,012	2	118
	3	,333	No	.	.	2	117
	4	,400	Si	,975	,014	3	116
	5	,567	Si	,967	,016	4	115
	6	,767	Si	,958	,018	5	114
	7	,800	Si	,950	,020	6	113
	8	,833	Si	,941	,022	7	112
	9	,900	Si	,933	,023	8	111
	10	,933	Si	,925	,024	9	110
	11	1,033	Si	,916	,025	10	109
	12	1,067	Si	,908	,027	11	108
	13	1,100	Si	,899	,028	12	107
	14	1,167	Si	.	.	13	106
	15	1,167	Si	.	.	14	105
	16	1,167	Si	,874	,030	15	104
	17	1,333	Si	,866	,031	16	103
	18	1,367	Si	,857	,032	17	102
	19	1,367	No	.	.	17	101
	20	1,400	Si	,849	,033	18	100
	21	1,600	Si	.	.	19	99
	22	1,600	Si	.	.	20	98
	23	1,600	Si	.	.	21	97
	24	1,600	Si	,815	,036	22	96
	25	1,633	Si	,806	,036	23	95
	26	1,700	Si	,798	,037	24	94
	27	1,733	Si	,789	,037	25	93
	28	1,833	Si	,781	,038	26	92
	29	1,867	Si	,772	,039	27	91
	30	1,933	Si	,764	,039	28	90
	31	2,033	Si	.	.	29	89
	32	2,033	Si	,747	,040	30	88
	33	2,067	Si	.	.	31	87
	34	2,067	Si	,730	,041	32	86

35	2,100	Si	.	.	33	85
36	2,100	Si	,713	,042	34	84
37	2,133	Si	,704	,042	35	83
38	2,167	Si	,696	,042	36	82
39	2,233	Si	.	.	37	81
40	2,233	Si	,679	,043	38	80
41	2,233	No	.	.	38	79
42	2,267	Si	.	.	39	78
43	2,267	Si	,662	,044	40	77
44	2,300	Si	,653	,044	41	76
45	2,367	Si	,645	,044	42	75
46	2,500	Si	.	.	43	74
47	2,500	Si	,627	,045	44	73
48	2,600	Si	,619	,045	45	72
49	2,733	Si	.	.	46	71
50	2,733	Si	,602	,045	47	70
51	3,033	Si	,593	,045	48	69
52	3,133	Si	,584	,045	49	68
53	3,233	Si	,576	,046	50	67
54	3,267	Si	,567	,046	51	66
55	3,333	Si	,559	,046	52	65
56	3,500	Si	,550	,046	53	64
57	3,667	Si	,541	,046	54	63
58	3,933	Si	,533	,046	55	62
59	4,033	Si	,524	,046	56	61
60	4,167	Si	,516	,046	57	60
61	4,200	Si	.	.	58	59
62	4,200	Si	,499	,046	59	58
63	4,267	No	.	.	59	57
64	4,367	Si	,490	,046	60	56
65	4,633	Si	,481	,046	61	55
66	4,667	Si	,472	,046	62	54
67	4,700	Si	,464	,046	63	53
68	4,767	Si	,455	,046	64	52
69	4,967	Si	.	.	65	51
70	4,967	Si	,437	,046	66	50
71	5,000	Si	,429	,046	67	49
72	5,100	Si	,420	,046	68	48
73	5,200	Si	,411	,046	69	47
74	5,633	Si	,402	,045	70	46
75	5,800	Si	,394	,045	71	45
76	6,033	Si	,385	,045	72	44

77	6,133	Si	.	.	73	43
78	6,133	Si	,367	,045	74	42
79	6,767	Si	,359	,045	75	41
80	6,800	Si	,350	,044	76	40
81	6,867	Si	,341	,044	77	39
82	6,967	Si	,332	,044	78	38
83	7,233	Si	,324	,043	79	37
84	7,267	Si	,315	,043	80	36
85	7,333	Si	,306	,043	81	35
86	7,600	Si	,297	,043	82	34
87	7,767	Si	,289	,042	83	33
88	7,833	Si	,280	,042	84	32
89	8,300	Si	,271	,041	85	31
90	9,000	Si	,262	,041	86	30
91	9,033	Si	,254	,041	87	29
92	9,233	Si	,245	,040	88	28
93	9,467	Si	,236	,040	89	27
94	9,500	Si	,227	,039	90	26
95	9,800	Si	,219	,039	91	25
96	9,833	Si	,210	,038	92	24
97	10,933	Si	,201	,037	93	23
98	11,000	Si	,192	,037	94	22
99	12,467	Si	,184	,036	95	21
100	12,700	Si	,175	,035	96	20
101	13,933	Si	,166	,035	97	19
102	14,567	Si	,157	,034	98	18
103	15,267	Si	,149	,033	99	17
104	16,367	Si	.	.	100	16
105	16,367	Si	,131	,032	101	15
106	16,500	Si	,122	,031	102	14
107	17,767	Si	,114	,030	103	13
108	18,467	Si	,105	,029	104	12
109	18,867	Si	,096	,028	105	11
110	19,633	Si	,087	,026	106	10
111	21,833	Si	,079	,025	107	9
112	27,767	Si	,070	,024	108	8
113	31,867	Si	,061	,022	109	7
114	37,767	Si	,052	,021	110	6
115	38,300	Si	,044	,019	111	5
116	39,667	Si	,035	,017	112	4
117	43,733	Si	,026	,015	113	3
118	45,300	Si	,017	,012	114	2

	119	46,833	Si	,009	,009	115	1
	120	60,867	Si	,000	,000	116	0
Si	1	2,133	No	.	.	0	48
	2	2,733	Si	.	.	1	47
	3	2,733	Si	,958	,029	2	46
	4	3,067	Si	.	.	3	45
	5	3,067	Si	,917	,040	4	44
	6	3,167	Si	,896	,044	5	43
	7	5,800	No	.	.	5	42
	8	6,233	Si	,875	,048	6	41
	9	7,633	Si	,853	,051	7	40
	10	7,733	Si	,832	,054	8	39
	11	10,400	Si	,811	,057	9	38
	12	10,667	Si	,789	,059	10	37
	13	11,267	Si	,768	,061	11	36
	14	13,267	Si	,747	,063	12	35
	15	13,333	Si	,725	,065	13	34
	16	17,600	Si	,704	,066	14	33
	17	18,267	No	.	.	14	32
	18	19,667	Si	,682	,068	15	31
	19	20,633	No	.	.	15	30
	20	20,667	Si	,659	,069	16	29
	21	24,100	Si	,636	,071	17	28
	22	25,100	No	.	.	17	27
	23	26,833	No	.	.	17	26
	24	26,833	No	.	.	17	25
	25	32,267	No	.	.	17	24
	26	33,367	No	.	.	17	23
	27	41,800	Si	.	.	18	22
	28	41,800	Si	,581	,075	19	21
	29	42,267	No	.	.	19	20
	30	43,500	No	.	.	19	19
	31	46,233	No	.	.	19	18
	32	47,733	No	.	.	19	17
	33	49,767	No	.	.	19	16
	34	51,067	No	.	.	19	15
	35	59,533	No	.	.	19	14
	36	61,633	No	.	.	19	13
	37	63,300	No	.	.	19	12
	38	65,067	No	.	.	19	11
	39	67,633	Si	,528	,084	20	10
	40	82,133	No	.	.	20	9

41	92,933	No	.	.	20	8
42	93,467	No	.	.	20	7
43	93,467	No	.	.	20	6
44	96,467	No	.	.	20	5
45	96,467	No	.	.	20	4
46	106,467	No	.	.	20	3
47	106,467	No	.	.	20	2
48	111,700	No	.	.	20	1
49	111,700	No	.	.	20	0

**Tabla 3: Tasa de supervivencia. Eventos en el análisis de Kaplan-Meier de la población global. Variable exitus.**

Tabla de supervivencia						
	Tiempo	Estado	Proporción acumulada que sobrevive hasta el momento		N° de eventos acumulados	N° de casos que permanecen
			Estimación	Error típico		
1	,000	Si	,994	,006	1	163
2	,267	No	.	.	1	162
3	,333	Si	,988	,009	2	161
4	,400	Si	,982	,011	3	160
5	,567	Si	,975	,012	4	159
6	,767	Si	,969	,013	5	158
7	,800	Si	,963	,015	6	157
8	,833	No	.	.	6	156
9	,900	No	.	.	6	155
10	,933	Si	,957	,016	7	154
11	1,033	No	.	.	7	153
12	1,067	No	.	.	7	152
13	1,100	No	.	.	7	151
14	1,167	Si	.	.	8	150
15	1,167	Si	,944	,018	9	149
16	1,167	No	.	.	9	148
17	1,333	No	.	.	9	147
18	1,367	Si	,938	,019	10	146
19	1,367	No	.	.	10	145
20	1,400	Si	,931	,020	11	144
21	1,600	Si	.	.	12	143
22	1,600	Si	,919	,022	13	142
23	1,600	No	.	.	13	141
24	1,600	No	.	.	13	140
25	1,633	Si	,912	,022	14	139
26	1,700	No	.	.	14	138
27	1,733	No	.	.	14	137
28	1,833	No	.	.	14	136
29	1,867	No	.	.	14	135
30	1,933	Si	,905	,023	15	134
31	2,033	No	.	.	15	133
32	2,033	No	.	.	15	132
33	2,067	Si	.	.	16	131

34	2,067	Si	,891	,025	17	130
35	2,100	No	.	.	17	129
36	2,100	No	.	.	17	128
37	2,133	No	.	.	17	127
38	2,133	No	.	.	17	126
39	2,167	No	.	.	17	125
40	2,233	Si	.	.	18	124
41	2,233	Si	.	.	19	123
42	2,233	Si	,870	,027	20	122
43	2,267	Si	.	.	21	121
44	2,267	Si	,856	,029	22	120
45	2,300	No	.	.	22	119
46	2,367	Si	,849	,029	23	118
47	2,500	No	.	.	23	117
48	2,500	No	.	.	23	116
49	2,600	No	.	.	23	115
50	2,733	Si	.	.	24	114
51	2,733	Si	.	.	25	113
52	2,733	Si	,826	,031	26	112
53	3,033	No	.	.	26	111
54	3,067	No	.	.	26	110
55	3,067	No	.	.	26	109
56	3,133	No	.	.	26	108
57	3,167	No	.	.	26	107
58	3,233	No	.	.	26	106
59	3,267	No	.	.	26	105
60	3,333	No	.	.	26	104
61	3,500	No	.	.	26	103
62	3,667	No	.	.	26	102
63	3,933	No	.	.	26	101
64	4,033	No	.	.	26	100
65	4,167	Si	,818	,032	27	99
66	4,200	No	.	.	27	98
67	4,200	No	.	.	27	97
68	4,267	Si	,810	,033	28	96
69	4,367	No	.	.	28	95
70	4,633	No	.	.	28	94
71	4,667	No	.	.	28	93
72	4,700	Si	,801	,033	29	92
73	4,767	No	.	.	29	91
74	4,967	No	.	.	29	90
75	4,967	No	.	.	29	89

