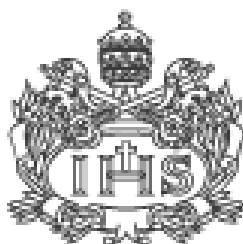


**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE BACTERIOLOGIA**



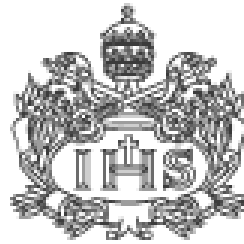
**EFFECTO DEL FILGRASTIM (FSC-Grh) SOBRE LA MOVILIZACIÓN DE  
CELULAS CD 34+ EN UN GRUPO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD  
ARTERIAL OCLUSIVA CRONICA SELECCIONADOS PARA TERAPIA  
CELULAR**

**ANGELA GISELLE RIVEROS AROCHA  
YENNY JOHANA TRUJILLO CASTRO**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial  
Para optar el título de  
Bacteriólogas**

**BOGOTÁ, JULIO DE 2008**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE BACTERIOLOGIA**



**EFEECTO DEL FILGRASTIM (FSC-Grh) SOBRE LA MOVILIZACIÓN DE  
CELULAS CD 34+ EN UN GRUPO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD  
ARTERIAL OCLUSIVA CRONICA SELECCIONADOS PARA TERAPIA  
CELULAR**

**ANGELA GISELLE RIVEROS AROCHA  
YENNY JOHANA TRUJILLO CASTRO**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial  
Para optar el título de  
Bacteriólogas**

**DIRECTOR  
LUZ MABEL AVILA BCI. MSc. PhD © Directora**

**BOGOTÁ, JULIO DE 2008**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

Artículo 23 de la Resolución No13 de julio de 1946.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	11
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	12
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	13
<b>4. HIPOTESIS</b>	14
<b>5. OBJETIVOS</b>	15
<b>5.1</b> Objetivo General	15
<b>5.2</b> Objetivo Específico	15
<b>6. MARCO TEÓRICO</b>	
<b>6.1</b> Sistema Hematopoyético	16
<b>6.1.1</b> Células progenitoras hematopoyéticas (CPH)	18
<b>6.2</b> Antígeno de superficie CD34	18
<b>6.3</b> Cuantificación de CPH	20
<b>6.3.1</b> Protocolo ISHAGE	20
<b>6.4</b> Factores de crecimiento y el control de la hematopoyesis	21
<b>6.4.1</b> Características de los factores de crecimiento	23
<b>6.5</b> Factores de crecimiento de linaje específico	24
<b>6.6</b> Bioquímica y estructura del FEC-G	26
<b>6.7</b> Receptor del FEC-G	26
<b>6.8</b> Uso clínico de los factores de crecimiento hematopoyéticos	28
<b>6.9</b> Aislamiento y caracterización del FEC-G	29
<b>6.9.1</b> FEC-G Humano	29
<b>6.10</b> El FEC-G en hematopoyesis normal	30
<b>6.11</b> Movilización de células progenitoras a sangre periférica	30
<b>6.12</b> Filgrastim	31
<b>6.12.1</b> Estructura del filgrastim	31
<b>6.12.2</b> Mecanismo de movilización de CPH	33

<b>6.12.3</b>	Efectos del FEC-G sobre la eritropoyesis	33
<b>6.12.4</b>	Efectos del FEC-G sobre la trombopoyesis	34
<b>7.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	35
<b>7.1</b>	Diseño de la Investigación	35
<b>7.2</b>	Población de Estudio	35
<b>7.3</b>	Definición de Variables de Investigación	36
<b>7.4</b>	Métodos	38
<b>7.4.1</b>	Protocolo de movilización CPH	38
<b>7.4.2</b>	Protocolo de recuento de células CD34+	39
<b>7.4.3</b>	Análisis Estadístico	40
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS</b>	42
<b>9.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	59
<b>10.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	61
<b>11.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	62
<b>12.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	63

## INDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Reglas generales factores de crecimiento hematopoyéticos	22
<b>Tabla 2.</b> Características basales de los pacientes	43
<b>Tabla 3.</b> Prueba de normalidad estadística de edad y peso de pacientes	45
<b>Tabla 4.</b> Resultado cuadro hematico basal previa a movilización FEC-G	46
<b>Tabla 5.</b> Química sanguínea basal previa a movilización celular	46
<b>Tabla 6.</b> Estado hematológico del paciente durante movilización	48
<b>Tabla 7.</b> Valoración de CD34+ durante movilización	48
<b>Tabla 8.</b> Comparación volumen -CMN de obtención de la muestra	50
<b>Tabla 9.</b> Pacientes con Movilización regular	50
<b>Tabla 10.</b> Pacientes con Movilización Buena	51
<b>Tabla 11.</b> Matriz de correlaciones	53
<b>Tabla 12.</b> Comparación previa vs. Durante movilización líneas celulares	56

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Esquema de hematopoyesis	17
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática estructura receptor del FEC-Grh	27
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de la estructura del FEC-Grh	32
<b>Figura 4.</b> Antecedentes patológicos de los pacientes	45
<b>Figura 5.</b> Correlaciones significativas del CD34 con el peso del paciente	53
<b>Figura 6.</b> Correlaciones entre CD34 del día 4 y día 5	54
<b>Figura 7.</b> Presencia proporcional de los efectos adversos	58

## **TABLA DE ANEXOS**

	Pág.
<b>Anexo 1.</b> Consentimiento informado	71
<b>Anexo 2.</b> Criterios inclusión Protocolo Angiogénesis terapéutica	77
<b>Anexo 3.</b> Dispersograma SS/CD34 PE	79



## RESUMEN

La estimulación con Filgrastim (FEC-Grh) es un método de movilización de células CD34+ empleado para trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (CPH). Obtener un número de células adecuado depende, en gran medida, del agente movilizador, la dosis y variables como edad y peso. Se analizaron 18 resultados obtenidos de pacientes con Enfermedad Arterial Oclusiva Crónica (EAOC) del Hospital Militar Central que fueron sometidos a movilización con FEC-Grh para terapia celular, entre Febrero y Junio de 2008. Se utilizó una dosis de Filgrastim de 600µg/día registrándose una media de células CD34+ de 63,05 células/µl ( $\pm 64,13$  células/µl) en sangre periférica al quinto día de estimulación. Al analizar los datos se obtuvieron dos grupos diferenciados por: movilización regular y buena, número de células CD34+ en sangre periférica, edad y peso. El estudio comprobó que la movilización con la dosis suministrada permitió obtener un número adecuado de progenitores, aún en aquellos casos en donde el peso mostró una variación en el número de células.

**Palabras clave:** Filgrastim, FEC-Grh, Células CD34+, Movilización, Peso, Edad

## **ABSTRACT**

The Filgrastim stimulation (FEC-Grh) is a mobilization cells method CD34+, used for hematopoietic progenitor cells transplanting (CPH). To obtain a suitable number of cells depends, to a great extent, on the mover agent, the dose and variables like age and weight. Eighteen results were analyzed from Arterial Occlusive Chronic Disease (EAOC) patients at Hospital Militar Central, who were submitted to mobilization by FEC-Grh for cellular therapy from February to June in 2008. A 600µg/day Filgrastim dose was used, gotten an average quantity of CD34+ cells of 63,05 cells/µl ( $\pm 64,13$  cells/µl) in peripheral blood to the fifth day of stimulation.

After analyzing the data, two groups were gotten, they were differentiated for: permanent and good mobilization, number of CD34 + cells in peripheral blood, age and weight. The study verified that the mobilization with the given dose let to obtain an adequate number of progenitor cells, even in those cases where weight had showed a change in the number of cells.

