

**“ANGIOGENESIS TERAPEUTICA CON CELULAS MADRE EN PACIENTES
CON ENFERMEDAD ARTERIAL OCLUSIVA CRONICA DEL HOSPITAL
MILITAR CENTRAL, IMPACTO CLINICO LUEGO DE SEIS AÑOS”**

INVESTIGADORES

TC. Daniel Fernando Carrillo Díaz, MD Esp.

Oficial Médico – Fuerza Aérea Colombiana
Cirujano General
Fellow Cirugía Vascul ar y Angiología UMNG - HMC

Diego Armando Ferreira Fonseca, MD Esp.

Cirujano General
Fellow Cirugía Vascul ar y Angiología UMNG - HMC

BG(RA) Carlos Arturo Franco Corredor, MD Esp.

Oficial Médico – Ejército Nacional
Cirujano General y Cirujano Vascul ar
Universidad Militar Nueva Granada – Hospital Militar Central

Luz Mabel Avila Portillo, MD

Jefe Unidad Investigación Científica
Subdirección de Docencia e Investigación Científica
Hospital Militar Central

Luis Fernando García Valencia, MD Esp.

Cirugía General y Cirugía Vascul ar
Universidad Militar Nueva Granada - Hospital Militar Central

SERVICIO DE CIRUGIA VASCULAR Y ANGIOLOGIA
HOSPITAL MILITAR CENTRAL
CODIGO ANTEPROYECTO: 2015-125.
FECHA: JUNIO/2016

INFORMACION DE LOS INVESTIGADORES

DR. DIEGO ARMANDO FERREIRA FONSECA

diegof1280@hotmail.com

Celular: 3043802775

TC. DANIEL FERNANDO CARRILLO DIAZ

dfcd75@hotmail.com

Celular: 3002471765

BG. CARLOS ARTURO FRANCO CORREDOR

cfrancocorredor@gmail.com

Celular: 3108095197

DRA. LUZ MABEL AVILA PORTILLO

mabelavila_us@yahoo.com

Celular: 3154987405

DR. LUIS FERNANDO GARCIA VALENCIA

fegava1@hotmail.com

Celular: 3138318029

TABLA DE CONTENIDO

	Página
1. Resumen	4
2. Marco teórico	5
3. Identificación y formulación del problema.	12
4. Justificación	14
5. Objetivos	15
6. Hipótesis	15
7. Aspectos Metodológicos	16
7.1. Tipo de Estudio	16
7.2. Población	16
7.3. Tabla de Variables	16
7.4. Medición E Instrumento A Utilizar	16
7.5. Análisis Estadístico	18
8. Aspectos Éticos	19
9. Resultados/Productos Esperados Y Potenciales Beneficiarios	20
10. Cronograma	21
11. Presupuesto	22
12. Desarrollo de Protocolo	23
12.1 Resultados	23
12.2 Discusión	26
12.3 Conclusiones	28
12.4 Agradecimientos y Declaración de Conflictos de Interés.	29
13. Referencias Bibliográficas	30

1. RESUMEN

- **Introducción:** El trasplante de células madre, ha fortalecido el arsenal de alternativas terapéuticas para diversas enfermedades, entre ellas: La isquemia crítica de extremidades sin opción de revascularización. En el Hospital Militar Central, el servicio de Cirugía Vascular y Angiología ha forjado experiencia referente a la Angiogénesis Terapéutica (con células madre autólogas) para los citados sujetos.
- **Objetivo:** Describir la respuesta clínica obtenida a seis años de la aplicación del tratamiento con Angiogénesis Terapéutica (con células madre autólogas) en una serie de pacientes con Enfermedad Arterial Oclusiva crónica de miembros inferiores sin posibilidad de revascularización.
- **Materiales y Metodos:** Estudio Observacional Descriptivo tipo Serie de Casos en el Servicio de Cirugía Vascular y Angiología del Hospital Militar Central. Se incluyeron al seguimiento una serie de pacientes con isquemia crítica no revascularizable intervenidos mediante Angiogénesis Terapéutica (con células madre autólogas) en el año 2007. Utilizaremos estadística descriptiva para detallar las características poblacionales demográficas y clínicas de interés, antes y después de 6 años (Índice Tobillo Brazo, Puntaje de Dolor basada en Escala Visual Analoga, Diferenciación clínica según Fontaine, Amputación y Mortalidad).

2. MARCO TEÓRICO

La enfermedad arterial periférica (EAOC), es descrita como la lesión o estado patológico que afecta los vasos distales al corazón la cual puede ser multifactorial y está más asociada al desarrollo de depósitos de colesterol en la capa media arterial con la formación de una placa ateromatosa que causa obstrucción al flujo de sangre, ocasionando así la isquemia de la extremidad. Esta patología afecta principalmente a personas de edad avanzada, aunque en estados mórbidos como en la Hiperomocisteinemia, puede afectar personas jóvenes. Se estima que entre Estados Unidos y Europa Occidental hay unas 27 millones de personas con ésta patología y su número va en aumento, en parte al uso del tabaco y a la dieta occidental rica en grasas que conlleva a otra enfermedad llamada obesidad.

Como ya se ha mencionado su etiología es multi causal, con una prevalencia mayor en hombres sobre mujeres con relación 2:1, una alta asociación entre los fumadores quienes tienen un riesgo cuatro veces mayor sobre los no fumadores. Los pacientes diabéticos también presentan dos veces más frecuente ésta patología contra los pacientes no diabéticos. Otros factores como la hipertensión, dislipidemia, estados de hiperviscosidad sanguínea y enfermedad renal crónica han mostrado asociación menos fuerte que los previamente descritos.

Se considera a la isquemia crítica de miembros inferiores como el estado más severo de la enfermedad arterial periférica, se define como el dolor crónico en reposo, úlceras o gangrena atribuible a enfermedad arterial oclusiva (1), es una enfermedad que se asocia a un pobre pronóstico, tiene una mortalidad del 50% a los cinco años, genera una gran dependencia y una alteración de la calidad de vida de los pacientes similar a los que padecen de cáncer.

Fisiopatológicamente se evidencia oclusión al flujo sanguíneo de la extremidad lo que genera un estado de hipoxia el cual en los estados de ejercicio genera que se utilice la vía anaerobia del metabolismo con la consecuente producción de ácido láctico y se manifieste el dolor tipo claudicación el cual se define como el dolor reproducible en un segmento muscular durante el ejercicio. Durante este estado de hipoxia se estimulan diferentes factores angiogénicos que

promueven un flujo sanguíneo colateral el cual puede suplir la demanda de oxígeno a éstos músculos comprometidos. Cuando la demanda supera la oferta se llega a un punto de lesión secundaria a hipoxia y productos de degradación como radicales libres y se genera una cascada inflamatoria con la consecuente necrosis y gangrena de la extremidad.