76	5,000	No	.	.	29	88
77	5,100	No	.	.	29	87
78	5,200	No	.	.	29	86
79	5,633	Si	,792	,034	30	85
80	5,800	No	.	.	30	84
81	5,800	No	.	.	30	83
82	6,033	No	.	.	30	82
83	6,133	Si	,782	,035	31	81
84	6,133	No	.	.	31	80
85	6,233	No	.	.	31	79
86	6,767	Si	,772	,036	32	78
87	6,800	No	.	.	32	77
88	6,867	No	.	.	32	76
89	6,967	No	.	.	32	75
90	7,233	No	.	.	32	74
91	7,267	No	.	.	32	73
92	7,333	No	.	.	32	72
93	7,600	No	.	.	32	71
94	7,633	Si	,761	,037	33	70
95	7,733	No	.	.	33	69
96	7,767	No	.	.	33	68
97	7,833	No	.	.	33	67
98	8,300	No	.	.	33	66
99	9,000	No	.	.	33	65
100	9,033	No	.	.	33	64
101	9,233	No	.	.	33	63
102	9,467	Si	,749	,039	34	62
103	9,500	Si	,737	,040	35	61
104	9,800	No	.	.	35	60
105	9,833	No	.	.	35	59
106	10,400	No	.	.	35	58
107	10,667	No	.	.	35	57
108	10,933	No	.	.	35	56
109	11,000	No	.	.	35	55
110	11,267	Si	,724	,041	36	54
111	12,467	Si	,710	,043	37	53
112	12,700	No	.	.	37	52
113	13,267	No	.	.	37	51
114	13,333	No	.	.	37	50
115	13,933	Si	,696	,044	38	49
116	14,567	Si	,682	,045	39	48
117	15,267	No	.	.	39	47

118	16,367	No	.	.	39	46
119	16,367	No	.	.	39	45
120	16,500	No	.	.	39	44
121	17,600	No	.	.	39	43
122	17,767	Si	,666	,047	40	42
123	18,267	Si	,650	,049	41	41
124	18,467	No	.	.	41	40
125	18,867	No	.	.	41	39
126	19,633	Si	,634	,050	42	38
127	19,667	No	.	.	42	37
128	20,633	No	.	.	42	36
129	20,667	No	.	.	42	35
130	21,833	Si	,615	,052	43	34
131	24,100	Si	,597	,053	44	33
132	25,100	Si	,579	,055	45	32
133	26,833	No	.	.	45	31
134	26,833	No	.	.	45	30
135	27,767	No	.	.	45	29
136	31,867	No	.	.	45	28
137	32,267	Si	,559	,057	46	27
138	33,367	Si	,538	,058	47	26
139	37,767	Si	,517	,059	48	25
140	38,300	No	.	.	48	24
141	39,667	No	.	.	48	23
142	41,800	No	.	.	48	22
143	41,800	No	.	.	48	21
144	42,267	No	.	.	48	20
145	43,500	No	.	.	48	19
146	43,733	No	.	.	48	18
147	45,300	No	.	.	48	17
148	46,233	No	.	.	48	16
149	46,833	No	.	.	48	15
150	47,733	No	.	.	48	14
151	49,767	No	.	.	48	13
152	51,067	No	.	.	48	12
153	59,533	No	.	.	48	11
154	60,867	No	.	.	48	10
155	61,633	No	.	.	48	9
156	63,300	No	.	.	48	8
157	65,067	Si	,453	,080	49	7
158	67,633	Si	,388	,091	50	6
159	82,133	No	.	.	50	5

160	92,933	Si	,310	,100	51	4
161	93,467	Si	,233	,101	52	3
162	96,467	No	.	.	52	2
163	106,467	No	.	.	52	1
164	111,700	No	.	.	52	0

**Tabla 4: Tasa de supervivencia. Eventos en el análisis de Kaplan-Meier según la pertenencia al grupo Angiogénesis o grupo Control. Variable exitus.**

Tabla de supervivencia							
Angiogenesis	Tiempo	Estado	Proporción acumulada que sobrevive hasta el momento		N° de eventos acumulados	N° de casos que permanecen	
			Estimación	Error típico			
No	1	,000	Si	,992	,008	1	119
	2	,267	No	.	.	1	118
	3	,333	Si	,983	,012	2	117
	4	,400	Si	,975	,014	3	116
	5	,567	Si	,966	,016	4	115
	6	,767	Si	,958	,018	5	114
	7	,800	Si	,950	,020	6	113
	8	,833	No	.	.	6	112
	9	,900	No	.	.	6	111
	10	,933	Si	,941	,022	7	110
	11	1,033	No	.	.	7	109
	12	1,067	No	.	.	7	108
	13	1,100	No	.	.	7	107
	14	1,167	Si	.	.	8	106
	15	1,167	Si	,924	,025	9	105
	16	1,167	No	.	.	9	104
	17	1,333	No	.	.	9	103
	18	1,367	Si	,915	,026	10	102
	19	1,367	No	.	.	10	101
	20	1,400	Si	,905	,027	11	100
	21	1,600	Si	.	.	12	99
	22	1,600	Si	,887	,029	13	98
	23	1,600	No	.	.	13	97
	24	1,600	No	.	.	13	96
	25	1,633	Si	,878	,031	14	95
	26	1,700	No	.	.	14	94
	27	1,733	No	.	.	14	93
	28	1,833	No	.	.	14	92
	29	1,867	No	.	.	14	91
	30	1,933	Si	,868	,032	15	90
	31	2,033	No	.	.	15	89
	32	2,033	No	.	.	15	88
	33	2,067	Si	.	.	16	87
	34	2,067	Si	,849	,034	17	86

35	2,100	No	.	.	17	85
36	2,100	No	.	.	17	84
37	2,133	No	.	.	17	83
38	2,167	No	.	.	17	82
39	2,233	Si	.	.	18	81
40	2,233	Si	.	.	19	80
41	2,233	Si	,818	,037	20	79
42	2,267	Si	.	.	21	78
43	2,267	Si	,797	,039	22	77
44	2,300	No	.	.	22	76
45	2,367	Si	,787	,040	23	75
46	2,500	No	.	.	23	74
47	2,500	No	.	.	23	73
48	2,600	No	.	.	23	72
49	2,733	Si	.	.	24	71
50	2,733	Si	,765	,042	25	70
51	3,033	No	.	.	25	69
52	3,133	No	.	.	25	68
53	3,233	No	.	.	25	67
54	3,267	No	.	.	25	66
55	3,333	No	.	.	25	65
56	3,500	No	.	.	25	64
57	3,667	No	.	.	25	63
58	3,933	No	.	.	25	62
59	4,033	No	.	.	25	61
60	4,167	Si	,752	,043	26	60
61	4,200	No	.	.	26	59
62	4,200	No	.	.	26	58
63	4,267	Si	,739	,044	27	57
64	4,367	No	.	.	27	56
65	4,633	No	.	.	27	55
66	4,667	No	.	.	27	54
67	4,700	Si	,725	,045	28	53
68	4,767	No	.	.	28	52
69	4,967	No	.	.	28	51
70	4,967	No	.	.	28	50
71	5,000	No	.	.	28	49
72	5,100	No	.	.	28	48
73	5,200	No	.	.	28	47
74	5,633	Si	,710	,047	29	46
75	5,800	No	.	.	29	45
76	6,033	No	.	.	29	44

77	6,133	Si	,694	,048	30	43
78	6,133	No	.	.	30	42
79	6,767	Si	,677	,050	31	41
80	6,800	No	.	.	31	40
81	6,867	No	.	.	31	39
82	6,967	No	.	.	31	38
83	7,233	No	.	.	31	37
84	7,267	No	.	.	31	36
85	7,333	No	.	.	31	35
86	7,600	No	.	.	31	34
87	7,767	No	.	.	31	33
88	7,833	No	.	.	31	32
89	8,300	No	.	.	31	31
90	9,000	No	.	.	31	30
91	9,033	No	.	.	31	29
92	9,233	No	.	.	31	28
93	9,467	Si	,653	,054	32	27
94	9,500	Si	,629	,057	33	26
95	9,800	No	.	.	33	25
96	9,833	No	.	.	33	24
97	10,933	No	.	.	33	23
98	11,000	No	.	.	33	22
99	12,467	Si	,600	,061	34	21
100	12,700	No	.	.	34	20
101	13,933	Si	,570	,065	35	19
102	14,567	Si	,540	,068	36	18
103	15,267	No	.	.	36	17
104	16,367	No	.	.	36	16
105	16,367	No	.	.	36	15
106	16,500	No	.	.	36	14
107	17,767	Si	,502	,073	37	13
108	18,467	No	.	.	37	12
109	18,867	No	.	.	37	11
110	19,633	Si	,456	,080	38	10
111	21,833	Si	,411	,084	39	9
112	27,767	No	.	.	39	8
113	31,867	No	.	.	39	7
114	37,767	Si	,352	,090	40	6
115	38,300	No	.	.	40	5
116	39,667	No	.	.	40	4
117	43,733	No	.	.	40	3
118	45,300	No	.	.	40	2

	119	46,833	No	.	.	40	1
	120	60,867	No	.	.	40	0
Si	1	2,133	No	.	.	0	43
	2	2,733	Si	,977	,023	1	42
	3	3,067	No	.	.	1	41
	4	3,067	No	.	.	1	40
	5	3,167	No	.	.	1	39
	6	5,800	No	.	.	1	38
	7	6,233	No	.	.	1	37
	8	7,633	Si	,950	,034	2	36
	9	7,733	No	.	.	2	35
	10	10,400	No	.	.	2	34
	11	10,667	No	.	.	2	33
	12	11,267	Si	,922	,044	3	32
	13	13,267	No	.	.	3	31
	14	13,333	No	.	.	3	30
	15	17,600	No	.	.	3	29
	16	18,267	Si	,890	,053	4	28
	17	19,667	No	.	.	4	27
	18	20,633	No	.	.	4	26
	19	20,667	No	.	.	4	25
	20	24,100	Si	,854	,061	5	24
	21	25,100	Si	,819	,068	6	23
	22	26,833	No	.	.	6	22
	23	26,833	No	.	.	6	21
	24	32,267	Si	,780	,075	7	20
	25	33,367	Si	,741	,081	8	19
	26	41,800	No	.	.	8	18
	27	41,800	No	.	.	8	17
	28	42,267	No	.	.	8	16
	29	43,500	No	.	.	8	15
	30	46,233	No	.	.	8	14
	31	47,733	No	.	.	8	13
	32	49,767	No	.	.	8	12
	33	51,067	No	.	.	8	11
	34	59,533	No	.	.	8	10
	35	61,633	No	.	.	8	9
	36	63,300	No	.	.	8	8
	37	65,067	Si	,648	,112	9	7
	38	67,633	Si	,555	,129	10	6
	39	82,133	No	.	.	10	5
	40	92,933	Si	,444	,143	11	4