**Key words:** Filgrastim, FEC-Grh, CD34+ cells, mobilization, weight, age.

## 1. INTRODUCCION

El factor estimulante de colonias granulocíticas recombinante humano (FEC-Grh), permite la migración o movilización de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) desde la médula ósea a sangre periférica. Por esta razón, está siendo utilizado ampliamente en la práctica clínica como herramienta para tratamientos en enfermedades neoplásicas hematológicas y como terapia de acondicionamiento para pacientes inmunosuprimidos.

La movilización de CPH es utilizada en programas de trasplantes alogénicos y autólogos, reconstitución de Medula Ósea (MO), en pacientes con tumores sólidos y en la recuperación CPH desde la sangre periférica. Lograr una movilización exitosa, puede depender de diversos factores tales como edad, peso, patologías, cargas de quimioterapia recibidas, intensidad del tratamiento; concomitante con las características del producto utilizado para la estimulación y la dosis administrada.

Este trabajo pretende analizar el comportamiento de la movilización de las células CD34+ a sangre periférica en 18 individuos con enfermedad arterial oclusiva crónica (EAOC) sometidos al estímulo con FSC-Grh.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La medicina regenerativa se está estableciendo como una alternativa en la reparación de órganos y tejidos afectados por distintas patologías. Un ejemplo es el tratamiento que se está realizando para la enfermedad obstructiva crónica de las extremidades inferiores. Esta enfermedad se caracteriza por ser extremadamente incapacitante, afectando un 3,5% de las personas mayores de 60 años. Los objetivos terapéuticos actuales en la isquemia crítica de las extremidades inferiores (EEII) son aliviar los síntomas y mejorar la calidad de vida (evitar la pérdida de la extremidad). La fuente principal para lograr este objetivo es la célula madre adulta; para obtener este tipo de células existen ensayos clínicos y protocolos que utilizan la estimulación de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) en la médula ósea, produciendo la aparición de estas a sangre periférica (movilización). La aplicación de FEC-Grh permite la movilización a la periferia de CPH, las cuales pueden ser monitorizadas utilizando marcadores específicos tales como el CD34+. Se ha demostrado que la reserva de CPH en médula ósea es variable de acuerdo a la edad, sexo, peso, calidad de vida y enfermedades.

En 1997 el grupo de Asahara y cols., demostró que las CPH, en la sangre periférica (SP), son capaces de diferenciarse *in vitro* a células endoteliales maduras, en respuesta a los factores de crecimiento VEGF, Factor de crecimiento fibroblástico [FGF] y angiopoyetinas, e *in vivo*, son capaces de contribuir a la angiogénesis.

### 3. JUSTIFICACION

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas movilizadas es una opción terapéutica que se utiliza cada vez con mayor frecuencia, no solo en trasplantes alogénicos o autólogos de enfermedades ligadas al sistema sanguíneo. Las aplicaciones son la utilización en terapia celular para la enfermedad arterial oclusiva crónica, reacondicionamiento del sistema Inmune utilizando CPH post mieloablación en enfermedades autoinmunes, entre otras.

El conocimiento de los factores que intervienen en la movilización de células CD34+ en los pacientes de nuestro medio, puede contribuir a la disminución de los costos de la movilización de las CPH, ya que nos permitiría conocer las dosis exactas de medicamento y de esta manera realizar solo un esquema de recuperación de células por aféresis disminuyendo los costos con respecto al número de ampollas aplicadas.

El objetivo del actual estudio es describir factores clínicos del paciente que afecten la movilización de CPH autólogas post estimulación con FEC-Grh.

#### **4. HIPOTESIS**

Existen factores clínicos que modifican la respuesta a la movilización a sangre periférica con Filgrastim en pacientes con enfermedad arterial oclusiva crónica que van a ser llevados a terapia con células progenitoras hematopoyéticas.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo General**

Describir factores clínicos del paciente que afecten la movilización de CPH CD34+ autologas a sangre periférica, post estimulación con Factor Estimulante de Colonia Granulocíticas (FEC-Grh).

### **5.2. Objetivos Específicos**

- Describir los cambios en sangre periférica del grupo de pacientes antes y durante la aplicación del Filgrastim (FEC-Grh)
- Determinar que características clínicas podrían asociarse con la respuesta a la movilización con filgrastim.
- Comparar la respuesta a la movilización con filgrastim de los pacientes con las reportadas en la literatura.

## 6. MARCO TEORICO

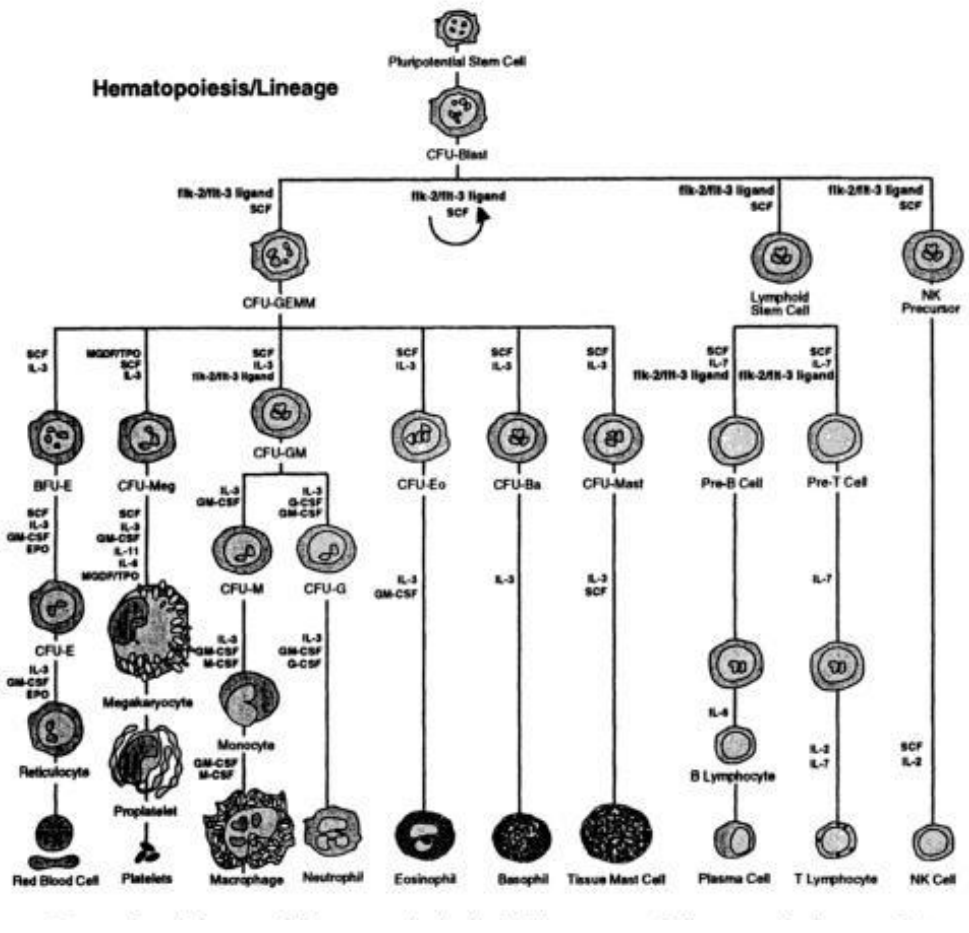
### 6.1. Sistema Hematopoyético

La medula ósea almacena y produce todas las células precursoras hematopoyéticas de las cuales se originan los diferentes tipos de células maduras que tienen diferentes linajes y funciones especializadas (Ramírez, *et al.*, 1997). Para mantener un adecuado número de células circulantes en sangre, se deben reemplazar en igual grado las que se van perdiendo; por ejemplo, algunas células mieloides necesitan ser producidas en una concentración de  $5 \times 10^{11}$  por día en los humanos, sólo para responder su pérdida debido a los procesos de envejecimiento normal (Ramírez, *et al.*, 1997).