En este estadio los pacientes presentan por lo general oclusiones severas extensas, las cuales no dan oportunidad de revascularización por ninguna técnica ya sea quirúrgica abierta o endo-vascular, en estos momentos es cuando se comienza a considerar la amputación como última opción de manejo con el fin de evitar las complicaciones que trae para el paciente el tener un miembro isquémico en proceso de necrosis. La amputación de la extremidad se realiza hasta el nivel en el que se pueda garantizar una perfusión adecuada de los tejidos.

Al llegar a este estado de severidad y al tomar en consideración la cantidad de población que se ve afectada, se ha propuesto la terapia con células madre como una opción de tratamiento en la etapa final de la enfermedad arterial periférica, todo con el fin de evitar a toda costa la amputación de la extremidad.

En 2002 Tateishi & Yuyama et al (2), fueron los primeros en publicar un estudio piloto aleatorizado controlado para evaluar células mononucleares autólogas no cultivadas de medula ósea (BMMNCs), las cuales eran reimplantadas de manera intramuscular en pacientes con isquemia crítica. Reportaron un aumento en la presión transcutánea de oxígeno y aumento del tiempo de deambulación libre de dolor.

El uso racional de esta terapia se basa en la noción de que en adición a la neovascularización adulta de la vasculatura preexistente, la vasculogénesis postnatal mediada por progenitores celulares existentes en medula ósea (BM) o progenitores celulares endoteliales circulantes (EPCs) también ocurre en adultos. (3-4)

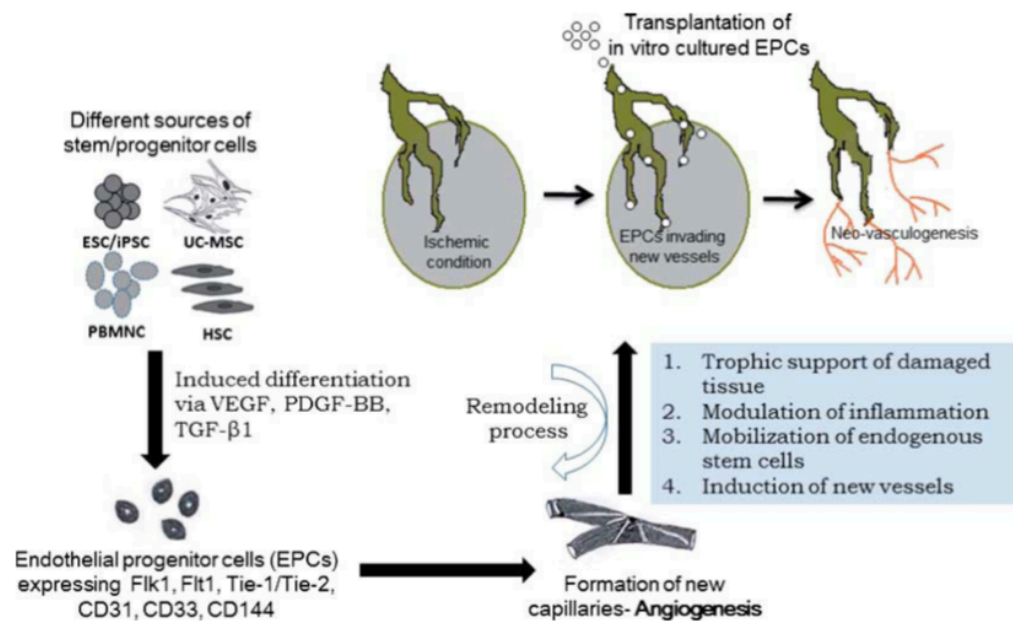
Dentro de las investigaciones realizadas por diferentes grupos a nivel mundial, se encuentra que las células madre y células progenitoras tienen un potencial rol terapéutico induciendo angiogénesis y mejorando la vascularización de los

miembros isquémicos, esto lo que logra es aumentar la perfusión distal lo suficiente para permitir la curación de las heridas, mejorar del dolor y por último salvar la extremidad afectada.

La formación de nuevos vasos sanguíneos incluye varios pasos, incluidos la proliferación y migración de EPCs, formación del lumen, ensamblaje de la membrana basal, reclutamiento de pericitos / células de musculo liso vascular, maduración vascular y por ultimo el flujo sanguíneo. Esta secuencia es orquestada por varios factores de crecimiento celular que juegan diferentes roles. (4,5,6) La ausencia de alguno de estos pasos produce vasos sanguíneos que son inmaduros, permeables y con fugas. (7)

Varios autores aseguran que para la generación de esta misma se requiere al menos tres procesos biológicos diferentes. los cuales son, la angiogénesis, la arteriogénesis y la vasculogénesis:

- Angiogénesis que es la protrusión de nuevos capilares derivados de estructuras vasculares previamente existentes.
- Arteriogénesis se refiere a el aumento del grosor de la pared y del diámetro de la luz de los nuevos vasos formados, reclutando las células musculares lisas y células peri vasculares.
- Vasculogénesis; es la formación in situ de nuevos vasos sanguíneos, derivados de células progenitoras endoteliales derivadas de medula ósea.



La angiogénesis terapéutica que incluye el uso de factores de crecimiento angiogénicos o con células madres para formación y crecimientos de vasos sanguíneos, mejora el flujo sanguíneo e incrementa la perfusión tisular en la extremidad isquémica.

Se ha demostrado que la angiogénesis terapéutica usando células madres puede ofrecer la posibilidad de promover la curación de heridas y de prevención de la amputación en pacientes con isquemia crítica sin opción de revascularización, que además presentan dolor en reposo que clasifican como Rutherford 4 y en aquellos que han perdido poco tejido Rutherford 5 (Fontaine IV).

La terapia celular ofrece una opción para mitigar los problemas asociados a la isquemia crítica. Las células madre aumentan la angiogénesis, integrando la formación de nuevos vasos sanguíneos, provee soporte trófico por vía de la liberación de citoquinas y modulación de la inflamación, incluida la reducción de la infección.