	41	93,467	Si	,333	,144	12	3
	42	96,467	No	.	.	12	2
	43	106,467	No	.	.	12	1
	44	111,700	No	.	.	12	0

**Tabla 5: Tasa de Salvamento de Extremidad. Población Sólo Tratamiento Médico. Eventos en el análisis de Kaplan-Meier de la población global. Variable amputación.**

Tabla de supervivencia						
	Tiempo	Estado	Proporción acumulada que sobrevive hasta el momento		Nº de eventos acumulados	Nº de casos que permanecen
			Estimación	Error típico		
1	,000	Si	,986	,013	1	73
2	,333	No	.	.	1	72
3	,400	Si	,973	,019	2	71
4	,567	Si	,959	,023	3	70
5	,767	Si	,945	,027	4	69
6	,800	Si	,932	,029	5	68
7	,933	Si	,918	,032	6	67
8	1,167	Si	,904	,034	7	66
9	1,333	Si	,891	,037	8	65
10	1,367	No	.	.	8	64
11	1,600	Si	,877	,039	9	63
12	1,633	Si	,863	,040	10	62
13	1,700	Si	,849	,042	11	61
14	1,733	Si	,835	,044	12	60
15	2,033	Si	.	.	13	59
16	2,033	Si	,807	,046	14	58
17	2,067	Si	.	.	15	57
18	2,067	Si	,779	,049	16	56
19	2,133	Si	,765	,050	17	55
20	2,233	Si	,751	,051	18	54
21	2,267	Si	.	.	19	53
22	2,267	Si	,724	,053	20	52
23	2,367	Si	,710	,053	21	51
24	2,500	Si	.	.	22	50
25	2,500	Si	,682	,055	23	49
26	2,733	Si	.	.	24	48
27	2,733	Si	.	.	25	47
28	2,733	Si	,640	,057	26	46
29	3,033	Si	,626	,057	27	45
30	3,067	Si	,612	,057	28	44
31	3,167	Si	,598	,058	29	43
32	4,033	Si	,584	,058	30	42
33	4,167	Si	,571	,058	31	41
34	4,200	Si	.	.	32	40

35	4,200	Si	,543	,059	33	39
36	4,700	Si	,529	,059	34	38
37	5,633	Si	,515	,059	35	37
38	5,800	No	.	.	35	36
39	6,033	Si	,501	,059	36	35
40	6,133	Si	.	.	37	34
41	6,133	Si	,472	,059	38	33
42	6,233	Si	,458	,059	39	32
43	7,233	Si	,443	,059	40	31
44	7,833	Si	,429	,059	41	30
45	9,033	Si	,415	,058	42	29
46	10,667	Si	,400	,058	43	28
47	11,000	Si	,386	,058	44	27
48	12,467	Si	,372	,057	45	26
49	12,700	Si	,358	,057	46	25
50	14,567	Si	,343	,056	47	24
51	15,267	Si	,329	,056	48	23
52	18,267	No	.	.	48	22
53	20,633	No	.	.	48	21
54	21,833	Si	,313	,055	49	20
55	25,100	No	.	.	49	19
56	26,833	No	.	.	49	18
57	26,833	No	.	.	49	17
58	33,367	No	.	.	49	16
59	41,800	Si	.	.	50	15
60	41,800	Si	,274	,055	51	14
61	42,267	No	.	.	51	13
62	43,500	No	.	.	51	12
63	43,733	Si	,251	,055	52	11
64	46,233	No	.	.	52	10
65	47,733	No	.	.	52	9
66	51,067	No	.	.	52	8
67	59,533	No	.	.	52	7
68	61,633	No	.	.	52	6
69	65,067	No	.	.	52	5
70	67,633	Si	,201	,063	53	4
71	93,467	No	.	.	53	3
72	93,467	No	.	.	53	2
73	96,467	No	.	.	53	1
74	96,467	No	.	.	53	0

**Tabla 6: Tasa de Salvamento de Extremidad. Población Sólo Tratamiento Médico. Eventos en el análisis de Kaplan-Meier según pertenencia a grupo Angiogénesis o Control. Variable amputación.**

Tabla de supervivencia							
Angiogénesis	Tiempo	Estado	Proporción acumulada que sobrevive hasta el momento		Nº de eventos acumulados	Nº de casos que permanecen	
			Estimación	Error típico			
No	1	,000	Si	,978	,022	1	45
	2	,333	No	.	.	1	44
	3	,400	Si	,956	,030	2	43
	4	,567	Si	,934	,037	3	42
	5	,767	Si	,912	,042	4	41
	6	,800	Si	,889	,047	5	40
	7	,933	Si	,867	,051	6	39
	8	1,167	Si	,845	,054	7	38
	9	1,333	Si	,823	,057	8	37
	10	1,367	No	.	.	8	36
	11	1,600	Si	,800	,060	9	35
	12	1,633	Si	,777	,062	10	34
	13	1,700	Si	,754	,064	11	33
	14	1,733	Si	,731	,066	12	32
	15	2,033	Si	.	.	13	31
	16	2,033	Si	,686	,070	14	30
	17	2,067	Si	.	.	15	29
	18	2,067	Si	,640	,072	16	28
	19	2,133	Si	,617	,073	17	27
	20	2,233	Si	,594	,074	18	26
	21	2,267	Si	.	.	19	25
	22	2,267	Si	,548	,075	20	24
	23	2,367	Si	,526	,075	21	23
	24	2,500	Si	.	.	22	22
	25	2,500	Si	,480	,075	23	21
	26	2,733	Si	,457	,075	24	20
	27	3,033	Si	,434	,075	25	19
	28	4,033	Si	,411	,074	26	18
	29	4,167	Si	,388	,074	27	17
	30	4,200	Si	.	.	28	16
	31	4,200	Si	,343	,072	29	15
	32	4,700	Si	,320	,070	30	14
	33	5,633	Si	,297	,069	31	13

	34	6,033	Si	,274	,067	32	12
	35	6,133	Si	.	.	33	11
	36	6,133	Si	,229	,063	34	10
	37	7,233	Si	,206	,061	35	9
	38	7,833	Si	,183	,058	36	8
	39	9,033	Si	,160	,055	37	7
	40	11,000	Si	,137	,052	38	6
	41	12,467	Si	,114	,048	39	5
	42	12,700	Si	,091	,044	40	4
	43	14,567	Si	,069	,038	41	3
	44	15,267	Si	,046	,032	42	2
	45	21,833	Si	,023	,023	43	1
	46	43,733	Si	,000	,000	44	0
Si	1	2,733	Si	.	.	1	27
	2	2,733	Si	,929	,049	2	26
	3	3,067	Si	,893	,058	3	25
	4	3,167	Si	,857	,066	4	24
	5	5,800	No	.	.	4	23
	6	6,233	Si	,820	,073	5	22
	7	10,667	Si	,783	,079	6	21
	8	18,267	No	.	.	6	20
	9	20,633	No	.	.	6	19
	10	25,100	No	.	.	6	18
	11	26,833	No	.	.	6	17
	12	26,833	No	.	.	6	16
	13	33,367	No	.	.	6	15
	14	41,800	Si	.	.	7	14
	15	41,800	Si	,678	,097	8	13
	16	42,267	No	.	.	8	12
	17	43,500	No	.	.	8	11
	18	46,233	No	.	.	8	10
	19	47,733	No	.	.	8	9
	20	51,067	No	.	.	8	8
	21	59,533	No	.	.	8	7
	22	61,633	No	.	.	8	6
	23	65,067	No	.	.	8	5
	24	67,633	Si	,543	,144	9	4
	25	93,467	No	.	.	9	3
	26	93,467	No	.	.	9	2
	27	96,467	No	.	.	9	1
	28	96,467	No	.	.	9	0

**Tabla 7: Tasa de Supervivencia. Población Sólo Tratamiento Médico. Eventos en el análisis de Kaplan-Meier análisis global. Variable exitus.**

Tabla de supervivencia						
	Tiempo	Estado	Proporción acumulada que sobrevive hasta el momento		N° de eventos acumulados	N° de casos que permanecen
			Estimación	Error típico		
1	,000	Si	,986	,014	1	70
2	,333	Si	,972	,020	2	69
3	,400	Si	,958	,024	3	68
4	,567	Si	,944	,027	4	67
5	,767	Si	,930	,030	5	66
6	,800	Si	,915	,033	6	65
7	,933	Si	,901	,035	7	64
8	1,167	Si	,887	,038	8	63
9	1,333	No	.	.	8	62
10	1,367	Si	,873	,040	9	61
11	1,600	Si	,859	,041	10	60
12	1,633	Si	,844	,043	11	59
13	1,700	No	.	.	11	58
14	1,733	No	.	.	11	57
15	2,033	No	.	.	11	56
16	2,033	No	.	.	11	55
17	2,067	Si	.	.	12	54
18	2,067	Si	,814	,047	13	53
19	2,133	No	.	.	13	52
20	2,233	Si	,798	,048	14	51
21	2,267	Si	.	.	15	50
22	2,267	Si	,767	,051	16	49
23	2,367	Si	,751	,053	17	48
24	2,500	No	.	.	17	47
25	2,500	No	.	.	17	46
26	2,733	Si	.	.	18	45
27	2,733	Si	,718	,055	19	44
28	3,033	No	.	.	19	43
29	3,067	No	.	.	19	42
30	3,167	No	.	.	19	41
31	4,033	No	.	.	19	40
32	4,167	Si	,700	,057	20	39
33	4,200	No	.	.	20	38
34	4,200	No	.	.	20	37