El balance que mantiene el número de células madre hematopoyéticas por procesos de regeneración, y la pérdida de células madre hematopoyéticas a través de la diferenciación y maduración, es vital para la homeostasis del organismo.

En el sistema hematopoyético se reconocen diversos tipos celulares, que podemos agrupar en: células madre, células progenitoras y células maduras. El inicio del proceso de diferenciación hematopoyética se encuentra en el compartimiento de células madre o células troncales hematopoyéticas (*hematopoietic stem cells*) (CMH). Este grupo de células es el responsable de la generación continua y de por vida de todas las células hemáticas maduras (*Figura 1*). Las CMH son células con gran capacidad de autorrenovación y diferenciación; características que se van perdiendo conforme las células hematopoyéticas se diferencian en linajes más maduros (Akashi, *et al.*, 2000).





**Figura 1.** Esquema de hematopoyesis partiendo de las CPH, que inducida por factores de crecimiento específicos generan distintas líneas celulares hemáticas. (Morstyn, G., *et al.*, 1998).

### **6.1.1. Células progenitoras hematopoyéticas (CPH)**

Las CPH se caracterizan por ser células progenitoras adultas con capacidad de diferenciarse a los variados linajes sanguíneos (mielocítico, megacariocítico, linfocítico, eritrocítico y monocítico). Las CPH, provienen de CMH, la cual sufre un estímulo que la dirige a comprometerse en el linaje hematopoyético (Hoffman, *et al.*, 2004). Tanto las CMH, como las CPH expresan combinaciones de moléculas o antígenos en la membrana celular, los cuales permiten su identificación; estos, a través de la maduración se van perdiendo concomitantemente con la expresión de marcadores nuevos propios de determinado linaje. La detección de estos marcadores facilita la identificación y aislamiento de grupos celulares particulares. A pesar del gran número de estudios realizados, aún no se ha podido encontrar un único marcador específico de las CMHs. Sin embargo, el uso de combinaciones de marcadores permite agrupar en subgrupos mezclas de células funcionalmente heterogéneas con algunas características en común. Las células hematopoyéticas primitivas no expresan marcadores de linaje propios. Esta ausencia permite distinguir las células inmaduras del resto de células diferenciadas, siendo éstas últimas más abundantes (Wognum, *et al.*, 2003).

La molécula de superficie más importante para la identificación de CPH es CD34, este marcador se ha empleado para enumerar, aislar y manipular esta célula; no obstante, existen otros marcadores relacionados conocidos como CD133, el CD 90 y el CD117; otros avances recientes describen como marcador para estas células, el factor de crecimiento vascular (KDR) (Bellantuono, 2004).

### **6.2. Antígeno de superficie CD34**

El antígeno CD34 es una proteína monomérica de peso molecular entre 110 y 120 KDa con una región amino terminal extracelular que contiene un dominio proximal de 66 aminoácidos conformado por seis residuos de cisteínas y al parecer con una

forma globular. De los 145 aminoácidos que componen el dominio N-terminal, 35% son residuos serina o treonina; este dominio también incluye 7 de 9 sitios potenciales de glicosilación (Lanza, *et al.*, 2001). Esta sialomucina, fue el primer marcador de diferenciación reconocido en las células hematopoyéticas primitivas humanas y se continúa usando para aislar progenitores y CMH para uso clínico (Wognum, *et al.*, 2003). Este marcador también se expresa en células endoteliales de vasos pequeños y en fibroblastos embrionarios (Sutherland y Keating, 2000).

El antígeno CD34 es codificado por un gen ubicado en el cromosoma 1q32, región que contiene a su vez varios genes codificadores para moléculas de adhesión celular tales como la selectina L, selectina P, selectina E y laminina B2. Aunque su función no está completamente conocida, se ha considerado que puede servir como ligando de la selectina-L, dependiendo de su adecuada glicosilación y sulfatación (Lanza, *et al.*, 2001). También se cree que el antígeno CD34 juega un papel importante tanto en la adhesión intercelular célula- célula, célula-matriz extracelular, induciendo la polimerización de actina (Lanza, *et al.*, 2001). Así mismo, se ha demostrado que la regulación de la expresión del antígeno CD34 está implicada en el mantenimiento de la actividad hematopoyética normal gracias a la inhibición de la proliferación de células progenitoras, mediada por contacto y agregación celular (Lanza, *et al.*, 2001). Por sus características anteriores la molécula CD34 permite la identificación, aislamiento y cuantificación de poblaciones de CMH/CPH, células iniciadoras de cultivo de largo término (CI- CLT), en gran parte de las células formadoras de colonias (CFC) y en células progenitoras linfoides y mieloides (Szilvassy, 2003). Las células que expresan este marcador poseen un gran potencial de repoblación *in vivo* y tienen la capacidad de generar progenie eritroide y mieloide (Sutherland y Keating, 2000).

En sangre periférica, aproximadamente un mililitro de sangre contiene en promedio  $4 \times 10^3$  células/ $\mu$ l CD34+ las cuales corresponden al 0.06% de las células nucleadas

totales; y conforman entre el 0.1-1% de células nucleadas de sangre de cordón umbilical (SCU) (Wognum, 2003).

### **6.3. Cuantificación de CPH**

Para determinar el número y estado de las CPH, es necesaria la utilización de técnicas que de forma precisa y rápida identifiquen las CPH por medio de las características especiales que poseen.

La citometría de flujo es una técnica que se basa en la identificación de fenotipos celulares por medio de la detección de antígenos de superficie marcados con un anticuerpo específico unido a un fluorocromo (Mckenzie, 2000). El uso de anticuerpos monoclonales acoplados con fluorocromos tienen una alta afinidad hacia las moléculas de superficie CD34 y CD45, generando unión antígeno anticuerpo, marcando la célula pudiendo ser detectada bajo el estímulo de la luz láser que excita el fluorocromo acoplado al anticuerpo y por tanto a la célula, produciéndose una emisión de luz específica (determinada longitud de onda) la cual es detectada por el sistema y transformada en un impulso eléctrico que es captado por un sistema de software, permitiendo determinar la cantidad y presencia de CPH (Johnson, 1992).

#### **6.3.1. Protocolo de la Sociedad Internacional de Hemoterapia e Ingeniería de Tejidos (ISHAGE)**

El protocolo ISHAGE aplicado en citometría de flujo inicialmente se describió como una técnica de doble plataforma, con una combinación de CD45 FICT (isotiocianato de fluoresceína) y CD34 PE (ficoeritrina), se adquiere un mínimo de 7500 eventos o 100000 eventos CD34+ (Sutherland, *et al.*, 1996). Como principio se eliminan los eventos que interfieran con el recuento real de CD34+: se eliminan partículas interferentes, plaquetas y glóbulos rojos no lisados, y se seleccionan las células CD45+. Las células CD34+ verdaderas son aquellas que tienen baja complejidad

(SSC<sup>low</sup>), CD45<sup>dim</sup>, CD34+. Se han realizado algunas modificaciones al protocolo, entre estas la adición de un número conocido de perlas fluorescentes, quedando como protocolo de una plataforma. Otras modificaciones consisten en la adición de un colorante supravital 7 amino actimocina D (7AAD) que evalúa la viabilidad de las células, y el aumento de eventos (200 eventos) CD34+ (Sutherland, *et al.*, 1996).