La terapia celular ofrece neovascularización, potenciando su capacidad angiogénica, la habilidad de inducir/secretar varios factores tróficos por ellos mismos o interactuando con otras células huésped. El papel más discutido de las células madre compromete el remplazo de las células perdidas como resultado de la enfermedad o lesión, por células transplantadas en la región

afectada. (8-9) La posterior estimulación angiogénica por las células madre puede ser inducida por su secreción de factores pro-angiogénicos y citoquinas (actividad pro-angiogénica paracrina de las células madres/progenitoras). El contacto físico de las células madres murales derivadas de células progenitoras, llamadas pericitos, (10) capaces de estabilizar y madurar los capilares en las arteriolas puede desencadenar también la angiogénesis. En adición a su rol en la neovascularización terapéutica, los derivados vasculares de células madres pueden jugar un papel esencial en la construcción de biotejidos vascularizados. (11)

Otro posible mecanismo de reparación mediada por células madre es la modulación de la respuesta inflamatoria. Las células madre pueden servir como mediadores de inmunomodulación durante la inflamación basados en sus actividades tróficas. La infusión de estroma mesenquimal humano (hMSC) secreta agentes inmunomoduladores que desactivan la vigilancia de las células T y los procesos inflamatorios crónicos. (12) El hMSC alogénico puede no sólo suprimir la enfermedad injerto vs huésped, también puede exhibir una profunda capacidad antiinflamatoria y regenerativa en modelos animales. Estudios en animales usando Bleomicina han mostrado que la administración de hMSC inmediatamente después de la exposición a la bleomicina es acompañado por una significativa reducción de la inflamación asociada con la enfermedad pulmonar. (13)

Estos estudios revelan que la terapia con células madre es efectiva atenuando o revirtiendo la enfermedad asociada con inflamación e indica un mecanismo probable por el cual los niveles de interferón (IFN) – gamma/interleukina (IL)-1B pueden reprimir la respuesta inflamatoria del huésped alterando las citoquinas sistémicas. También se ha visto que las células estromales (MSC) tienen un efecto benéfico en sepsis experimental, posiblemente por mecanismos paraclínicos, sugiriendo que la terapia celular media la inmunomodulación y puede ser un adyuvante en el tratamiento de la morbi-mortalidad por sepsis. (14)

A pesar de eso, la extensión de la terapia celular a la práctica clínica requiere el uso de diferentes formas de células madre, y la selección de la mejor fuente

de progenitores endoteliales para llevar a cabo las importantes funciones hacia la reparación y regeneración.

Clasificación y fuentes de células madre:

Células madre embriogénicas:

Las células madre embriogénicas (ESC) han emergido como una fuente ilimitada de células madre pluripotenciales con la propiedad adicional de ser capaces de diferenciarse en progenitores endoteliales, los cuales pueden completar eficientemente el proceso de angiogénesis en los tejidos isquémicos. (15) Durante la última década los estudios han demostrado el desarrollo separado de los componentes vasculares de las ESC derivados del ratón, primates y humanos. (16-21) La habilidad de las ESC de generar numerosos enriquecidos de células progenitoras endoteliales humanas (EPC) ofrece una oportunidad muy útil para estudiar los mecanismos de la isquemia crítica.

Durante los estadios tempranos del desarrollo embrional (EB), la vasculogénesis toma lugar a través de múltiples pasos en los cuales los precursores de células endoteliales se diferencian, expanden y coalescen para formar una red primitiva de túbulos. Investigadores han encontrado que hESC se diferencia en EC y células de músculo liso (SMC) en el EB y células estromales co-cultivo. (22-25) Células progenitoras vasculares de los ratones ESC han sido diferenciadas por formación en EB y seleccionadas por un receptor relacionado con la expresión de tirosin kinasa (Flk)-1. Reportes subsecuentes han indicado que ESC puede diferenciarse espontáneamente en EC o puede ser obtenido de Flk-1 o antígeno de célula madre (Sca)-1.

Células madre pluripotenciales:

La llegada de las células madre pluripotenciales (iPSC) promete una nueva forma de evitar algunas de las limitaciones terapéuticas de ESC y células madre adultas. Este incluye las cuestiones éticas y las preguntas de inmunogenicidad/rechazo de injerto de ambas ESC y células madre adultas. Para terapia en isquemia crítica iPSC ofrece una opción adicional tanto que estas células son capaces de autorenovarse y diferenciarse en las tres capas germinales como las ESC.

En el presente estudio nos enfocaremos en la terapia angiogénica basada en el uso de células madre las cuales presentan las siguientes características, son células con gran capacidad de auto-renovación y potencial de multi diferenciación, esto implica que son células que poseen la habilidad de mantener sus características celulares después de generar células hijas a través de la mitosis, la multi diferenciación radica principalmente en la capacidad de poder diferenciar a una gran cantidad de tipos celulares órgano específicas. Son células que poseen plasticidad, lo que significa, que pueden diferenciarse a varios tipos celulares completamente funcionales en diferentes microambientes o en un sistema regulado, además tienen la capacidad de reparar daños celulares y tejidos disfuncionales.

Las células madre, se dividen en dos tipos: las embrionales y las postnatales. Las células postnatales se consideran pluri potenciales, lo que quiere decir que son capaces de diferenciarse en cualquier linaje celular. Por ello, son consideradas hoy en día, por expertos, como una de las arma terapéutica mas prometedoras, careciendo de dilemas éticos referentes a su extracción y uso. En apropiadas cantidades y condiciones éstas células pueden ser ordenadas en células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales estromales, células madre neurales y células madre musculares.

Las células madre pueden encontrarse en la gran mayoría de tejidos, pero hay sitios en el cuerpo humano en donde las podemos encontrar en grandes cantidades. Se ha documentado que el sitio de mayor concentración de este tipo de células es la medula ósea, seguido del tejido adiposo. Para ambos tipos de células se han desarrollado técnicas de obtención; la descrita para medula ósea emplea la cresta iliaca, el cual es un sitio de fácil acceso quirúrgico, éxito en la muestra y poca morbilidad para los pacientes. Mientras que la referida para tejido adiposo, usa el producto de la liposucción o resección en bloque adiposo, en donde se obtienen células madre adiposas.

Al 2006, aproximadamente 100 pacientes se habían tratado con éste método encontrando en la mayoría de estudios mejoría del dolor de reposo, índice tobillo/brazo, aumento en la deambulaci3n libre de dolor y presi3n tras cutánea de oxigeno.

3. IDENTIFICACIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La enfermedad arterial oclusiva crónica (EAOC) que afecta los miembros inferiores, deriva principalmente de la aterosclerosis y el padecimiento prolongado o poco controlado de la Diabetes Mellitus. Dichas entidades afectan a una gran proporción de la población adulta, comprometiendo alrededor del 15% de aquellos mayores de 55 años de edad.

Su progresión, generalmente es lenta y después de 10 años de evolución cerca de un 30% de pacientes progresan a isquemia crítica. En ella, habitualmente la presencia de dolor en reposo, úlceras y/o gangrena, obligan a la intervención quirúrgica convencional o endovascular, en pro de evitar complicaciones más severas, como la amputación.