35	4,700	Si	,682	,058	21	36
36	5,633	Si	,663	,060	22	35
37	5,800	No	.	.	22	34
38	6,033	No	.	.	22	33
39	6,133	Si	,643	,061	23	32
40	6,133	No	.	.	23	31
41	6,233	No	.	.	23	30
42	7,233	No	.	.	23	29
43	7,833	No	.	.	23	28
44	9,033	No	.	.	23	27
45	10,667	No	.	.	23	26
46	11,000	No	.	.	23	25
47	12,467	Si	,617	,064	24	24
48	12,700	No	.	.	24	23
49	14,567	Si	,590	,066	25	22
50	15,267	No	.	.	25	21
51	18,267	Si	,562	,069	26	20
52	20,633	No	.	.	26	19
53	21,833	Si	,532	,071	27	18
54	25,100	Si	,503	,073	28	17
55	26,833	No	.	.	28	16
56	26,833	No	.	.	28	15
57	33,367	Si	,469	,076	29	14
58	41,800	No	.	.	29	13
59	41,800	No	.	.	29	12
60	42,267	No	.	.	29	11
61	43,500	No	.	.	29	10
62	43,733	No	.	.	29	9
63	46,233	No	.	.	29	8
64	47,733	No	.	.	29	7
65	51,067	No	.	.	29	6
66	59,533	No	.	.	29	5
67	61,633	No	.	.	29	4
68	65,067	Si	,352	,116	30	3
69	67,633	Si	,235	,123	31	2
70	93,467	Si	,117	,103	32	1
71	96,467	No	.	.	32	0

**Tabla 8: Tasa de Supervivencia. Población Sólo Tratamiento Médico. Eventos en el análisis de Kaplan-Meier según pertenencia a grupo Angiogénesis o Control. Variable exitus.**

Tabla de supervivencia							
Angiogenesis	Tiempo	Estado	Proporción acumulada que sobrevive hasta el momento		Nº de eventos acumulados	Nº de casos que permanecen	
			Estimación	Error típico			
No	1	,000	Si	,978	,022	1	45
	2	,333	Si	,957	,030	2	44
	3	,400	Si	,935	,036	3	43
	4	,567	Si	,913	,042	4	42
	5	,767	Si	,891	,046	5	41
	6	,800	Si	,870	,050	6	40
	7	,933	Si	,848	,053	7	39
	8	1,167	Si	,826	,056	8	38
	9	1,333	No	.	.	8	37
	10	1,367	Si	,804	,059	9	36
	11	1,600	Si	,781	,061	10	35
	12	1,633	Si	,759	,063	11	34
	13	1,700	No	.	.	11	33
	14	1,733	No	.	.	11	32
	15	2,033	No	.	.	11	31
	16	2,033	No	.	.	11	30
	17	2,067	Si	.	.	12	29
	18	2,067	Si	,708	,068	13	28
	19	2,133	No	.	.	13	27
	20	2,233	Si	,682	,071	14	26
	21	2,267	Si	.	.	15	25
	22	2,267	Si	,630	,074	16	24
	23	2,367	Si	,604	,076	17	23
	24	2,500	No	.	.	17	22
	25	2,500	No	.	.	17	21
	26	2,733	Si	,575	,077	18	20
	27	3,033	No	.	.	18	19
	28	4,033	No	.	.	18	18
	29	4,167	Si	,543	,079	19	17
	30	4,200	No	.	.	19	16
	31	4,200	No	.	.	19	15
	32	4,700	Si	,507	,082	20	14
	33	5,633	Si	,470	,084	21	13

	34	6,033	No	.	.	21	12
	35	6,133	Si	,431	,085	22	11
	36	6,133	No	.	.	22	10
	37	7,233	No	.	.	22	9
	38	7,833	No	.	.	22	8
	39	9,033	No	.	.	22	7
	40	11,000	No	.	.	22	6
	41	12,467	Si	,359	,097	23	5
	42	12,700	No	.	.	23	4
	43	14,567	Si	,270	,106	24	3
	44	15,267	No	.	.	24	2
	45	21,833	Si	,135	,109	25	1
	46	43,733	No	.	.	25	0
Si	1	2,733	Si	,960	,039	1	24
	2	3,067	No	.	.	1	23
	3	3,167	No	.	.	1	22
	4	5,800	No	.	.	1	21
	5	6,233	No	.	.	1	20
	6	10,667	No	.	.	1	19
	7	18,267	Si	,909	,062	2	18
	8	20,633	No	.	.	2	17
	9	25,100	Si	,856	,078	3	16
	10	26,833	No	.	.	3	15
	11	26,833	No	.	.	3	14
	12	33,367	Si	,795	,093	4	13
	13	41,800	No	.	.	4	12
	14	41,800	No	.	.	4	11
	15	42,267	No	.	.	4	10
	16	43,500	No	.	.	4	9
	17	46,233	No	.	.	4	8
	18	47,733	No	.	.	4	7
	19	51,067	No	.	.	4	6
	20	59,533	No	.	.	4	5
	21	61,633	No	.	.	4	4
	22	65,067	Si	,596	,186	5	3
	23	67,633	Si	,397	,204	6	2
	24	93,467	Si	,199	,174	7	1
	25	96,467	No	.	.	7	0

**Tabla 9: Tasa de Salvamento de Extremidad. Grupo Angiogénesis. Eventos en el análisis de Kaplan-Meier según pertenencia a grupo Diabetes. Variable amputación.**

Tabla de supervivencia							
Diabetes	Tiempo	Estado	Proporción acumulada que sobrevive hasta el momento		Nº de eventos acumulados	Nº de casos que permanecen	
			Estimación	Error típico			
No	1	5,800	No	.	.	0	26
	2	6,233	Si	,962	,038	1	25
	3	7,733	Si	,923	,052	2	24
	4	10,400	Si	,885	,063	3	23
	5	17,600	Si	,846	,071	4	22
	6	20,667	Si	,808	,077	5	21
	7	26,833	No	.	.	5	20
	8	26,833	No	.	.	5	19
	9	41,800	Si	.	.	6	18
	10	41,800	Si	,723	,090	7	17
	11	42,267	No	.	.	7	16
	12	46,233	No	.	.	7	15
	13	47,733	No	.	.	7	14
	14	49,767	No	.	.	7	13
	15	51,067	No	.	.	7	12
	16	59,533	No	.	.	7	11
	17	61,633	No	.	.	7	10
	18	65,067	No	.	.	7	9
	19	82,133	No	.	.	7	8
	20	93,467	No	.	.	7	7
	21	93,467	No	.	.	7	6
	22	96,467	No	.	.	7	5
	23	96,467	No	.	.	7	4
	24	106,467	No	.	.	7	3
	25	106,467	No	.	.	7	2
	26	111,700	No	.	.	7	1
	27	111,700	No	.	.	7	0
Si	1	2,133	No	.	.	0	21
	2	2,733	Si	.	.	1	20
	3	2,733	Si	,905	,064	2	19
	4	3,067	Si	.	.	3	18
	5	3,067	Si	,810	,086	4	17
	6	3,167	Si	,762	,093	5	16

7	7,633	Si	,714	,099	6	15
8	10,667	Si	,667	,103	7	14
9	11,267	Si	,619	,106	8	13
10	13,267	Si	,571	,108	9	12
11	13,333	Si	,524	,109	10	11
12	18,267	No	.	.	10	10
13	19,667	Si	,471	,110	11	9
14	20,633	No	.	.	11	8
15	24,100	Si	,413	,111	12	7
16	25,100	No	.	.	12	6
17	32,267	No	.	.	12	5
18	33,367	No	.	.	12	4
19	43,500	No	.	.	12	3
20	63,300	No	.	.	12	2
21	67,633	Si	,206	,156	13	1
22	92,933	No	.	.	13	0

**Tabla 10: Tasa de Salvamento de Extremidad. Grupo Angiogénesis. Eventos en el análisis de Kaplan-Meier según pertenencia a grupo Neumopatía. Variable amputación.**

Tabla de supervivencia							
Neumopatía	Tiempo	Estado	Proporción acumulada que sobrevive hasta el momento		Nº de eventos acumulados	Nº de casos que permanecen	
			Estimación	Error típico			
No	1	3,167	Si	,971	,028	1	34
	2	5,800	No	.	.	1	33
	3	6,233	Si	,942	,040	2	32
	4	7,633	Si	,913	,048	3	31
	5	10,667	Si	,883	,055	4	30
	6	13,267	Si	,854	,060	5	29
	7	13,333	Si	,824	,065	6	28
	8	17,600	Si	,795	,069	7	27
	9	18,267	No	.	.	7	26
	10	20,633	No	.	.	7	25
	11	20,667	Si	,763	,073	8	24
	12	24,100	Si	,731	,077	9	23
	13	25,100	No	.	.	9	22
	14	26,833	No	.	.	9	21
	15	26,833	No	.	.	9	20
	16	33,367	No	.	.	9	19
	17	41,800	Si	.	.	10	18
	18	41,800	Si	,654	,086	11	17
	19	42,267	No	.	.	11	16
	20	43,500	No	.	.	11	15
	21	46,233	No	.	.	11	14
	22	47,733	No	.	.	11	13
	23	49,767	No	.	.	11	12
	24	51,067	No	.	.	11	11
	25	59,533	No	.	.	11	10
	26	61,633	No	.	.	11	9
	27	63,300	No	.	.	11	8
	28	93,467	No	.	.	11	7
	29	93,467	No	.	.	11	6
	30	96,467	No	.	.	11	5
	31	96,467	No	.	.	11	4
	32	106,467	No	.	.	11	3
	33	106,467	No	.	.	11	2
	34	111,700	No	.	.	11	1

	35	111,700	No	.	.	11	0
Si	1	2,133	No	.	.	0	13
	2	2,733	Si	.	.	1	12
	3	2,733	Si	,846	,100	2	11
	4	3,067	Si	.	.	3	10
	5	3,067	Si	,692	,128	4	9
	6	7,733	Si	,615	,135	5	8
	7	10,400	Si	,538	,138	6	7
	8	11,267	Si	,462	,138	7	6
	9	19,667	Si	,385	,135	8	5
	10	32,267	No	.	.	8	4
	11	65,067	No	.	.	8	3
	12	67,633	Si	,256	,138	9	2
	13	82,133	No	.	.	9	1
	14	92,933	No	.	.	9	0

**Tabla 11: Tasa de Salvamento de Extremidad. Grupo Angiogénesis. Eventos en el análisis de Kaplan-Meier según pertenencia a grupo Hepatopatía. Variable amputación.**