#### **6.4. Factores de crecimiento y el control de la hematopoyesis**

La regulación de la diferenciación y expansión de las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) es crítica, ya que determina la concentración de varios tipos celulares en la médula ósea (MO) y, posteriormente, en la sangre periférica. La supervivencia, autorrenovación, proliferación y diferenciación de las CPH está controlada por glicoproteínas específicas denominadas factores de crecimiento hematopoyéticos, los cuales desempeñan una función importante para regular la producción celular sanguínea a través de la inhibición de la apoptosis. (Williams, *et al.*, 1990; Koichiro, y Krantz, 1993).

Los factores de crecimiento pertenecen a un grupo de mediadores solubles denominados citoquinas, son producidos por diversas células ejerciendo múltiples funciones en ellas; además permiten la comunicación entre estas, produciéndose un microambiente celular específico.

La complejidad funcional de los factores de crecimiento fue simplificada por Bagby y Seal (Mckenzie, 2000) (**Tabla 1**). Con ocho reglas generales; teniendo en cuenta que los factores de crecimiento se caracterizan por su actividad sinergista entre ellos. Sin embargo, existen factores de crecimiento indirectos los cuales estimulan a otras células para que produzcan otros factores de crecimiento específicos de células hematopoyéticas (Galli, *et al.*, 1993).

### **Reglas generales de los factores de crecimiento hematopoyéticos y biología de las interleucinas**

1. Cada factor de crecimiento hematopoyético o interleucina muestra múltiples actividades biológicas
2. Los factores de crecimiento e interleucinas que inducen proliferación de CPH con frecuencia aumentan la actividad funcional de la progenie finalmente diferenciada de estas células precursoras.
3. Los factores que estimulan hematopoyesis lo pueden hacer en forma directa o indirecta.
4. La mayor parte de los factores de crecimiento hematopoyéticos y las citoquinas funcionan de forma sinérgica con otros.
5. La red de citoquinas de control hematopoyético esta organizada de una manera jerárquica.
6. La red de citoquinas muestra muchos circuitos de amplificación de señales.
7. Los genes que codifican estas proteínas comparten similitudes importantes tanto funcionales como estructurales.
8. Las anormalidades de control o estructurales de los factores de crecimiento hematopoyético o de la expresión de los genes de los factores de crecimiento pueden provocar anormalidades de la hematopoyesis.

**Tabla 1.** Reglas generales de los factores de crecimiento hematopoyético (Mckenzie, 2000).

#### 6.4.1. Características de los factores de crecimiento

Los factores de crecimiento pueden dividirse en dos grupos: factores estimulantes de colonias (FEC) e interleucinas (IL). Entre los FEC se encuentran: Factor de Células Progenitoras (FCP; ligando c-Kit), Factor estimulante de colonias granulocito macrófago (FEC-GM), Factor estimulante de colonias granulocítico (FEC-G), Factor estimulante de colonias monocítico (FEC-M), Eritropoyetina (EPO) y Trombopoyetina (TPO) (Williams, *et al.*, 1990). Estos tienen la característica de ser estimulantes específicos como FEC-G, EPO, FEC-M y TPO; y de multilínea (IL-3, FEC-GM, IL-1, IL-6, IL-11 y FCP) (Morstym y Burgués, 1988). Los factores de crecimiento promueven el desarrollo y la maduración de los progenitores hematopoyéticos y regulan la actividad funcional de las células maduras (Gabrilove, 1989).

Los factores de crecimiento son secretados por diferentes tipos de células maduras como monocitos, macrófagos, linfocitos T, fibroblastos y células endoteliales (McNiece y Zsebo, 1993); estos factores interactúan sobre un tipo de células blanco la cual presenta receptores transmembranales específicos. El número de receptores específicos para su ligando en la superficie de la célula es pequeño, ya que solo un bajo nivel de receptores es necesario para que el factor se una y tenga efecto de activación en la célula. Una vez que el factor se une a su receptor, se transmite una serie de señales químicas (fosforilativas) las cuales conducen la activación y/o cambios conformacionales de moléculas las cuales se dirigen hasta el núcleo celular con el fin de activar la producción de ciertas sustancias determinadas como lo son los factores de crecimiento (McNiece y Zsebo, 1993).

La mayor parte de los factores de crecimiento son secretados por células establecidas en el microambiente de la MO, son glucoproteínas con un peso molecular que oscila entre 14000 y 90000 daltons, son efectivos en concentraciones picomolares y no suelen detectarse en sangre circulante; su función es brindar apoyo a la

autorrenovación, proliferación y diferenciación de las células progenitoras, así como también proporcionar soporte físico y puntos de adhesión intercelulares y de microambiente (Cherry, *et al.*, 1994).

### 6.5. Factores de crecimiento de linaje específico

Los factores de crecimiento linaje específico tienen un espectro más estrecho de influencia y trabajan de manera sinérgica con los factores de crecimiento multilínaje para producir maduración a lo largo de un tipo celular específico. Estos incluyen FEC-G, FEC-M, EPO, TPO y las interleucinas restantes (Mckenzie, 2000).

- **Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (FEC-G):** factor de crecimiento hematopoyético, que estimula la proliferación y diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas neutrófilas y granulocíticas. El FEC-G también ha demostrado que modula la función de neutrófilos maduros *in vitro* e *in vivo*, incluyendo la supervivencia (Begley, *et al.*, 1986), degranulación (Haas, *et al.*, 1994; Xu, *et al.*, 1996), quimiotaxis (Smith, *et al.*, 1994; Yong, 1996), expresión de moléculas de adhesión (Yuo, *et al.*, 1989; Ohsaka, *et al.*, 1994) y actividad bactericida y fagocítica (Roilides, *et al.*, 1991).

Es producido principalmente por las células hematopoyéticas, como monocitos / macrófagos y linfocitos en respuesta a la acción de moléculas como lipopolisacáridos (LPS), Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ) e Interferon-gamma (IFN-  $\gamma$ ) (Sallerfors y Olofsson, 1992; Sallerfors, 1994). Otras células, como fibroblastos (Kaushansky, *et al.*, 1988), células endoteliales (Zsebo, *et al.*, 1988) y células estromales de médula ósea (Fibbe, *et al.*, 1988), producen también FEC-G luego de la activación por IL-1 o TNF-  $\alpha$ .

- **Eritropoyetina (EPO):** Es una hormona sintetizada por el riñón que viaja hacia la médula ósea estimulando la producción de eritrocitos; su liberación esta



regulada por las necesidades de oxígeno del cuerpo. Puede tener influencia temprana sobre las unidades formadoras de colonias de brotes eritroides (UFC-BE), tienen influencia directa sobre las unidades formadoras de colonias eritroides (UFC-E) y la progenie posterior; las formas más maduras del linaje como reticulocitos y los eritrocitos no tienen receptores para EPO por ende no son influidos por este factor de crecimiento (Eastment y Ruscetti, 1981).