Sin embargo, muchos de estos pacientes no son candidatos a estrategias de revascularización, ya sea por motivaciones médicas o limitantes técnicas. Por lo anterior, el tratamiento con células autólogas derivadas de la médula ósea se convierte en una opción terapéutica viable dentro del arsenal terapéutico. En la actualidad, la angiogénesis terapéutica con células madre es una alternativa factible respaldada por diversos científicos; a pesar de ello, esperamos contar a futuro con estudios de mayor rigor científico, y de inferenciación incuestionable.

Durante el año 2007, se llevó a cabo en el Hospital Militar Central, un protocolo de investigación en el cual se intervinieron 18 pacientes mediante ésta técnica. Con la presente investigación, diseñamos un estudio transversal con el fin de determinar características clínicas concordantes a la evolución de la enfermedad y que nos sugieran un posible éxito de la terapia en nuestros pacientes luego de 6 años de su intervención

PREGUNTA DE INVESTIGACION

Si bien, no siempre un estudio observacional descriptivo requiere una pregunta de investigación, dada la presunción de que lo que se desea es describir todas aquellas características demográficas, médicas, quirúrgicas, y sus correspondientes desenlaces, en el presente ítem hemos realizado el ejercicio analítico de construir una pregunta que reuniera las características principales consagradas en la declaración PRISMA, utilizando la estrategia PICOt (Paciente, Intervención o Medición, Comparación, Desenlace y Tiempo), teniendo en cuenta los siguientes elementos:

Pacientes: Pacientes con Enfermedad Arterial Oclusiva Crónica con isquemia crítica sin posibilidad de revascularización en el Hospital Militar Central.

Intervención: Angiogénesis Terapéutica (2008).

Desenlaces o Medidas: Impactos en la vida de los pacientes: Caracterizado por la descripción de los Índices Tobillo Brazo (ITB), Dolor referido a su actividad diaria e intensidad, Necesidad de Amputación, y Mortalidad.

Tiempo: Seis años después de la intervención.

Así,

¿Cuál fue el comportamiento de las medidas de desenlace en pacientes con enfermedad arterial oclusiva crónica sin posibilidad de revascularización en el Hospital Militar Central seis años después de ser sometidos a Angiogénesis Terapéutica en el 2007?

4. JUSTIFICACIÓN

La EAOC es una enfermedad de amplia distribución mundial, afecta a un 5% de la población americana y su etiología es multicausal. Es especialmente asociada con el síndrome metabólico, lo cual se atribuye, entre otras variables, a deficientes hábitos de vida en la población mundial.

La isquemia crítica de miembros inferiores, corresponde al estadio más severo de la enfermedad arterial periférica. Esta conlleva finalmente a la pérdida o amputación de la extremidad del paciente, asociándose a una mortalidad del 50% a 5 años, y generando una gran dependencia familiar, y deterioro de la calidad de vida en el paciente afectado.

En este estado de severidad las opciones terapéuticas son escasas, tanto que algunos pacientes se consideran no revascularizables, en otras palabras: sin ninguna opción de tratamiento quirúrgico convencional o endovascular, lo cual nos había limitado exclusivamente al manejo médico basado al control de factores de riesgo y estilos de vida saludable.

Con éste estudio, pretendemos describir en términos de calidad de vida, pacientes sin opción de revascularización a quienes se les brinda una opción de tratamiento de rescate con el trasplante de células madre con el único objetivo de lograr angiogénesis. Dicha Angiogénesis Terapéutica, incluye el uso de factores de crecimiento angiogénicos con células madre para formación y crecimiento de vasos sanguíneos que a la postre pudieran mejorar el flujo sanguíneo e incrementar la perfusión tisular en la extremidad isquémica.

5. OBJETIVOS

5.1. GENERAL

Describir la respuesta clínica obtenida luego de Angiogénesis Terapéutica (realizada en el 2007) en una serie de pacientes del HMC con Enfermedad Arterial Oclusiva Crónica de miembros inferiores sin posibilidad de revascularización.

5.2. ESPECÍFICOS

1. Calcular la supervivencia a seis años de una serie de pacientes con Enfermedad Arterial Oclusiva Crónica de miembros inferiores sin posibilidad de revascularización tratados con Angiogenesis Terapeutica en el HMC (realizada en el 2007).
2. Describir el número de pacientes libres de amputación luego de seis años en una serie de pacientes con Enfermedad Arterial Oclusiva Crónica de miembros inferiores sin posibilidad de revascularización tratados con Angiogénesis Terapéutica en el HMC (realizada en el 2007).
3. Describir clínicamente impactos en la vida de los pacientes (ITB - Índice Tobillo / Brazo, EVA - Escala Visual Análoga, Amputación y Mortalidad) antes y seis años después de terapia con Angiogénesis Terapéutica en el HMC (realizada en el 2007).

6. HIPÓTESIS

La Angiogénesis Terapéutica (con células madre autólogas) en una serie de pacientes del Hospital Militar Central (HMC) con Enfermedad Arterial Oclusiva Crónica de miembros inferiores sin posibilidad de revascularización **parece haberse relacionado** seis años después a una mejoría clínica del ITB, dolor (Evaluado por EVA), menor frecuencia de amputación y mejor actividad física libre de claudicación (Fontaine).

7. ASPECTOS METODOLOGICOS

7.1. TIPO DE ESTUDIO

Estudio Observacional Descriptivo tipo Serie de Casos.

7.1.1. LUGAR DONDE SE REALIZARA

Servicio de Cirugía Vascul y Angiología del Hospital Militar Central.

7.2. POBLACIÓN

Una serie de pacientes con Enfermedad Arterial Oclusiva Crónica Crítica de miembros inferiores sin posibilidad de revascularización sometidos a Angiogénesis Terapéutica (trasplante de células madre autólogas) en el 2007.

7.2.1. CRITERIOS DE SELECCION

- Criterios de inclusión: Pacientes mayores de edad, Con Enfermedad Arterial Oclusiva Crónica, no revascularizable, intervenidos en el año 2007, tratados con Angiogénesis Terapéutica (Aplicación de células madre), en el HMC.
- Criterios de exclusión: Ninguno.

7.2.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se incluirán una serie de pacientes con Enfermedad Arterial Oclusiva Crónica de miembros inferiores sin posibilidad de revascularización, con Angiogénesis Terapéutica (con células madre autólogas), realizada en el año 2007.