Tabla de supervivencia							
Hepatopatía	Tiempo	Estado	Proporción acumulada que sobrevive hasta el momento		Nº de eventos acumulados	Nº de casos que permanecen	
			Estimación	Error típico			
No	1	2,133	No	.	.	0	43
	2	2,733	Si	.	.	1	42
	3	2,733	Si	,953	,032	2	41
	4	3,067	Si	,930	,039	3	40
	5	3,167	Si	,907	,044	4	39
	6	5,800	No	.	.	4	38
	7	7,633	Si	,883	,049	5	37
	8	7,733	Si	,859	,053	6	36
	9	10,667	Si	,835	,057	7	35
	10	11,267	Si	,812	,060	8	34
	11	13,267	Si	,788	,063	9	33
	12	13,333	Si	,764	,065	10	32
	13	17,600	Si	,740	,068	11	31
	14	18,267	No	.	.	11	30
	15	19,667	Si	,715	,070	12	29
	16	20,633	No	.	.	12	28
	17	20,667	Si	,690	,072	13	27
	18	24,100	Si	,664	,073	14	26
	19	25,100	No	.	.	14	25
	20	26,833	No	.	.	14	24
	21	26,833	No	.	.	14	23
	22	32,267	No	.	.	14	22
	23	33,367	No	.	.	14	21
	24	42,267	No	.	.	14	20
	25	43,500	No	.	.	14	19
	26	46,233	No	.	.	14	18
	27	47,733	No	.	.	14	17
	28	49,767	No	.	.	14	16
	29	51,067	No	.	.	14	15
	30	59,533	No	.	.	14	14
	31	61,633	No	.	.	14	13
	32	63,300	No	.	.	14	12
	33	65,067	No	.	.	14	11
	34	67,633	Si	,604	,088	15	10

	35	82,133	No	.	.	15	9
	36	92,933	No	.	.	15	8
	37	93,467	No	.	.	15	7
	38	93,467	No	.	.	15	6
	39	96,467	No	.	.	15	5
	40	96,467	No	.	.	15	4
	41	106,467	No	.	.	15	3
	42	106,467	No	.	.	15	2
	43	111,700	No	.	.	15	1
	44	111,700	No	.	.	15	0
Si	1	3,067	Si	,800	,179	1	4
	2	6,233	Si	,600	,219	2	3
	3	10,400	Si	,400	,219	3	2
	4	41,800	Si	.	.	4	1
	5	41,800	Si	,000	,000	5	0

**Tabla 12: Tasa de Salvamento de Extremidad. Grupo Angiogénesis. Eventos en el análisis de Kaplan-Meier según pertenencia a grupo Hemorreológico. Variable amputación.**

Tabla de supervivencia							
Hemorreológico	Tiempo	Estado	Proporción acumulada que sobrevive hasta el momento		Nº de eventos acumulados	Nº de casos que permanecen	
			Estimación	Error típico			
No	1	3,167	Si	,957	,043	1	22
	2	5,800	No	.	.	1	21
	3	6,233	Si	,911	,060	2	20
	4	7,633	Si	,865	,072	3	19
	5	18,267	No	.	.	3	18
	6	24,100	Si	,817	,083	4	17
	7	32,267	No	.	.	4	16
	8	33,367	No	.	.	4	15
	9	41,800	Si	.	.	5	14
	10	41,800	Si	,708	,101	6	13
	11	43,500	No	.	.	6	12
	12	49,767	No	.	.	6	11
	13	61,633	No	.	.	6	10
	14	63,300	No	.	.	6	9
	15	65,067	No	.	.	6	8
	16	82,133	No	.	.	6	7
	17	92,933	No	.	.	6	6
	18	93,467	No	.	.	6	5
	19	93,467	No	.	.	6	4
	20	96,467	No	.	.	6	3
	21	96,467	No	.	.	6	2
	22	106,467	No	.	.	6	1
	23	106,467	No	.	.	6	0
Si	1	2,133	No	.	.	0	25
	2	2,733	Si	.	.	1	24
	3	2,733	Si	,920	,054	2	23
	4	3,067	Si	.	.	3	22
	5	3,067	Si	,840	,073	4	21
	6	7,733	Si	,800	,080	5	20
	7	10,400	Si	,760	,085	6	19
	8	10,667	Si	,720	,090	7	18
	9	11,267	Si	,680	,093	8	17
	10	13,267	Si	,640	,096	9	16
	11	13,333	Si	,600	,098	10	15

	12	17,600	Si	,560	,099	11	14
	13	19,667	Si	,520	,100	12	13
	14	20,633	No	.	.	12	12
	15	20,667	Si	,477	,101	13	11
	16	25,100	No	.	.	13	10
	17	26,833	No	.	.	13	9
	18	26,833	No	.	.	13	8
	19	42,267	No	.	.	13	7
	20	46,233	No	.	.	13	6
	21	47,733	No	.	.	13	5
	22	51,067	No	.	.	13	4
	23	59,533	No	.	.	13	3
	24	67,633	Si	,318	,146	14	2
	25	111,700	No	.	.	14	1
	26	111,700	No	.	.	14	0

**Tabla 13: Tasa de Salvamento de Extremidad. Grupo Angiogénesis. Eventos en el análisis de Kaplan-Meier según pertenencia a Enfermedad de Buerger. Variable amputación.**

Tabla de supervivencia							
Enfermedad de Buerger	Tiempo	Estado	Proporción acumulada que sobrevive hasta el momento		Nº de eventos acumulados	Nº de casos que permanecen	
			Estimación	Error típico			
No	1	2,133	No	.	.	0	34
	2	2,733	Si	.	.	1	33
	3	2,733	Si	,941	,040	2	32
	4	3,067	Si	.	.	3	31
	5	3,067	Si	,882	,055	4	30
	6	3,167	Si	,853	,061	5	29
	7	7,633	Si	,824	,065	6	28
	8	7,733	Si	,794	,069	7	27
	9	10,400	Si	,765	,073	8	26
	10	10,667	Si	,735	,076	9	25
	11	11,267	Si	,706	,078	10	24
	12	13,267	Si	,676	,080	11	23
	13	13,333	Si	,647	,082	12	22
	14	17,600	Si	,618	,083	13	21
	15	18,267	No	.	.	13	20
	16	19,667	Si	,587	,085	14	19
	17	20,633	No	.	.	14	18
	18	20,667	Si	,554	,086	15	17
	19	24,100	Si	,522	,087	16	16
	20	25,100	No	.	.	16	15
	21	32,267	No	.	.	16	14
	22	33,367	No	.	.	16	13
	23	42,267	No	.	.	16	12
	24	43,500	No	.	.	16	11
	25	49,767	No	.	.	16	10
	26	51,067	No	.	.	16	9
	27	63,300	No	.	.	16	8
	28	65,067	No	.	.	16	7
	29	67,633	Si	,447	,102	17	6
	30	82,133	No	.	.	17	5
	31	92,933	No	.	.	17	4
	32	93,467	No	.	.	17	3
	33	93,467	No	.	.	17	2
	34	106,467	No	.	.	17	1

	35	106,467	No	.	.	17	0
Si	1	5,800	No	.	.	0	13
	2	6,233	Si	,923	,074	1	12
	3	26,833	No	.	.	1	11
	4	26,833	No	.	.	1	10
	5	41,800	Si	.	.	2	9
	6	41,800	Si	,738	,131	3	8
	7	46,233	No	.	.	3	7
	8	47,733	No	.	.	3	6
	9	59,533	No	.	.	3	5
	10	61,633	No	.	.	3	4
	11	96,467	No	.	.	3	3
	12	96,467	No	.	.	3	2
	13	111,700	No	.	.	3	1
	14	111,700	No	.	.	3	0

**Tabla 14: Tasa de Supervivencia. Grupo Angiogénesis. Eventos en el análisis de Kaplan-Meier según diagnóstico de Diabetes. Variable Exitus.**

Tabla de supervivencia							
Diabetes	Tiempo	Estado	Proporción acumulada que sobrevive hasta el momento		N° de eventos acumulados	N° de casos que permanecen	
			Estimación	Error típico			
No	1	5,800	No	.	.	0	22
	2	6,233	No	.	.	0	21
	3	7,733	No	.	.	0	20
	4	10,400	No	.	.	0	19
	5	17,600	No	.	.	0	18
	6	20,667	No	.	.	0	17
	7	26,833	No	.	.	0	16
	8	26,833	No	.	.	0	15
	9	41,800	No	.	.	0	14
	10	41,800	No	.	.	0	13
	11	42,267	No	.	.	0	12
	12	46,233	No	.	.	0	11
	13	47,733	No	.	.	0	10
	14	49,767	No	.	.	0	9
	15	51,067	No	.	.	0	8
	16	59,533	No	.	.	0	7
	17	61,633	No	.	.	0	6
	18	65,067	Si	,833	,152	1	5
	19	82,133	No	.	.	1	4
	20	93,467	Si	,625	,213	2	3
	21	96,467	No	.	.	2	2
	22	106,467	No	.	.	2	1
	23	111,700	No	.	.	2	0
Si	1	2,133	No	.	.	0	20
	2	2,733	Si	,950	,049	1	19
	3	3,067	No	.	.	1	18
	4	3,067	No	.	.	1	17
	5	3,167	No	.	.	1	16
	6	7,633	Si	,891	,073	2	15
	7	10,667	No	.	.	2	14
	8	11,267	Si	,827	,092	3	13
	9	13,267	No	.	.	3	12
	10	13,333	No	.	.	3	11
	11	18,267	Si	,752	,110	4	10

	12	19,667	No	.	.	4	9
	13	20,633	No	.	.	4	8
	14	24,100	Si	,658	,130	5	7
	15	25,100	Si	,564	,142	6	6
	16	32,267	Si	,470	,146	7	5
	17	33,367	Si	,376	,144	8	4
	18	43,500	No	.	.	8	3
	19	63,300	No	.	.	8	2
	20	67,633	Si	,188	,151	9	1
	21	92,933	Si	,000	,000	10	0

**Tabla 15: Tasa de Supervivencia. Grupo Angiogénesis. Eventos en el análisis de Kaplan-Meier según antecedente de cirugía cardíaca. Variable Exitus.**

Tabla de supervivencia							
Corrección quirúrgica	Tiempo	Estado	Proporción acumulada que sobrevive hasta el momento		Nº de eventos acumulados	Nº de casos que permanecen	
			Estimación	Error típico			
No	1	2,133	No	.	.	0	37
	2	2,733	Si	,973	,027	1	36
	3	3,067	No	.	.	1	35
	4	3,067	No	.	.	1	34
	5	3,167	No	.	.	1	33
	6	5,800	No	.	.	1	32
	7	6,233	No	.	.	1	31
	8	7,733	No	.	.	1	30
	9	10,400	No	.	.	1	29
	10	10,667	No	.	.	1	28
	11	11,267	Si	,938	,043	2	27
	12	13,267	No	.	.	2	26
	13	13,333	No	.	.	2	25
	14	17,600	No	.	.	2	24
	15	18,267	Si	,899	,056	3	23
	16	19,667	No	.	.	3	22
	17	20,633	No	.	.	3	21
	18	20,667	No	.	.	3	20
	19	24,100	Si	,854	,069	4	19
	20	26,833	No	.	.	4	18
	21	26,833	No	.	.	4	17
	22	41,800	No	.	.	4	16
	23	41,800	No	.	.	4	15
	24	42,267	No	.	.	4	14
	25	43,500	No	.	.	4	13
	26	46,233	No	.	.	4	12
	27	47,733	No	.	.	4	11
	28	51,067	No	.	.	4	10
	29	59,533	No	.	.	4	9
	30	61,633	No	.	.	4	8
	31	65,067	Si	,747	,117	5	7
	32	67,633	Si	,641	,141	6	6
	33	82,133	No	.	.	6	5
	34	92,933	Si	,513	,161	7	4

	35	93,467	Si	,384	,164	8	3
	36	96,467	No	.	.	8	2
	37	106,467	No	.	.	8	1
	38	111,700	No	.	.	8	0
Si	1	7,633	Si	,833	,152	1	5
	2	25,100	Si	,667	,192	2	4
	3	32,267	Si	,500	,204	3	3
	4	33,367	Si	,333	,192	4	2
	5	49,767	No	.	.	4	1
	6	63,300	No	.	.	4	0

Tabla 16: DATOS DE CELULARIDAD BASAL.