- **Factor Estimulante de Colonias de Monocitos (FEC-M):** Su función es estimular la UFC-GM para diferenciarse en monocitos y macrófagos. El receptor de la célula para este factor está codificado por el protooncogén, c-fms. (Sherr, 1989). Este factor también tiene efecto en la función de los monocitos. Estimula a los monocitos para producir FEC-G, FNT, IL-1 e IFN; también incrementa la actividad humoral y la citotoxicidad dependiente de anticuerpos.
- **Trombopoyetina (TPO):** Estimula la maduración de megacariocitos e influye en la producción de plaquetas.
- **Interleucina- 2 (IL-2):** estimula la activación y proliferación de linfocitos B y T y las células asesinas naturales (NK). Tiene también un efecto de tipo inhibitorio en granulocitos, monocitos y tipos celulares eritroides.
- **Interleucina-4 (IL-4):** Estimula la proliferación y activación de linfocitos B (LB), linfocitos T cooperadores (LTh), linfocitos T citotóxicos (LTc), células cebadas y fibroblastos. La IL-4, induce en el LB el cambio de síntesis de inmunoglobulinas de IgM a IgG e IgE. Interactúa con la IL-2 para eliminar la proliferación de LB y para mantener a los LT; estimula el crecimiento de UFC-BE o UFC-E en presencia de EPO, FEC-GM y FEC-E (Mckenzie, 2000).

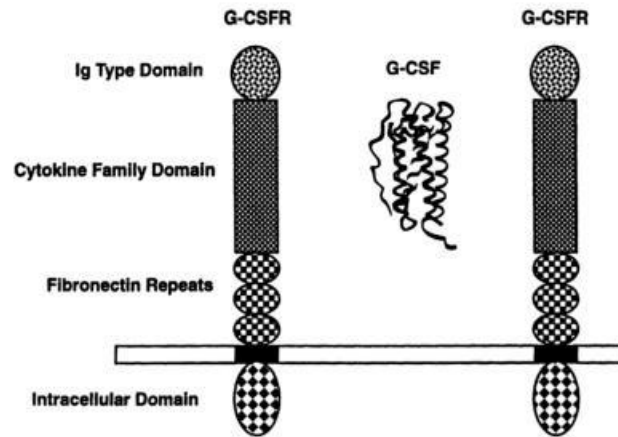
- **Interleucina-5 (IL-5):** Actúa tanto en células mieloides como en linfoides. Junto con el FEC-GM estimula la diferenciación y proliferación de eosinófilos. Estimula también el desarrollo de LB y activa a los LTc.
- **Interleucinas-7, 8 y 9 (IL-7, 8, 9):** La IL-7 estimula el crecimiento de los linfocitos y quizá de megacariocitos. La IL-8 es quimiotáctico para los neutrófilos y la IL-9 estimula o influye en la formación de colonias eritroides y de megacariocitos. (Smith y Yee, 1992)

### 6.6. Bioquímica y estructura del FEC-G

Las citoquinas son una familia de glicoproteínas que tiene actividades biológicas esenciales para la proliferación y diferenciación de células madre progenitoras hematopoyéticas. Ellos trabajan independiente y sinérgicamente para enfocar la producción de células mieloides y leucocitos según los desafíos biológicos del organismo (Nicola, 1990; Golde, *et al.*, 1988). El FEC-Grh, Filgrastim (r-metHuG-FSC), tiene 175 aminoácidos (incluido la iniciación metionina).

### 6.7. Receptor del FEC-G

Los receptores del FEC-G han sido identificados (Demetri, *et al.*, 1991; Nicola, 1989) (**Figura 2**). El receptor del FEC-G está expresado en las células del linaje neutrofilos desde mieloblastos hasta neutrófilos maduros, como también en las pequeñas poblaciones celulares del linaje monocítico. Los receptores también han sido encontrados en líneas celulares no hematopoyéticas (Mazanet, *et al.*, 1992). Los receptores son sencillos, con alta afinidad y, específicos para el FEC-G (Nicola, 1989). La densidad de los receptores varía de 50 a 500 por células, y la afinidad al receptor equivale aproximadamente a 100pM. Estudios en ratones han mostrado que el número de receptores del FEC-G es mayor en células maduras (Demetri, *et al.*, 1991; Nicola, 1989).



**Figura 2.** Representación esquemática de la estructura del receptor del FEC-Grh. Un diagrama de cinta de Filgrastim ha sido insertado entre dos moléculas del receptor de filgrastim sugiriendo que la señal de transducción es relacionado uniéndose al ligando a dos moléculas del receptor (Morstyn, G., *et al.*, 1998).

La estructura bioquímica del receptor es una glicoproteína de 130 a 150kD que puede ser regulada por la disminución de los lipopolisacaridos, por N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP), o el FEC-GM (Nicola, 1989). El receptor del FEC-G humana esta codificado en la posición 1p35-p34.3 del cromosoma (Inazawa, *et al.*, 1991) y contiene 17 exones que están distribuidos aproximadamente en 16.5 pares de kilobase (kpb) de DNA (Seto, *et al.*, 1992). El gen del receptor del FEC-G no contiene la clásica TATAbox pero el mayor sitio de iniciación de la transcripción está ubicado 20bp por encima de la caperuza con un sitio menor de iniciación de 10bp (Seto, *et al.*, 1992).

Los receptores de humanos y murinos tienen un dominio sencillo transmembranal de 813 y 812 aminoácidos, respectivamente. Dentro del dominio extracelular de los receptores del FEC-G, estos tienen menos de 3 regiones que son estadísticamente significativa idéntica a otras proteínas. Estas son el dominio Ig-like, 3 fibronectinas tipo 3 en unidades repetidas y el WSXWS común en la familia de receptores de citoquinas.

### **6.8. Uso clínico de los factores de crecimiento hematopoyéticos**

La clonación y caracterización de los genes que codifican a los factores de crecimiento hematopoyético han permitido producir factores de crecimiento mediante tecnología de DNA recombinante. Lo anterior abre la puerta para utilizar factores de crecimiento en regímenes terapéuticos para atender trastornos hematopoyéticos (Arcenas y Vadhan, 1993). Un ejemplo claro de esto es la producción del Factor Estimulante de colonias Granulocíticas recombinante humano (FEC-Grh); existiendo de dos formas: No glicosilado y Glicosilado.

La forma no glicosilada del FEC-Grh, es una proteína hidrosoluble, conocida como Filgrastim, contiene un Metionilo en el extremo N-terminal (Metionilo recombinante humano FEC-G), consiste de 175 aminoácidos, derivados de la traducción en

*Escherichia Coli*. (Zsebo, *et al.*, 1986; Lu, *et al.*, 1992). El FEC-G glicosilado, es conocido como Lenograstim®, es producido en células de ovario de hámster chino (CHO), posee una unión O a carbohidratos en la Treonina 133 de la molécula. Se ha reportado que la glicosilación le confiere ventajas en términos de estabilidad *in vitro*, aunque no parece ser esencial para la actividad biológica de la molécula de FEC-G. (Somerville, *et al.*, 1999)

El FEC-Grh induce la supervivencia y proliferación de células progenitoras mieloides, como también su diferenciación hacia neutrófilos, estimula la descarga de neutrófilos maduros de médula ósea y provoca su activación. La terapéutica con FEC-Grh produce un aumento de células progenitoras en sangre periférica, (Kanz, *et al.*, 1991) permitiendo manipular y regular el sistema hematopoyético aumentando el número de CPH circulantes de una forma dosis dependiente; se cree que la movilización de CPH se debe a la capacidad del FEC-Grh para regular las moléculas de adhesión intercelulares endoteliales y vasculares.

## **6.9. Aislamiento y caracterización del FEC-G**

### **6.9.1. FEC-G Humano**

Usando ensayos similares a los desarrollados en la caracterización de FEC-G de murinos (inducción de diferenciación de células WEHI-3B y estimulación de crecimiento de células progenitoras normales *in vitro*) (Metcalf, 1980), fueron utilizada la línea celular de carcinoma 5637 llamada “pluripoyetina” ya que tiene la habilidad de estimular la proliferación y el desarrollo de células progenitores mieloides multipotentes *in vitro* (Welte, *et al.*, 1985). Cuando esta actividad fue molecularmente clonada y expresada en una proteína recombinante se demostró (usando células progenitoras de médula ósea enriquecidas) la habilidad de estimulación de esta sobre los progenitores hematopoyéticos (Nicola, 1983).