7.3. TABLA DE VARIABLES:

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Operatividad	Tipo de variable
Género	Hace referencia a la diferencia entre hombre y mujer.	Género del paciente.	0. Hombre 1. Mujer	Cualitativa Nominal
Edad	Tiempo transcurrido desde el nacimiento de un ser vivo	Edad del paciente al momento de su intervención	Edad en años	Cuantitativa Discreta
ASA	Clasificación de la American	Clasificación ASA otorgada	1. I 2. II	Discreta

	Society of Anesthesiology (ASA) para estimar el riesgo que plantea la anestesia.	al paciente en su evaluación pre anestésica y con la cual se indica realizar procedimiento quirúrgico	3. III 4. IV 5. V	
Comorbilidad	Enfermedad primaria que coexiste con la causa quirúrgica.	Presencia o ausencia de comorbilidades	1. HTA 2. Diabetes Mellitus 3. EPOC 4. Tabaquismo 5. Accidente Cerebro Vascular 6. Amputación Previa 7. Otro	Cualitativa Nominal
Amputación	Resección quirúrgica de la extremidad crítica de perfusión.	¿Requirió amputación quirúrgica de la extremidad tratada?	0. No 1. Si	Cualitativa Nominal Dicotómica
Fontaine	Clasificación funcional de Fontaine	Estadio clínico de la isquemia crónica de miembros inferiores.	1. I 2. IIa 3. IIb 4. III 5. IV	Cualitativa Ordinal
ITB	Índice Tobillo Brazo	Cociente o relación entre la presión sistólica de la arteria pedia y la presión sistólica de la arteria braquial.	1. >1,4 (Calcificación arterial) 2. 0,9 a 1,3 (Normal) 3. 0,7 a 0,9 (Leve) 4. 0,5 a 0,7 (Moderada) 5. <0,5 (Grave)	Cualitativa Ordinal
Dolor	Dolor evaluado según Escala Visual Análoga (EVA)	Puntaje de la intensidad del dolor relacionado a	Puntaje en mm de EVA	Cualitativa Ordinal

		claudicación intermitente.		
Supervivencia	Estado Muerto o Vivo del paciente intervenido.	Supervivencia medida a los 6 años.	0. No 1. Si	Cualitativa Nominal Dicotómica
Muerte.	Causa determinada de muerte	Causa referida por la familia de muerte del paciente	La enunciada por el acudiente.	Cualitativa Nominal

7.4. MEDICIÓN E INSTRUMENTO A UTILIZAR:

Los datos serán tomados de las historias clínicas del HMC. Con ellas se desarrollaremos una base de datos secundaria en hoja de calculo Microsoft® Excel®. No emplearemos formatos impresos en pos de colaborar con la disminución del consumo de productos biológicos de importancia para la vida y a corto plazo poco renovables. Las columnas contendran las variables vinculadas en la tabla: “6. DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES”. Su acceso, será confidencial y estará asegurado con una clave para el grupo investigador.

7.5. ANÁLISIS ESTADISTICO

Describiremos las variables referidas en el ítem “6. DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES”. Las mediciones realizadas durante el seguimiento serán resumidas dependiendo de la naturaleza de cada una de ellas y su distribución en la población referida, así: Las variables cuantitativas se describirán por medio de medidas de tendencia central y dispersión, las variables cualitativas con frecuencias y proporciones.

La base de datos se construirá en la hoja de calculo Microsoft® Excel®. Y para el analisis estadistico, de ser necesario para la construccion de hipotesis, se realizara con el paquete R®.

8. ASPECTOS ÉTICOS

Realizaremos investigación descriptiva de los procedimientos realizados (Angiogénesis Terapéutica) en una serie de pacientes con Enfermedad Arterial Oclusiva Crónica sin opción de revascularización. Dichos hallazgos hicieron parte del tratamiento de su enfermedad, y por lo tanto carecieron de cualquier asociación con intervención experimental a nuestro estudio.

Gracias al diseño de esta investigación, y los aseguramientos de las bases de datos, vinculadas pero en custodia de nuestro grupo: Respetaremos y utilizaremos la información confidencial de los individuos con respeto, pericia investigativa y confidencialidad, asegurando un trato justo y equitativo para todos.

Basados en las regulaciones estatales y adquiridas por bloque constitucional de las existentes en el exterior (Reporte Belmont, el Código de Nuremberg, la Declaración de Helsinki), y las nacionales (Resolución 8430 para investigación en seres humanos en Colombia), consideramos que podría no existir riesgo ético en los procedimientos investigativos practicados con la información extraídas de las historias, (Investigación Sin Riesgo). Manifestamos que el único interés del presente estudio es mejorar el conocimiento terapéutico existente en pacientes que padecen esta condición (EAOC).

Bajo el “deber ser” del investigador, nos sometemos a los requisitos y procedimientos que por protocolo deban ser ejecutados, dando cumplimiento a los reglamentos internos del HMC para la evaluación y aprobación de proyectos de investigación por el Comité de Ética para la Investigación en Seres Humanos de la Institución.

9. RESULTADOS/PRODUCTOS ESPERADOS Y POTENCIALES BENEFICIARIOS

Resultado/Producto esperado	Indicador	Beneficiario
Relacionados con la generación de conocimiento	Comparación de los resultados obtenidos en el servicio de Cirugía Vascular y Angiología del Hospital Militar Central con los datos reportados en la literatura mundial.	Grupo multidisciplinario encargado del tratamiento de la enfermedad arterial oclusiva crónica. Cirujanos Generales y Vasculares.
Conducentes al fortalecimiento de la capacidad científica del Hospital Militar Central	Formación de recurso humano a nivel de postgrado. Trabajo de grado	Departamento de Cirugía Vascular y Angiología del Hospital Militar Central.
Dirigidos a la apropiación social del conocimiento	Publicación de artículo en revista científica.	Grupos interdisciplinarios a nivel nacional de manejo de la enfermedad vascular periférica. Sociedades científicas.