	1.Leucocitos Absolutos	2.Neutrófilos Absolutos	3.Neutrófilos %	4. Linfocitos Absolutos	5. Linfocitos %	6.Monocitos Absolutos	7.Monocitos %	8.Eosinófilos Absolutos	9.Eosinófilos %	10.Basófilos Absolutos	11.Basófilos %	12.Hemoglobina	13.Hematocrito	14.Hematíes	15.Plaquetas
Caso	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.				
01	7,26	5,90	80,00	1,00	13,30	0,20	3,10	0,10	1,30	0,00	0,40				
	14,50	43,50	5,19	143,00											
02	7,26	5,90	80,00	1,00	13,30	0,20	3,10	0,10	1,30	0,00	0,40				
	14,50	43,50	5,19	143,00											
03	9,16	6,21	66,09	2,05	24,18	0,62	6,90	0,21	2,49	0,01	0,40				
	13,05	39,36	4,50	246,62											
04	9,16	6,21	66,09	2,05	24,18	0,62	6,90	0,21	2,49	0,01	0,40				
	13,05	39,36	4,50	246,62											
05	4,93	2,20	44,30	2,40	48,10	0,20	3,90	0,00	0,20	0,00	0,60				
	14,90	44,50	4,88	185,00											
06	4,93	2,20	44,30	2,40	48,10	0,20	3,90	0,00	0,20	0,00	0,60				
	14,90	44,50	4,88	185,00											
07	11,17	7,40	66,50	2,50	22,20	1,00	9,20	0,20	1,50	0,10	0,60				
	12,00	40,30	5,69	263,00											
08	13,26	10,00	76,40	1,80	13,70	1,20	9,10	0,10	0,60	0,00	0,20				
	12,00	35,30	4,60	161,00											
09	9,22	7,50	80,70	1,00	11,20	0,70	7,20	0,10	0,80	0,00	0,10				
	15,00	41,70	4,99	173,00											
10	9,22	7,50	80,70	1,00	11,20	0,70	7,20	0,10	0,80	0,00	0,10				
	15,00	41,70	4,99	173,00											
11	8,61	6,40	74,50	1,60	18,10	0,30	3,80	0,20	1,80	0,00	0,30				
	10,70	32,30	3,44	267,00											
12	8,23	5,00	60,90	2,60	31,10	0,40	4,70	0,20	2,90	0,00	0,40				
	14,50	43,60	4,81	230,00											
13	10,98	7,90	71,70	2,20	20,10	0,70	6,60	0,20	1,50	0,00	0,10				
	12,80	37,70	4,20	333,00											
14	8,24	3,60	43,20	3,80	46,20	0,70	7,90	0,20	2,50	0,00	0,20				
	12,00	36,80	4,07	217,00											
15	7,29	4,40	59,90	2,20	30,50	0,40	4,80	0,10	1,50	0,00	0,20				
	13,40	38,30	4,34	231,00											
16	6,33	3,80	59,30	1,50	23,70	0,90	14,50	0,10	2,20	0,00	0,30				
	12,00	36,60	4,41	201,00											
17	12,10	7,18	59,69	3,14	26,00	1,30	10,80	0,38	3,17	0,06	0,48				
	15,30	45,50	4,67	254,00											
18	6,63	4,30	65,50	1,60	24,10	0,50	6,90	0,20	3,00	0,00	0,50				
	14,80	41,70	4,73	163,00											
19	7,18	3,20	44,20	2,90	40,20	0,50	6,20	0,30	4,10	0,00	1,60				
	11,90	37,50	3,91	206,00											
20	12,63	9,40	74,60	1,70	13,50	1,00	7,90	0,50	3,60	0,10	0,40				
	8,90	29,40	3,18	434,00											
21	5,00	4,30	72,20	1,00	13,30	0,20	4,10	0,20	4,10	0,00	0,50				
	14,70	40,30	4,77	123,00											
22	9,10	6,40	70,20	2,00	22,00	0,50	5,30	0,20	2,30	0,00	0,20				
	13,40	40,80	4,75	232,00											
23	6,73	3,30	49,90	2,40	36,30	0,90	12,80	0,10	1,20	0,10	0,70				
	9,00	29,20	4,28	370,00											
24	10,38	7,20	69,60	2,10	20,30	0,70	6,40	0,20	2,30	0,00	0,30				
	12,20	38,30	4,30	263,00											

25	7,19	4,90	68,00	1,50	20,90	0,60	8,80	0,10	1,90	0,00	0,40
	13,50	39,60	4,47	245,00							
26	11,42	6,10	53,50	3,60	31,30	0,80	7,30	0,90	7,50	0,00	0,40
	13,10	40,90	4,39	331,00							
27	10,16	6,40	62,60	2,80	27,00	0,60	5,90	0,30	2,90	0,00	0,20
	13,10	38,30	4,77	260,00							
28	7,84	4,90	62,40	2,20	27,40	0,60	8,10	0,00	0,30	0,00	0,10
	11,30	32,90	3,90	393,00							
29	10,00	7,00	69,80	2,00	20,40	0,80	8,20	0,10	1,40	0,00	0,20
	11,40	34,20	3,92	168,00							
30	5,44	3,60	65,20	1,20	22,00	0,40	6,80	0,20	3,20	0,00	0,80
	12,40	38,60	5,28	342,00							
31	22,16	17,50	79,20	3,80	17,00	0,50	2,30	0,20	0,70	0,00	0,30
	16,40	49,90	5,33	158,00							
32	22,16	17,50	79,20	3,80	17,00	0,50	2,30	0,20	0,70	0,00	0,30
	16,40	49,90	5,33	158,00							
33	7,90	5,40	68,40	1,50	19,10	0,50	5,90	0,30	3,90	0,00	0,40
	10,00	32,70	3,37	257,00							
34	9,36	6,60	70,40	1,90	20,60	0,40	3,80	0,20	2,50	0,00	0,50
	11,70	38,70	4,29	411,00							
35	12,86	8,80	68,20	2,40	18,60	1,50	11,40	0,20	1,30	0,10	0,50
	13,70	41,30	4,67	483,00							
36	5,38	3,30	61,70	1,20	23,20	0,30	4,70	0,30	6,50	0,00	0,50
	11,40	33,80	3,86	153,00							
37	11,40	8,00	69,50	2,50	21,90	0,80	7,10	0,10	0,90	0,10	0,60
	14,20	42,90	4,64	219,00							
38	10,08	7,40	73,30	1,70	16,40	0,80	7,50	0,30	2,60	0,00	0,20
	10,70	34,90	4,17	341,00							
39	9,80	6,30	64,50	2,50	25,90	0,40	4,00	0,30	3,40	0,00	0,40
	15,00	43,00	5,03	226,00							
40	9,46	5,90	62,80	2,40	25,10	0,90	9,80	0,20	2,10	0,00	0,20
	13,90	41,80	4,76	266,00							
41	11,59	8,30	71,40	2,20	19,20	0,80	6,80	0,00	2,30	0,00	0,00
	15,80	48,00	5,55	254,00							
42	6,40	4,40	68,70	1,40	21,40	0,60	8,60	0,10	1,10	0,00	0,20
	13,40	39,90	4,47	125,00							
43	7,52	4,60	60,60	1,60	20,70	0,40	4,90	1,00	13,60	0,00	0,30
	11,70	36,60	4,35	285,00							
44	6,33	4,80	75,60	0,70	11,10	0,60	10,10	0,20	3,00	0,00	0,20
	11,20	33,10	3,91	152,00							
45	8,82	5,90	66,50	1,80	66,50	0,80	9,00	0,30	3,10	0,00	0,50
	12,00	37,10	4,16	196,00							
46	7,68	4,50	58,20	2,20	28,60	0,70	9,40	0,20	2,90	0,10	0,90
	10,70	32,70	3,51	313,00							
47	8,49	4,70	55,70	3,00	35,30	0,50	6,10	0,20	2,20	0,10	0,70
	14,20	41,50	4,58	262,00							
48	7,67	6,30	82,20	0,70	8,90	0,60	7,60	0,10	1,20	0,00	0,10
	12,00	34,20	3,82	313,00							
49	9,45	5,40	57,20	2,96	31,40	0,65	6,90	0,21	2,20	0,03	0,30
	15,20	50,00	5,21	235,00							
50	6,68	4,60	69,50	1,20	17,40	0,60	8,50	0,20	3,60	0,10	1,00
	13,80	40,00	4,46	342,00							