### **6.10. El FEC-G en hematopoyesis normal**

El papel fisiológico del FEC-G no se ha analizado muy a fondo. En el caso de FEC-G, las investigaciones han rendido avances considerables en cuanto a las funciones que este desempeña en la hematopoyesis.

Al contrario de otras moléculas reguladoras, el FEC-G es detectable en sangre, aunque normalmente el nivel es menor de 10 pg/ml en plasma (Kojima, *et al.*, 1996). Niveles altos han sido documentados en varios estados de enfermedad. Pacientes neutropénicos tienden a tener niveles circulantes superiores, mientras que pacientes neutropénicos con fiebre y bacteremia tienden a tener niveles aumentados de 1000 a 100000 pg/ml en sangre (Cebon, *et al.*, 1994).

Es probable que el factor, junto con otras citocinas, esté involucrado en la respuesta a la neutropenia y/o la infección bacteriana. El FEC-G está también presente en altas concentraciones en fluidos ligados al embarazo y estadios tempranos en la infancia. El fluido amniótico contiene altos niveles de FEC-G (Weimann, *et al.*, 1995) y la concentración es más elevada en episodios infecciosos, hipertensión (HTA) y en el desarrollo prematuro (Saito, *et al.*, 1993; Russell, *et al.*, 1994).

### **6.11. Movilización de células progenitoras a sangre periférica**

La reagrupación de células progenitoras hematopoyéticas, de médula ósea a sangre periférica, bajo la influencia del FEC-Grh es un procedimiento establecido en clínica y sistemas experimentales. Las células circulantes estimuladas por FEC-Grh tienen la ventaja de ser accesibles y mostrar un comportamiento superior al convencional a las que presentan las provenientes de médula ósea en término de recuperación a corto plazo.

Investigaciones realizadas demostraron El FEC-Grh induce la quimotaxis o movilización de células CD34+ establecidas en el microambiente de la MO hacia SP.

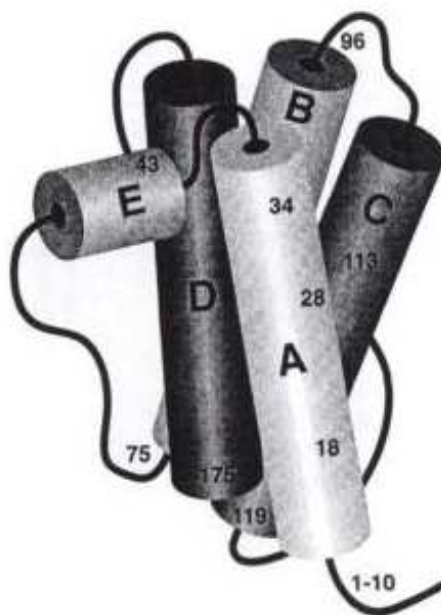
Un estudio demostró que pacientes con cáncer se incrementan su número de células CD34+ luego de utilizar el FEC-Grh (Slowman, *et al.*, 1994).

## **6.12. Filgrastim**

### **6.12.1. Estructura del filgrastim**

Estructuras cristalográficas de rayos X relatan que si las citoquinas, interleucina 2 y la hormona de crecimiento humano (hGH) exhiben cuatro bucles en cuatro hélices alfa (*Figura 3*). Confirmando y mostrando que el Filgrastim tiene cuatro hélices antiparalelas con angulos cruzados de 18 grados cerrados que dan la idea de una hélice.

Se ha demostrado que como primer mecanismo afecta a los progenitores neutrófilos en su proliferación, diferenciación y selección funcional final (Morstym, *et al.*, 1998). El filgrastim al ser un FEC-G de linaje específico tiene una selectividad para el linaje de neutrófilos actúa por unión a receptores específicos de la superficie celular presentes en las células precursoras neutrófilas y tienen la capacidad de disminuir el tiempo normal de la maduración de los neutrófilos en médula ósea a 1 día, siendo lo normal de 5 a 6 días. Los neutrófilos maduros liberados a circulación periférica son funcionalmente activos (Morstyn, G., *et al.*, 1998).



**Figura 3.** Representación esquemática de la estructura del FEC-Grh. Tiene 4 alfa hélices anti-paralela en forma de bucle, se conocen como A, B, C y D y hay una 5 hélice, E, la cual es más corta. Las hélices están conectadas con dos vueltas largas y una vuelta corta. La posición de los aminoácidos se enumera e indican en la figura (Morstyn, G., *et al.*, 1998).



### **6.12.2. Mecanismo de movilización de CPH**

El mecanismo por el que se refuerza la liberación de CPH de médula ósea hacia sangre periférica bajo la influencia del FEC-Grh aun es desconocido. Reportes sugieren que existe un rol de las moléculas de adhesión extracelular y/o receptores del estroma de la médula ósea en la estimulación de las células CD34+ (Moehle, *et al.*, 1993). Las moléculas VLA-4 y LFA-1 (CD11a) encontradas en células estromales son receptores para la molécula de adhesión celular vascular- 1 (VCAM-1), moléculas de adhesión intracelular- 1 (ICAM-1, CD54) y molécula de adhesión celular endotelial1 (PCAM-1) (Leavesley, *et al.*, 1994). Se ha encontrado que la movilización terapéutica de células CD34+ (usando el FEC-Grh) muestra la reducción en la expresión de VLA-4 y LFA-1 pero niveles inalterables de PECAM-1. Estos datos preliminares sugieren que los cambios en las propiedades adhesivas de las células CD34+ en respuesta al FEC-Grh u otro agente de movilización permiten el movimiento de las células desde su microambiente hacia sangre periférica por la estabilidad del PECAM-1 (Craddock, 1995).

Otros ensayos en los cuales se genero un bloque por anticuerpos de la molécula VLA-4 y la estimulación con FEC-Grh aumenta la movilización de CD34+. Estos datos muestran que el VLA-4 media en el proceso de adhesión en el microambiente medular, y que al inhibirse, se induce una migración de los CPH por FEC-Grh de MO a sangre periférica.

### **6.12.3. Efectos del FEC-G sobre la eritropoyesis**

La eritropoyesis fue suprimida en ratones después de prolongar el tratamiento con FEC-Grh (Molineux, *et al.*, 1990; Cronkite, *et al.*, 1993; Moore, *et al.*, 1990). En los primeros días de tratamiento (4 a 5 día) la deficiencia se vio únicamente en el conteo diferencial de la médula y en la incorporación radiactiva de hierro en la médula ósea, pero este déficit desplaza la producción de eritrocitos (a un grado grande) por el

incremento de la actividad eritropoyética notada en el bazo (Pojda, *et al.*, 1990; Molineux, *et al.*, 1990). En ratones con esplenectomía, sin embargo, la administración prolongada de FEC-Grh resulta en anemia. Esta anemia fue presentada en animales no esplenectomizados solamente después de la dosis de 250µg/kg/día, pero también en ratones tratados con 10µg/kg/día, a una dosis de uso clínico rutinario.

#### **6.12.4. Efectos del FEC-G sobre la trombopoyesis**

Los datos recolectados de estudios clínicos de pacientes tratados con FEC-Grh no han indicado un impacto significativo en los recuentos de plaqueta (Bishop, 1994). Entonces, recientes estudios (Baer, *et al.*, 1996), se administró FEC-Grh en pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) no tratada, indicando una reducción en el número de plaquetas en respuesta al FEC-Grh.