10. CRONOGRAMA

ACTIVIDADES	1	2	3	4	5	6
	Concepción de la idea de investigación	X				
Realización Anteproyecto	X					
Aprobación Anteproyecto	X					
Realización de Protocolo	X	X				
Evaluación y aprobación por la SDIC		X				
Aprobación Comité de Ética		X				
Recolección de la información		X	X			
Análisis de la información			X	X		
Presentación de resultados				X	X	
Socialización y Publicación					X	X

11. PRESUPUESTO

Para el presente estudio los gastos serán asumidos en su totalidad por el grupo de investigadores:

GASTOS	TOTAL	OBSERVACIONES
Personal	\$2.000.000	Horas empleadas por los investigadores
Equipo	\$0	Computadores de la Biblioteca de la Facultad de Salud. Computadores personales.
Materiales	\$100.000	Papelería, materiales de impresión, USB.
Salidas de Campo	\$0	No aplica
Bibliografía	\$0	Bases de datos de la Universidad Militar Nueva Granada.
Publicaciones	\$1.000.000	Elaboración de poster, presentación en congreso
Servicios Técnicos	\$0	Procesadores de datos con licencia libre de operación en Colombia.
Total	\$3.100.000	

12. DESARROLLO DEL PROTOCOLO

12.1 RESULTADOS

Previa aprobación del Comité de Ética del Hospital Militar Central, y la Facultad de Medicina de la Universidad Militar Nueva Granada, en un primer estudio (8), fueron introducidos un total de 19 registros hospitalarios de pacientes tratados con Angiogénesis Terapéutica en el año 2007. El total de pacientes completo su seguimiento clínico de 24 semanas. Las características demográficas de dicha población aparece en el artículo de Franco y cols (8).

De los 19 pacientes iniciales, solamente cumplieron los criterios de seguimiento a seis años el 63,16% (12 de 19). Los siete restantes fueron considerados como datos perdidos. Uno de ellos se retiró del estudio, y los seis restantes no pudieron ser contactados para su revisión a los 6 años. En la Tabla 1, resumimos los datos demográficos de interés.

Variable	Estadístico
Edad (años)	75,5 (+/- 36)*
Masculino	8/12 (66,7%)
Comorbilidades	5/12 (41,7%)
- Hipertensión Arterial	- 5/5 (100%)
- Diabetes Mellitus	- 5/5 (100%)
- Amputación Previa	- 2/5 (40%)
- EPOC	- 1/5 (20%)
- Tabaquismo	- 1/5 (20%)
- Evento Cerebro Vascular	- 1/5 (20%)

Tabla 1. Características Demográficas de los pacientes incluidos en el análisis a 6 años. (*Se describe como mediana y rango inter cuartilico debido a su distribución)

En la Tabla 2, presentamos la tasa de mortalidad y de amputación en la serie de casos referenciada. En la Tabla 3, describimos las medianas de los Índices

Tobillo Brazo (ITB) según la lateralidad intervenida y un análisis independiente que combina los valores de ambas lateralidades de acuerdo al momento de la evaluación.

Variable	Estadístico
Mortalidad	3/12 (25%)
Requerimiento de Amputación	1/12 (8,3%)

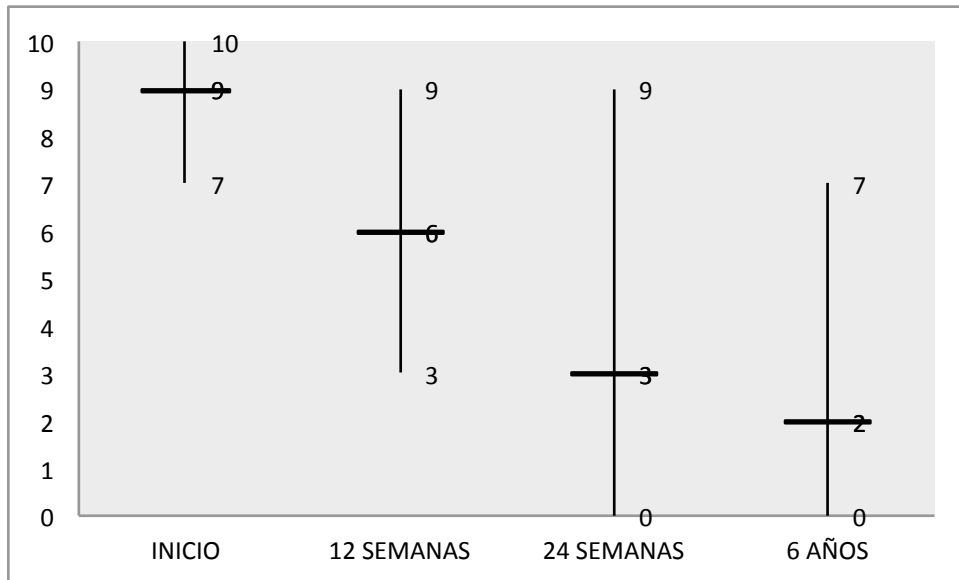
Tabla 2. Tasa de Mortalidad* y Amputación a 6 años.

(Atribuible a cualquier causa, no directamente a la EAOC o al tratamiento con Angiogénesis Terapéutica)

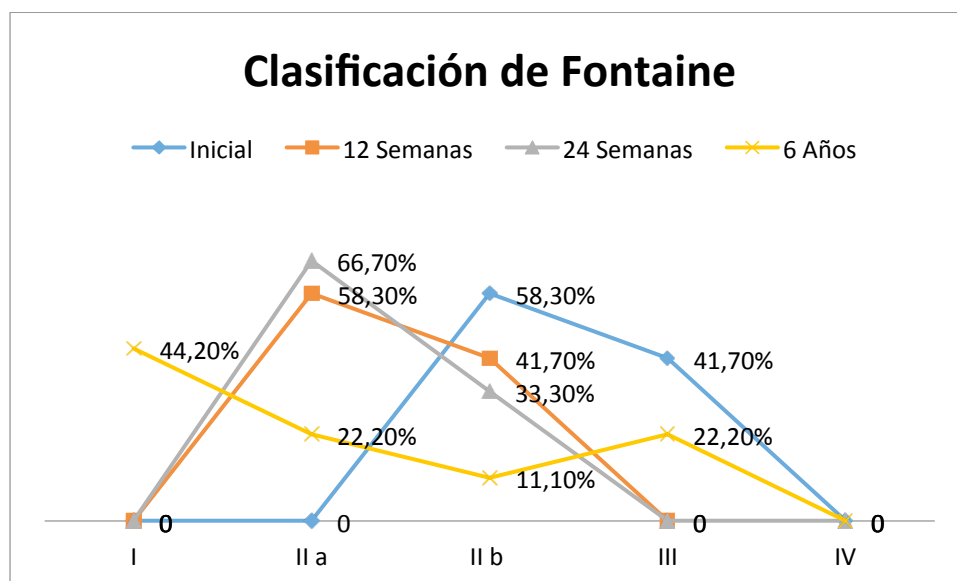
Tiempo	ITB (Derecho)	ITB (Izquierdo)
	Mediana (Rango)	Mediana (Rango)
Inicio	0,53 (0,84)	0,52 (0,75)
12 Semanas	0,61 (0,68)	0,79 (0,54)
24 Semanas	0,68 (0,66)	0,79 (0,45)
6 Años	0,63 (0,23)	0,79 (0,30)

Tabla 3. Índice Tobillo – Brazo (ITB) según el momento de la valoración.