Tabla 17: DATOS CELULARIDAD AFÉRESIS

	1.Leucocitos Absolutos	2.Neutrófilos Absolutos	3.Neutrófilos %	4. Linfocitos Absolutos	5. Linfocitos %	6.Monocitos Absolutos	7.Monocitos %	8.Eosinófilos Absolutos	9.Eosinófilos %	10.Basófilos Absolutos	11.Basófilos %	12.Hemoglobina	13.Hematocrito	14.Hematíes	15.Plaquetas
Caso	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.				
	12.	13.	14.	15.											
01	24,66	22,60	91,90	1,20	5,00	0,40	1,60	0,20	1,00	0,00	0,20				
	12,40	36,20	4,46	103,00											
02	24,66	22,60	91,90	1,20	5,00	0,40	1,60	0,20	1,00	0,00	0,20				
	12,40	36,20	4,46	103,00											
03	52,17	40,50	77,60	0,00	0,00	0,32	0,60	10,83	20,80	0,52	1,00				
	13,80	46,20	6,85	237,00											
04	52,17	40,50	77,60	0,00	0,00	0,32	0,60	10,83	20,80	0,52	1,00				
	13,80	46,20	6,85	237,00											
05	27,82	19,80	71,00	5,00	17,80	0,80	2,90	2,10	7,50	0,00	0,60				
	14,50	42,10	4,48	160,00											
06	27,82	19,80	71,00	5,00	17,80	0,80	2,90	2,10	7,50	0,00	0,60				
	14,50	42,10	4,48	160,00											
07	28,93	25,40	87,90	1,90	6,70	1,20	4,00	0,30	1,20	0,10	0,20				
	10,20	33,90	4,66	237,00											
08	25,45	20,00	79,30	2,80	11,20	2,20	8,60	0,20	0,70	0,10	0,20				
	11,70	34,70	4,51	231,00											
09	36,78	31,70	86,10	3,90	10,60	0,60	1,70	0,40	1,00	0,00	0,30				
	14,10	39,90	4,86	185,00											
10	36,78	31,70	86,10	3,90	10,60	0,60	1,70	0,40	1,00	0,00	0,30				
	14,10	39,90	4,86	185,00											
11	33,89	29,20	86,10	3,20	9,30	0,90	2,60	0,40	1,20	0,00	0,40				
	9,20	27,80	3,04	183,00											
12	31,43	25,70	81,90	3,60	11,50	1,60	5,20	0,40	1,30	0,00	1,00				
	14,40	43,40	4,73	198,00											
13	61,30	47,20	77,00	9,20	15,00	0,50	0,80	4,00	6,60	0,00	0,60				
	13,40	38,70	4,39	325,00											
14	63,00	6,90	11,00	0,00	0,00	1,10	1,70	54,40	86,30	1,00	1,00				
	12,10	33,80	3,85	243,00											
15	6,94	4,60	66,60	1,70	25,10	0,20	2,90	0,10	1,70	0,00	0,30				
	12,40	34,10	3,94	152,00											
16	32,00	26,60	83,00	3,70	11,60	1,20	3,80	0,30	0,90	0,00	0,30				
	11,80	35,90	4,04	198,00											
17	34,90	25,90	73,90	6,70	19,10	1,10	3,10	1,00	2,80	0,00	0,50				
	13,10	38,40	4,45	282,00											
18	32,07	26,90	84,00	2,60	7,90	1,30	4,10	0,50	1,70	0,00	0,30				
	13,80	38,40	4,24	148,00											
19	23,72	17,80	75,20	3,50	14,50	1,00	4,20	0,90	3,90	0,00	0,40				
	12,10	34,80	4,03	177,00											
20	37,93	32,10	84,70	0,50	1,40	1,10	2,80	4,00	10,60	0,00	0,30				
	8,80	27,50	2,99	454,00											
21	28,06	24,60	87,60	1,70	6,20	1,40	5,10	0,30	0,90	0,10	0,20				
	15,60	43,90	5,29	109,00											
22	31,41	26,30	83,80	2,10	6,80	2,30	7,40	0,60	1,80	0,10	0,20				
	11,10	34,10	3,96	165,00											
23	43,00	36,00	83,80	3,80	8,80	2,30	5,20	0,20	0,50	0,00	0,20				
	15,30	46,00	5,63	360,00											
24	50,22	44,70	89,00	3,30	6,50	1,50	3,10	0,60	0,60	0,00	0,20				
	11,20	30,90	3,48	239,00											
25	27,36	24,00	87,50	1,80	6,60	1,10	4,00	0,30	0,90	0,00	0,30				
	12,80	38,60	4,37	340,00											

26	55,27	44,30	78,80	7,40	13,10	2,30	4,10	1,60	2,80	0,00	0,30
	13,10	38,30	4,34	371,00							
27	28,35	23,90	88,20	2,90	10,40	1,00	3,40	0,30	1,20	0,00	0,30
	13,70	39,70	4,96	277,00							
28	43,24	36,20	81,30	5,50	12,70	1,40	3,10	0,20	0,40	0,00	0,20
	11,10	33,00	3,96	517,00							
29	17,94	14,50	80,90	2,60	14,20	0,50	2,80	0,20	0,90	0,00	0,30
	12,90	37,60	4,16	193,00							
30	25,00	20,90	83,50	1,97	7,80	1,67	6,67	0,48	1,91	0,01	0,04
	12,20	37,20	4,95	306,00							
31	21,15	16,50	77,90	4,00	18,80	0,40	1,80	0,10	0,70	0,00	0,30
	16,40	50,00	5,33	89,00							
32	21,15	16,50	77,90	4,00	18,80	0,40	1,80	0,10	0,70	0,00	0,30
	16,40	50,00	5,33	89,00							
33	31,53	27,90	88,40	1,30	4,10	1,50	4,80	0,60	1,80	0,00	0,20
	11,50	36,80	3,77	380,00							
34	28,84	26,17	90,70	1,31	4,60	0,82	2,80	0,38	1,30	0,05	0,20
	11,80	39,30	4,34	346,00							
35	47,00	35,90	76,40	5,70	12,10	1,10	2,50	3,70	7,90	1,00	1,10
	13,50	39,90	4,35	656,00							
36	16,37	13,30	81,00	2,10	12,80	0,50	3,10	0,40	2,50	0,00	0,30
	11,30	34,80	3,90	98,00							
37	42,84	37,50	87,40	2,90	6,90	2,20	5,10	0,20	0,40	0,10	0,20
	13,20	40,50	4,47	229,00							
38	40,46	33,10	82,00	4,30	10,60	2,40	6,00	0,50	1,20	0,10	0,20
	11,10	36,10	4,31	190,00							
39	46,69	43,30	92,70	0,10	0,20	0,80	1,80	2,30	5,00	0,00	0,30
	15,40	43,40	5,02	178,00							
40	37,11	31,60	85,00	0,10	0,30	0,60	1,60	4,70	12,70	0,00	0,30
	11,70	35,90	3,89	224,00							
41	36,56	32,60	89,20	0,10	0,40	0,60	1,70	3,10	8,50	0,00	0,20
	14,40	43,90	4,81	183,00							
42	8,13	7,00	86,60	0,60	6,90	0,50	6,20	0,00	0,20	0,00	0,10
	13,50	40,20	4,26	128,00							
43	35,60	26,50	74,40	4,30	12,10	2,70	7,60	2,00	5,70	0,10	0,20
	11,60	34,80	4,20	307,00							
44	23,98	20,00	83,50	1,60	6,80	1,30	5,40	0,30	1,40	0,00	0,20
	11,30	32,90	4,22	282,00							
45	11,15	7,50	67,10	2,50	22,40	0,50	4,90	0,40	3,50	0,00	0,30
	12,90	36,90	4,44	319,00							
46	35,26	29,85	84,70	2,97	8,40	1,93	5,50	0,44	1,20	0,07	0,20
	10,60	32,60	3,56	307,00							
47	54,55	47,60	87,20	4,40	8,00	1,60	3,00	0,50	0,90	0,00	0,30
	13,10	39,00	4,03	315,00							
48	20,50	16,80	82,00	2,40	11,40	1,10	5,40	0,20	1,00	0,00	0,20
	13,60	42,80	4,55	265,00							
49	24,44	18,90	73,30	3,40	13,80	1,10	7,90	0,20	0,70	0,00	0,30
	15,30	44,50	4,67	255,00							
50	28,80	24,00	83,20	2,65	9,21	1,79	6,23	0,29	1,02	0,10	0,36
	14,20	41,60	4,59	283,00							

Tabla 18: DATOS CELULARIDAD INÓCULO

	<b>1. Leucocitos 10<sup>3</sup>/μl</b>	<b>2. Plaquetas 10<sup>3</sup>/μl</b>	<b>3. Neutrofilos %</b>	<b>4. CD34+ %</b>	<b>5. CD3+ %</b>	<b>6. CNT 10<sup>6</sup>/ml</b>	<b>7. CNT 10<sup>8</sup></b>	<b>8. CMN 10<sup>8</sup></b>	<b>9. CMN 10<sup>8</sup>/kg</b>	<b>10. CD34+ 10<sup>6</sup></b>	<b>11. CD34+ 10<sup>6</sup>/kg</b>	<b>12. CD3+ 10<sup>7</sup></b>	<b>13. CD3+ 10<sup>7</sup>/kg</b>
	CNT : Células Nucleadas Totales						CMN: Células MonoNucleadas						
Caso	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>3.</b>	<b>4.</b>	<b>5.</b>	<b>6.</b>	<b>7.</b>	<b>8.</b>	<b>9.</b>	<b>10.</b>	<b>11.</b>	<b>12.</b>	<b>13.</b>
01	27.43 918.91	527.00	2.40 10.44	1.30	67.00	274.30	137.15	133.86	1.52	178.30	2.03		
02	13.53 263.84	257.00	4.20 3.00	1.17	39.00	135.30	67.65	64.81	0.74	79.15	0.90		
03	15.80 513.00	1,196.00	2.60 8.35	0.01	65.00	158.00	79.00	76.95	1.25	79.00	0.01		
04	23.69 722.55	1,077.00	0.50 11.75	0.18	61.00	236.90	118.45	117.86	1.92	21.32	0.35		
05	92.50 2,312.50	515.00	4.40 23.13	0.18	50.00	925.00	462.50	442.15	4.42	83.25	0.83		
06	54.07 1,189.54	385.00	10.20 11.90	0.18	44.00	540.00	270.35	242.77	2.43	48.66	0.49		
07	42.18 991.23	583.00	2.40 13.22	0.11	47.00	421.80	210.90	205.84	2.74	23.20	0.31		
08	40.80 734.40	676.00	8.20 10.42	0.64	36.00	408.00	204.00	187.27	2.66	130.56	1.85		
09	61.76 802.88	415.00	40.80 7.17	0.29	26.00	617.60	308.80	182.81	1.63	89.55	0.80		
10	48.58 461.51	266.00	33.10 4.12	0.13	19.00	485.80	242.90	162.50	1.45	31.58	0.28		
11	44.04 550.50	445.00	11.30 11.10	0.41	25.00	440.40	220.20	195.32	3.91	90.28	1.81		
12	47.56 1,450.58	482.00	1.40 22.32	0.44	61.00	475.60	237.80	234.47	3.61	104.63	1.61		
13	74.00 855.37	661.00	25.50 9.61	0.28	23.00	743.80	371.90	277.07	3.11	104.13	1.17		
14	74.35 1,895.93	757.00	1.80 37.18	0.23	51.00	743.50	371.75	365.06	7.16	85.50	1.68		
15	28.49 569.80	623.00	4.40 8.14	0.05	40.00	284.90	142.45	136.18	1.95	7.12	0.10		
16	44.29 752.93	563.00	13.90 10.60	0.09	34.00	442.90	221.45	190.67	2.69	19.93	0.28		
17	51.90 1,271.55	959.00	1.60 15.70	0.40	49.00	519.00	259.50	255.35	3.15	103.80	1.28		
18	47.69 1,073.03	357.00	1.90 13.41	0.22	45.00	476.90	238.45	233.92	2.92	52.46	0.66		
19	49.46 1,112.85	347.00	6.30 17.39	0.24	45.00	494.60	247.30	231.72	3.62	59.35	0.93		
20	84.34 421.70	196.00	52.30 5.62	0.06	10.00	843.40	421.70	201.15	2.68	25.30	0.34		
21	23.32	444.00	1.20	1.25		233.20	116.60	115.20	1.24	145.75	1.57		
22	36.95	431.00	4.30	0.28		369.50	184.75	176.81	2.76	51.18	0.80		
23	47.24 1,062.90	880.00	1.40 14.17	0.29	45.00	472.00	236.00	232.89	3.11	68.50	0.91		
24	111.00 499.50	112.00	39.80 6.66	0.63	9.00	1,110.00	555.00	334.11	4.45	349.65	4.66		