## **7. MATERIALES Y METODOS**

### **7.1. Diseño de la investigación**

El estudio se desarrollo bajo un diseño observacional descriptivo transversal tipo serie de casos.

### **7.2. Población de estudio**

La población de referencia son los pacientes que participaron en el estudio Angiogénesis Terapéutica en Enfermedad Arterial Oclusiva Crónica (EAOC), realizado en el Hospital Militar Central (HMC) entre Febrero y Junio de 2008.

Como muestra se tomaron las 21 historias clínicas de los pacientes incluidos en el grupo descrito a los cuales se aplicaron los criterios de selección.

#### **Criterios de inclusión**

1. Pacientes con enfermedad arterial oclusiva crónica (EAOC), definida según el protocolo del estudio de Angiogénesis Terapéutica en EAOC (*Anexo 2*).
2. Pacientes sin límite de edad, e independiente de cualquier sexo.
3. Que hayan recibido el Factor estimulante de Colonia granulocíticos.
4. Que hayan ingresado al protocolo entre Febrero y Junio de 2008, firma consentimiento informado (*Anexo 1*).

#### **Criterios de exclusión**

1. Pacientes con datos incompletos o sin acceso al registro clínico dentro del grupo de estudio de Angiogénesis Terapéutica en Enfermedad Arterial Oclusiva Crónica (EAOC)

2. Pacientes que hayan sido excluidos de la cohorte de seguimiento del estudio Angiogénesis Terapéutica en EAOC, debido a inasistencia ó que voluntariamente hayan abandonado dicho estudio.

### 7.3. Definición de Variables de Investigación

<b>DEFINICIÓN DE VARIABLES DE INVESTIGACIÓN</b>			
<b>Variable</b>	<b>Definición</b>	<b>Medición</b>	<b>Indicador/categoría</b>
<b>Variables demográficas</b>			
Sexo	Características ontogenéticas diferenciales entre hombres y mujeres	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Femenino</li> <li>•Masculino</li> </ul>
Edad	Tiempo de vida del paciente	Numérica	# De años.
Peso	Masa corporal	Numérica	Kg
<b>Antecedentes patológicos y clínicos</b>			
Antecedentes patológicos	Estados mórbidos y afecciones orgánicas previas.	Categoría Nominal	<ul style="list-style-type: none"> <li>•A.C.V.</li> <li>•E.P.O.C.</li> <li>•H.T.A.</li> <li>•Tabaquismo</li> <li>•Diabetes Mellitus</li> <li>•Antecedente de enfermedad coronaria</li> <li>•Patologías vasculares</li> </ul>
<b>Indicadores diagnósticos</b>			
Resultados de Paraclínicos	Indicadores de química sanguínea del estado basal del paciente.	Numérica	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Creatinina</li> <li>•B.U.N.</li> <li>•Glicemia</li> <li>•Fosfatasa alcalina</li> <li>•AST</li> <li>•ALT</li> </ul>

DEFINICIÓN DE VARIABLES DE INVESTIGACIÓN			
Variable	Definición	Medición	Indicador/categoría
	Recuento celulares de sangre periférica.	Numérica continua	Células blanco total (WBC) %- # Neutrófilos %-# Linfocitos %- # Monocitos %- # Eosinófilos %- # Basofilos %-# Células no diferenciadas (LUC) Hematocrito (HCT) Volumen corpuscular medio (MCV) Hemoglobina corpuscular media (MCH) Concentración de Hemoglobina corpuscular media (CHCM) Células rojas total (RBC) Plaquetas (PQTS)
	Proporción de subtipos celulares en recuento de leucocitos	Numérica continua	Células blanco total (WBC) $\times 10^3 / \mu\text{l}$ % Neutrófilos 40-74 # Neutrófilos $1,9-8,0 \times 10^3 / \mu\text{l}$ % Linfocitos 19 -48 # Linfocitos $0,9-5,2 \times 10^3 / \mu\text{l}$ % Monocitos 3,4-9,0 # Monocitos $0,16-1,0 \times 10^3 / \mu\text{l}$ % Eosinófilos 0-7 # Eosinófilos $0-0,8 \times 10^3 / \mu\text{l}$ % Basofilos 0-1,5 # Basofilos $0-0,2 \times 10^3 / \mu\text{l}$ Células rojas total (RBC) $4,2 -6,1 \times 10^6 / \mu\text{l}$ Hemoglobina (HGB) 12-18 g/dl Hematocrito (HCT) 37-52 % Volumen corpuscular medio (MCV) 80-99 fL Hemoglobina corpuscular media

DEFINICIÓN DE VARIABLES DE INVESTIGACIÓN			
Variable	Definición	Medición	Indicador/categoría
			(MCH) 27-31 pg Concentración de Hemoglobina corpuscular media (CHCM) 33-37 g/dl Ancho de distribución eritrocitaria (RDW) 11,5-14,5% Plaquetas (PQTS) 130-400 x 10 <sup>3</sup> /μl Volumen medio plaquetario (MPV) 7,2-11-1 fL
	Citometría	Numérica continua	Células/μl
	Efectos Adversos	Categoría Nominal	Náuseas Vomito Diarrea Espasmo Disnea Fatiga

## 7.4. Métodos

### 7.4.1. Protocolo de movilización CPH

El protocolo de movilización de células CD34+ hacia sangre periférica consistió en el uso de FEC-Grh a dosis de 600 μg/día por vía subcutánea, repartido en dos dosis diarias, en forma continua durante cinco días. Si la cifra de células CD34+ en sangre periférica al quinto día era adecuada (mayor a 40 células CD34+/μg), se procedía al inicio de la aféresis. De lo contrario, si no se alcanzaba este valor, se continuaba con la estimulación, manteniéndola hasta alcanzar el recuento deseado y entonces se procedía a la extracción.

Finalmente, si el paciente no alcanzaba el recuento de células CD34+ en sangre periférica adecuado para iniciar la extracción, se optaba por aspiración de médula ósea.

## **Materiales**

- 10 Ampollas de Filgrastim (FEC-G) 300µg Roche® para cada paciente

### **7.4.2. Protocolo de recuento de células CD34+**

El recuento de células CD34+ en sangre periférica se realizó desde el comienzo del programa por citometría de flujo, siguiendo el método International Society for Hemotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) que lleva a cabo el recuento de células CD34+ con un dispersograma SS/CD34 PE realizado sobre selección previa con CD45 FITC usando el citómetro FACScan y el programa CellQuest Pro® para análisis de citometría de flujo (Beckton Dickinson) (*Anexo 3*)

Adicionalmente se realizó cuadro hemático basal, durante la movilización; y previo a la extracción para tener control del nivel celular al administrar el FEC-Grh.

## **Materiales**

- Tubos con EDTA (BD Biosciences)
- Agujas
- Tubos (BD TruCount)
- Anticuerpo monoclonal CD34/CD45 (BD Biosciences)
- FACS flow (BD Biosciences)
- Pipeta de 10 – 100 µl
- FACS lysing (BD Biosciences)

### **Equipos**

- ADVIA 120 Hematology System (Siemens)
- ADVIA 1650 (Siemens) (Pruebas químicas)
- FASCscan (Beckton Dickinson)
- CellQuest Pro® Software (Beckton Dickinson)

### **Procedimiento**

1. Tomaron 10µl de Anticuerpo Monoclonal CD34FITC/CD45PE y colocaron en el tubo trucount.
2. 100µl de muestra de sangre agregaron en Tubos BD TruCount, se mezcló muy bien y se incubó 15 minutos en la oscuridad.
3. Se agrego 500 µl de FACS lysing e incubo 15 minutos en la oscuridad
4. Colocar la muestra en el FACScan y adquirir en el canal FL1 y 256nm
5. Las muestras fueron analizadas en el programa CellQuest Pro® bajo la plantilla de análisis ISAGHE

#### **7.4.3. Análisis Estadístico**

La información obtenida fue analizada en programa de estadística S.P.S.S. versión 11.05, previa depuración y crítica de datos para detección de inconsistencias y posibles errores en la información.