En la gráfica 1, detallamos la intensidad del dolor, medido con unidades EVA y fraccionado según el tiempo. En la gráfica 2, se presenta el estadio clínico basado en la clasificación de Fontaine.



Gráfica 1. Dolor según Escala Visual Análoga (EVA).



Gráfica 2. Clasificación de Fontaine según el momento de la evaluación.

12.2 DISCUSION

El diseño de alternativas terapéuticas menos invasivas a las técnicas endovasculares y/o quirúrgicas en pacientes cada vez más enfermos, no sólo podrían generar un alivio a las finanzas gubernamentales destinadas a la cobertura en salud para la población en general, también propondrían un nuevo paradigma en la intervención de la enfermedad vascular periférica con similares indicadores de calidad de vida y resultados a corto, mediano y largo plazo. Similar a lo referido por Rodríguez en su análisis de costo efectividad a favor de células autólogas derivadas de la médula ósea. (9)

El presente estudio, parte de la esencia de una primera fase realizada con antelación en el Hospital Militar Central, en dicho proyecto, bajo una valoración robusta y un seguimiento estandarizado se evaluó la respuesta clínica descrita en términos de Índice Tobillo Brazo (ITB), Dolor, Tolerancia a deambulación libre de claudicación y requerimiento de amputación. En dicha evaluación, realizada de manera estricta por Franco y colaboradores, la aplicación Intramuscular de células madres autólogas en 10 puntos alrededor del músculo gastrocnemio fue exitosa, demostrando un importante aumento de los ITB, distancia de caminata libre de claudicación y reducción de la intensidad del dolor, a corto y mediano plazo.

Al realizar el seguimiento a seis años, solamente se pudo recuperar información del 63.2% de los pacientes. lo anterior supone una pérdida de la información del 36.8%, hecho que si bien, no es deseable en ningún tipo de estudio clínico, es esperable dadas las condiciones sanitarias de nuestro país, el aseguramiento de salud a través de diversos operadores territoriales públicos o privados, la inestabilidad en las realidades económicas que sustentan la vida de las familias colombianas y el sub registro de mortalidad existente para procesos investigativos como el presente.

Con una mortalidad del 25% a seis años, nos ubicamos dentro de lo esperable para pacientes con diagnóstico de EAOC Severa, a la par de otros países de la región. Hay que aclarar que dicho estadístico solo mide la mortalidad global de nuestra muestra, y no la atribuible a la EAOC o al procedimiento terapéutico. En cambio, es bastante alentador una muy baja tasa de requerimiento de amputación (8,3%) versus un esperable del 30 al 60% a 6 meses, como esta referenciado en pacientes con Isquemia Crítica no revascularizable sin tratamiento. (10)

Apoyados en los datos del primer estudio, es llamativo que seis años después, el incremento de los índices Tobillo Brazo con respecto a los seguimientos a 12 y 24 semanas no presentaron diferencias clínicas ni estadísticas, (ITB 12 Semanas Vs ITB 6 años: $p=0,589$; ITB 24 Semanas Vs ITB 6 años:

$p=0,386$), siendo heterogéneas a las observadas antes de la Angiogénesis ($p=0,017$). Así mismo, advertimos una reducción en la intensidad del dolor a los 6 años con respecto a las anteriores estimaciones (24 Semanas y 6 Años – $p=0,031$; 12 Semanas y 6 Años – $p<0,001$). Y, equivalentes tendencias de tolerancia a caminata libre de claudicación entre las 12 Semanas y 6 Años ($p=0,504$) y 24 Semanas y 6 Años ($p=0,361$), siendo diferentes a las previas a la intervención ($p=0,001$).

Fundamentados en dichos estadísticos, lo anterior sólo nos puede llevar a dos horizontes teóricos en relación a los hechos: La Angiogénesis Terapéutica puede ser efectiva en la prevención de la evolución de la enfermedad y dada la presencia de un lecho isquémico, la señalización y producción de tejido vascular fue suficiente para generar puentes arteriales capaces de subsanar penumbra isquémica distal, ó, el destino biológico de estos pacientes pertenece al 40% de pacientes que independiente de la terapia iban a detener o incluso mejorar su condición clínica. Si bien, dichos planteamientos son poderosas conclusiones a debatir en el campo de una experimentación de grupos controlados, existen evidencias que nos podrían soportar en mayor medida la primera premisa. La mejoría clínica asociada a unos diferentes unilaterales (nuestros hallazgos fueron demostrados en extremidad derecha e izquierda por separado), la disminución en la intensidad del dolor de un grado severo y continuo a uno leve e intermitente solamente con claudicación a grandes distancias (>150 o >200 metros según la clasificación) están en pro de dicha práctica alternativa de aparentes óptimos resultados. Hallazgos similares a los encontrados en los meta-análisis y experimentos con medición de desenlaces a corto y mediano plazo como los de Teraa y Liu Fu-Peng (11-12).

Basado en este estudio observacional, si bien, nos es imposible constatar o realizar diagnósticos de manera retrospectiva, como sistema de aseguramiento de la validez de los criterios de inclusión utilizados en el estudio anterior, contamos con un sistema de validación del dato para aquellos pacientes que completaron su seguimiento a largo plazo mediante protocolización prospectiva de las mediciones en nuestro servicio. Aun así, de hecho consideramos ideal el haber contando con impresiones diagnósticas de argumento clínico y teórico mas amplio, que permitieran realizar inferencias clínicas Colombianas, a gracia de una validez externa contundente. En este caso, sería recomendable incluir pacientes estratificados como Rutherford 5, mas un protocolo basado en prostaglandinas dentro de la intervención con Angiogénesis Terapéutica en el brazo experimental, enfrentado a un un grupo control, en pos de apoderar los hallazgos a corto y mediano plazo, y ser por si solos evidencia irrefutable en un seguimiento a largo plazo, similar al que realizamos en este caso.

12.3 CONCLUSIONES

Sugerimos, que en esta serie de casos, al evaluarse a largo plazo (6 años) los impactos derivados de la Angiogénesis Terapéutica Intramuscular en pacientes con EAOC no revascularizable, los beneficios ganados a corto y mediano plazo (Evaluados por Franco & Cols) se mantuvieron presentes, e incluso, en algunos casos, con un mayor beneficio. Dadas las limitaciones de nuestro estudio, argumentamos la necesidad de ensayos clínicos controlados aleatorizados o meta-análisis de ensayos clínicos encaminados a la comparación de los impactos clínicos a largo plazo, con amplio poder de inferenciación.