25	29.15 364.38	546.00	12.20 4.99	0.12	25.00	291.50	145.75	127.97	1.75	17.49	0.24
26	92.05 2,393.04	964.00	3.80 44.73	0.80	52.00	920.40	460.20	442.71	8.27	368.16	6.88
27	43.52 1,174.04	665.00	2.50 18.36	0.46	54.00	435.20	217.60	212.16	3.32	100.10	1.56
28	17.04 30.33	235.00	14.30 0.47	0.52	2.00	170.40	151.66	129.97	2.03	78.41	1.23
29	12.11 421.31	72.00	5.70 5.62	0.29	49.00	121.10	85.98	81.08	1.08	24.93	0.33
30	5.00 10.78	137.00	30.00 0.13	0.44	28.00	50.00	38.50	26.95	0.34	16.98	0.21
31	49.00 1,078.00	748.00	6.50 16.58	0.25	44.00	490.00	245.00	229.08	3.52	61.25	0.94
32	34.02 697.41	405.00	6.60 10.73	0.25	41.00	340.20	170.10	158.87	2.44	42.53	0.65
33	59.02 826.28	769.00	11.90 10.33	0.14	28.00	590.20	295.10	259.98	3.25	41.31	0.52
34	42.68 832.26	959.00	6.80 8.76	0.12	39.00	426.80	213.40	198.89	2.09	25.61	0.27
35	53.38 1,601.40	993.00	5.90 25.83	0.36	60.00	533.80	266.90	251.15	4.05	96.08	1.55
36	22.66 566.50	231.00	0.90 9.77	0.17	50.00	226.60	113.30	112.28	1.94	19.26	0.33
37	59.84 1,077.12	780.00	4.80 12.82	0.24	36.00	598.40	299.20	284.84	3.39	71.81	0.85
38	28.49	373.00	0.30	0.31		284.90	142.45	142.02	1.63	44.16	0.51
39	42.02	484.00	15.40	0.19		420.20	210.10	177.74	2.09	39.92	0.47
40	67.45 978.03	820.00	20.70 13.97	0.23	29.00	674.50	337.50	267.44	3.82	77.57	1.11
41	46.17	848.00	2.90	0.22		461.70	230.85	224.16	2.49	50.79	0.56
42	44.01 484.11	542.00	12.40 6.54	0.22	22.00	440.10	220.05	192.76	2.60	48.41	0.65
43	65.02 1,267.89	830.00	9.90 22.64	0.59	39.00	650.20	325.10	292.92	5.23	191.81	3.43
44	34.11	79.00	3.30	0.08		341.10	170.55	164.92	1.87	13.64	0.16
45	34.68	601.00	2.80	0.05		346.80	173.40	168.54	1.87	8.67	0.10
46	35.29 882.25	323.00	1.00 12.79	0.18	50.00	352.90	176.45	174.69	2.53	31.76	0.46
47	15.05 114.83	107.00	15.10 1.55	0.26	7.00	150.50	164.05	139.27	1.88	42.00	0.57
48	17.00 535.50	82.30	14.90 6.61	0.42	35.00	170.00	153.00	130.20	1.61	63.50	0.78
49	3.60 64.98	134.00	47.98 0.76	0.17	19.00	36.00	34.20	17.79	0.21	56.00	0.07
50	25.40 50.80	87.30	36.10 0.78	0.34	25.00	254.00	203.20	129.84	2.00	69.70	1.07

**INFORME DEL COMITÉ ETICO DE INVESTIGACIÓN CLINICA DE LES ILLES BALEARS**

**Dra. Olga Delgado Sánchez, presidenta del COMITÉ ETICO DE INVESTIGACIÓN CLINICA DE LES ILLES BALEARS**

**CERTIFICA:**

Que este Comité, en reunión 01/03 de día 22 de enero de 2003, revisó la propuesta de los Drs. J. Besalduch del servicio de hematología y F.T. Gómez del servicio de cirugía vascular del Hospital Son Dureta, para que se realice el ensayo clínico N° **IB 138/02** denominado **ANGIOGENESIS TERAPEUTICA EN PACIENTES CON ISQUEMIA DE MIEMBROS INFERIORES MEDIANTE TRASPLANTE AUTOLOGO DE CELULAS HEMATOPOYETICAS**. Y en reunión 04/03 de día 26 de marzo de 2003 revisó las aclaraciones solicitadas el 22/01/03.

Y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.

La capacidad de el/los investigador/es y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el ensayo.

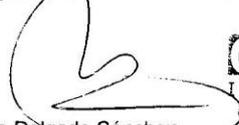
El promotor garantiza la confidencialidad de los datos de los pacientes.

El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Y que este Comité **ACEPTA** que dicho ensayo clínico sea realizado por el investigador principal y en el Centro, arriba mencionados.

**En cuanto al seguimiento del ensayo es necesario que se informe al Comité de los siguientes aspectos: fecha de inicio, fecha de terminación, nº de pacientes reclutados, acontecimientos adversos y resumen de resultados.**

Lo que firmo en Palma de Mallorca a 26 de marzo de 2003

  
 comitè ètic  
d'investigació  
clínica  
ILLES BALEARS  
Conselleria de Salut i Consum  
Olga Delgado Sánchez  
PRESIDENTA CEIC Illes Balears



## ABREVIATURAS



## ABREVIATURAS

AC	Anticoagulante
AG	Antiagregante
AAS	Acido Acetilsalicílico
ADN	Ácido Desoxirribo-Nucleico
AIT	Accidente Isquémico Transitorio
Ang	Angiopietina
ARA-II	Antagonista del Receptor de Angiotensina II
ASC	Células Madre del tejido Adiposo
CA	Cardiopatía Arritmogénica
CI	Claudicación Intermitente
CIsq	Cardiopatía Isquémica
CQ	Corrección Quirúrgica (de la cardiopatía)
CV	Cardiopatía Valvular
CEC	Célula Endotelial Circulante
CPH	Células Progenitoras Hematopoyéticas
COX	Ciclooxigenasa
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CSF	Factor Estimulante de Colonias ( <i>Colony Stimulating Factor</i> )
DM	Diabetes Mellitus
DLP	Dislipemia
EC/CE	Endothelial Cell/Célula Endotelial
EAP	Enfermedad Arterial Periférica
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico / Nepidermina ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )
eNOS	Óxido Nitrico Sintetasa endotelial ( <i>endothelial Nitric Oxide Synthetase</i> )
EPC/CPE	Endothelial Progenitor Cell/Célula Progenitora Endotelial
EPO	Eritropoyetina
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Factor de Crecimiento Fibroblástico ( <i>Fibroblastic Growth Factor</i> )
FRV	Factores de riesgo vascular
G-CSF	Factor Estimulante de Colonias Granulocitarias ( <i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i> )
GM-CSF	Factor Estimulante de colonias Granulo-monocitarias
HP	Hepatopatía
HGF	Factor de Crecimiento Hepatocitario ( <i>Hepatocyte Growth Factor</i> )
HIF	Factor Inducido por la Hipoxia ( <i>Hypoxia Induced Factor</i> )
HTA	Hipertensión Arterial

HBPM	Heparina de Bajo Peso Molecular
HUSD	Hospital Universitario Son Dureta
HUSE	Hospital Universitario Son Espases
HBA1c	Hemoglobina Glicosilada
IL	Interleucina
ICA	Insuficiencia Cardíaca
IGF-1	Factor de Crecimiento Insulínico ( <i>Insulin-like Growth Factor</i> )
IRC	Insuficiencia Renal Crónica
ITB	Índice Tobillo-Brazo
ICAM	Molécula de Adhesión Intercelular ( <i>Intra-Cellular Adhesion Molecule</i> )
ICMI	Isquemia Crítica de Miembros Inferiores
IECA	Inhibidor del Enzima Conversor de Angiotensina
iPSC	Células Pluripotentes inducidas ( <i>induced Pluripotent Stem Cell</i> )
LDL	Lipoproteína de baja densidad ( <i>Low Density Lipoprotein</i> )
LOX-1	Receptor de la LDL oxidada ( <i>Oxidized LDL receptor-1</i> )
MCP-1	Proteína Quimioattractiva Monocítica (Monocyte Chemoattractant Protein)
MMP	Proteína de degradación de la Matriz / Metaloproteínasa ( <i>Matrix MetalloProteinase</i> )
MSC	Células Madre Mesenquimales ( <i>Mesenchymal Stem Cell</i> )
NM	Neumopatía
NRL	Antecedente Neurológico previo (AIT/Ictus)
ON	Óxido Nítrico
O2Cron	Oxigenoterapia crónica domiciliaria
PC	Pericito
PGI-2	Prostaglandina I-2
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas ( <i>Platelet Derived Growth Factor</i> )
PEDF	Factor Pigmentario Derivado del Epitelio ( <i>Pigment Epithelium-Derived Factor</i> )
PECAM-1	Molécula de Adhesión Celular Endotelio-Plaquetar/CD31 ( <i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i> )
SDF	Factor Derivado de células del Estroma ( <i>Stromal Derived Factor</i> )
SAHS	Síndrome de Apnea/Hipopnea del Sueño
TGF	Factor de Crecimiento Tumoral ( <i>Tumor Growth Factor</i> )
TNF	Factor de Necrosis Tumoral ( <i>Tumor Necrosis Factor</i> )
TRC	Células Reparadoras de Tejido ( <i>Tissue Repair Cells</i> )
TSP	Trombospondina ( <i>Thrombospondine</i> )
TASC	Trans-Atlantic Society Consensus

TcO2	Presión Transcutánea de Oxígeno
VHB	Virus Hepatofílico B
VHC	Virus Hepatofílico C
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VEGF	Factor de Crecimiento Vascular Endotelial ( <i>Vascular Endotelial Growth Factor</i> )