12.4 AGRADECIMIENTOS Y DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS

Agradecemos los aportes realizados por el servicio de Cirugía Vascular y Angiología del Hospital Militar Central, a los asesores temáticos y metodológicos de la Universidad Militar Nueva Granada y a todas aquellas personas relacionados al presente estudio, a los pacientes, y a nuestras familias.

Declaramos no presentar conflicto de intereses, y reportamos que este estudio fue financiado con recursos propios del grupo de investigación.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

13.1 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS DEL PROTOCOLO

1. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA. Fowkes on behalf of the TASC II Working Group, Örebro, Sweden and Denver, Colorado. 2006.
2. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial *Lancet*, 2002; 360:427–435
3. Zammaretti P, Zisch AH. Adult endothelial progenitor cells. *Renewing vasculature. Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:493–503.
4. K€assmeyer S, Plendl J, Custodis P, Bahramsoltani M. New insights in vascular development: vasculogenesis and endothelial progenitor cells. *Anat Histol Embryol.* 2009;38:1–11.
5. Nowak G, Sumitran-Holgersson S. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 or Tie-2 on peripheral blood cells defines functionally competent cell populations capable of reendothelialization. *Circulation.* 2004;110:3699–707.
6. Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, Aspalter IM, et al. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol.* 2010;12:943–53.
7. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, et al. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med.* 2000;6:460–3.
8. Burns TC, Verfaillie CM, Low WC. Stem cells for ischemic brain injury: a critical review. *J Comp Neurol.* 2009;515:125–44.
9. Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature.* 2006;441:1094–6.
10. Campagnolo P, Cesselli D, Al Haj Zen A, et al. Human adult vena saphena contains perivascular progenitor cells endowed with clonogenic and proangiogenic potential. *Circulation.* 2010;121:1735–45.
11. Sasagawa T, Shimizu T, Sekiya S, et al. Design of prevascularized three-dimensional cell-dense tissues using a cell sheet stacking manipulation technology. *Biomaterials.* 2010;31:1646–54.
12. Bonfield TL, Nolan Koloze MT, Lennon DP, et al. Defining human mesenchymal stem cell efficacy in vivo. *J Inflamm (Lond).* 2010;7:51.
13. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:8407–11.
14. Mei SH, Haitsma JJ, Dos Santos CC, et al. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182:1047–57.
15. Daley GQ. Stem cells: roadmap to the clinic. *J Clin Invest.* 2010;120:8–10.
16. Kaufman DS, Lewis RL, Hanson ET, et al. Functional endothelial cells derived from rhesus monkey embryonic stem cells. *Blood.* 2004;103:1325–32.

17. Wang ZZ, Au P, Chen T, et al. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells form durable blood vessels in vivo. *Nat Biotechnol.* 2007;25:317–8.
18. Saeki K, Yogiashi Y, Nakahara M, et al. Highly efficient and feeder-free production of subculturable vascular endothelial cells from primate embryonic stem cells. *J Cell Physiol.* 2008;217:261–80.
19. Li Z, Wilson KD, Smith B, et al. Functional and transcriptional characterization of human embryonic stem cell-derived endothelial cells for treatment of myocardial infarction. *PLoS One.* 2009;4(12):e8443.
20. Mariappan D, Winkler J, Chen S, et al. Transcriptional profiling of CD31 cells isolated from murine embryonic stem cells. *Genes Cells.* 2009;14:243–60.
21. Kane NM, Xiao Q, Baker AH, et al. Pluripotent stem cell differentiation into vascular cells: a novel technology with promises for vascular regeneration. *Pharmacol Ther.* 2011;129:29–49.
22. Levenberg S, Golub JS, Amit M, et al. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:4391–6.
23. Zambidis ET, Peault B, Park TS, et al. Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hematoendothelial, primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development. *Blood.* 2005;106:860–70.
24. Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, et al. Human embryonic stem cell-derived CD34⁺ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood.* 2005;105: 617–26.
25. Ferreira LS, Gerecht S, Shieh HF, et al. Vascular progenitor cells isolated from human embryonic stem cells give rise to endothelial and smooth muscle like cells and form vascular networks in vivo. *Circ Res.* 2007;101:286–94.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS DEL DESARROLLO DEL PROTOCOLO

1. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA. Fowkes on behalf of the TASC II Working Group, Örebro, Sweden and Denver, Colorado. 2006.
2. Serrano F, Martin A. Enfermedad Arterial Periferica. *Rev Esp Cardiol.* 2007;60(9)969–82.
3. 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: 738-743.
4. Burns TC, Verfaillie CM, Low WC. Stem cells for ischemic brain injury: a critical review. *J Comp Neurol.* 2009;515:125–44.
5. Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature.* 2006;441:1094–6.
6. Campagnolo P, Cesselli D, Al Haj Zen A, et al. Human adult vena saphena contains perivascular progenitor cells endowed with clonogenic and proangiogenic potential. *Circulation.* 2010;121:1735–45.

7. Sasagawa T, Shimizu T, Sekiya S, et al. Design of prevascularized three-dimensional cell-dense tissues using a cell sheet stacking manipulation technology. *Biomaterials*. 2010;31:1646–54.
8. Franco C, Arroyo F, Pullaz G, Segura D, Ospino B, Avila M, et als. Angiogénesis terapéutica en pacientes con enfermedad arterial oclusiva crónica sin posibilidad de revascularización quirúrgica, Archivos personales – Departamento de Cirugía Vascular y Angiología – Hospital Militar Central. Estudio 2007-2008. Actualmente sometido a publicación.
9. Rodríguez C. Análisis de costo-efectividad de las células autólogas derivadas de la médula ósea vs el tratamiento convencional para pacientes con enfermedad arterial oclusiva crónica de miembros inferiores no revascularizable. *Vask*.
10. Lawall H, Bramlage P, Amann B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease: A critical appraisal. *Thrombosis and Haemostasis*. 103.4/2010. Downloaded from www.thrombosis-online.com on 2011-11-29. IP: 24.173.32.26
11. Teraa M, Sprengers R, van der Graft Y, Charmaine E, Moll F, Verhaar C. Autologous Bone Marrow-Derived Cell Therapy in Patients With Critical Limb Ischemia. *Annals of Surgery*. 2013;258(6):922-9.
12. Liu F, Dong J, Sun Sh, Gao W, Zhang Z, Zhou X, et als. Autologous Bone Marrow–Derived Cell Therapy in Patients With Critical Limb Ischemia. A Meta-Analysis of Randomized Controlled Clinical Trials. *Chin Med J*. 2012;125(23):4296– 4300.