Para el análisis univariable se obtuvieron las medidas de tendencia central (media, mediana) y dispersión (desviación estándar, valores mínimos y máximos) para las variables cuantitativas y; las frecuencias y porcentajes para las variables cualitativas. Para evaluar el comportamiento de las variables numéricas según los grupos formados por las variables categóricas, se construyeron los intervalos de confianza de la media al 95%, la decisión estadística se centro sobre las pruebas U de Mann-Whitney dado que se encontró comportamiento no paramétrico al rechazarse la



normalidad estadística evaluada con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Adicionalmente se utilizó la prueba de rangos pareados de Wilcoxon para valorar las diferencias intragrupo entre los momentos pre movilización y movilización. Se asumió asociación significativa con una  $p \leq 0.05$ .

## 8. RESULTADOS

De los 21 pacientes iniciales que hicieron parte de la cohorte, 3 fueron excluidos: 2 por pérdida de seguimiento y el otro por presentar alteración psiquiátrica previa al inicio del protocolo. En los 18 pacientes restantes se describieron características clínicas generales, distribución por género, edad y resultados de laboratorio basales durante la movilización con FEC-Grh. Adicionalmente, se buscó comparar la concentración de CD34+ obtenida en sangre periférica entre dos grupos, el primero denominado con buena respuesta de movilización si cumplían con un nivel de células CD34+ mayor a 40 células/ $\mu$ l en el día 5 (quienes serían llevados a aféresis), contra el grupo de pacientes denominado con regular respuesta a la movilización debido a que tenían un valor de células CD34+ menor a 40 células/ $\mu$ l en el día 5 (quienes fueron llevados a extracción de médula ósea), por lo cual recibieron 1 ó más dosis de FEC-Grh. El análisis se realizó en función de la edad, peso del paciente, enfermedades concomitantes como Diabetes, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), Hipertensión Arterial (HTA) y tabaquismo, en el grupo general y en los dos grupos mencionados.

### **Descripción muestral**

La muestra de esta investigación quedó conformada por 18 pacientes de los cuales el 66,7% era de sexo masculino. La edad de los pacientes fue en promedio de  $67,3 \pm 10,9$  años oscilando entre un mínimo de 45 y un máximo de 80 años, con mediana de 71 años. Por otra parte se encontró que los pacientes presentaban un peso promedio de  $63,0 \pm 8,1$ kg oscilando entre un mínimo de 49 y un máximo de 75kg. (**Tabla 2**)

**Tabla 2.** Características basales de los pacientes

CARACTERÍSTICAS	DATOS DE LOS PACIENTES (n=18)
Edad (años)	67,3 ± 10,9 (45 – 80)
Peso (Kg)	63,0 ± 8,1 (49 – 75)
% sexo masculino	66,7%
Antecedentes patológicos (%)	
HTA	50,0
DM tipo 2	44,4
EPOC	11,1
Tabaquismo	11,1
ACV	5,6
IAM	5,6
Corrección abierta	5,6
Stent	5,6

HTA: Hipertensión; DM tipo 2: Diabetes Mellitus tipo 2; EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; ACV: accidente cerebro vascular; IAM: infarto agudo del miocardio.

El análisis mostró que la edad presentó un comportamiento altamente variable, mientras que el peso se comportó de manera consistente con la normalidad estadística según se pudo verificar con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, tomando como criterio un valor  $p$  de 0.05, como se puede apreciar en la **Tabla 3**.

### **Hallazgos clínicos**

Por otra parte, la descripción muestral permitió encontrar que como antecedentes patológicos el 50,0% de los pacientes presentaban HTA y el 44,4% estaban afectados por DM tipo 2. Fue menos frecuente encontrar afecciones como EPOC (11,1%), tabaquismo (11,1%), Infarto Agudo del Miocardio (IAM) (5,6%), Accidente Cerebro Vascular (ACV) (5,6%), STENT (5,6%) y Corrección abierta (5,6%). Las proporciones de los antecedentes patológicos se pueden apreciar en la **figura 4**.

### **Valoración previa a la movilización de las células CD34+ (Movilización)**

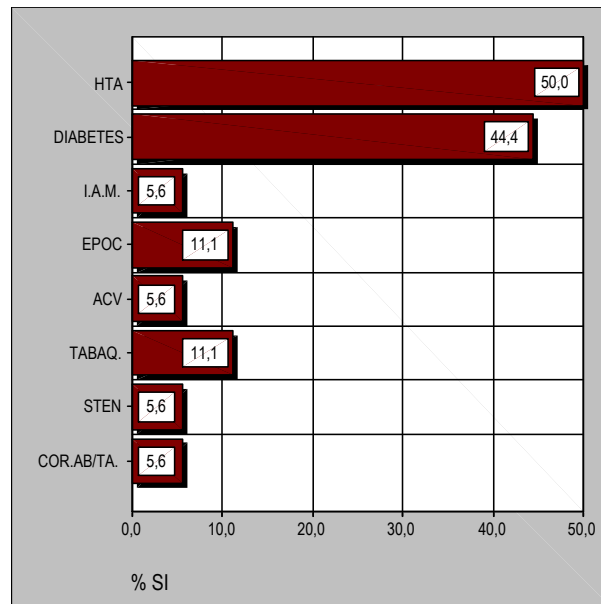
Para efectos de la terapia celular, se realizó a los pacientes una valoración de cuadro hemático y química sanguínea basal (glicemia, creatinina, urea, fosfatasa alcalina, transaminasas y PCR) antes de proceder a la aplicación del FEC-G, encontrando los valores estadísticos que se presentan en la **Tabla 4 y 5**.

**Tabla 3.** Prueba de normalidad estadística de la edad y el peso de los pacientes

	Pruebas de normalidad					
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
EDAD	,207	18	,039	,897	18	,052
PESO (kg)	,159	18	,200*	,941	18	,304

\*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors



**Figura 4.** Antecedentes patológicos de los pacientes

**Tabla 4.** Resultado del cuadro hematico basal previa a la movilización con FEC-G

	N					
	Válidos	Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo
WBC NO-MV.	17	14,84	9,87	10,91	6,91	44,83
% NEUTRÓF. NO-MV.	17	69,56	67,00	11,39	46,8	89,4
%LINF. NO-MV.	16	19,18	22,30	7,70	5,5	27,2
% MONOC. NO-MV.	17	5,19	5,30	1,37	2,5	8,2
% EOSINÓF. NO-MV.	16	2,84	1,30	2,64	,3	9,2
% BASÓF. NO-MV.	17	,43	,50	,22	,1	,9
% LUC. NO-MV.	16	1,39	1,35	,46	,5	2,4
# NEUTRÓF. NO-MV.	17	11,15	6,06	9,64	3,9	35,9
# LINF. NO-MV.	17	2,25	1,98	,83	1,31	4,19
# MONOC. NO-MV.	17	,68	,56	,36	,29	1,65
# EOSINÓF. NO-MV.	17	,49	,24	,68	,07	2,50
# BASÓF. NO-MV.	17	,09	,05	,13	,01	,50
# LUC. NO-MV.	16	,19	,14	,12	,09	,49
RBC. NO-MV.	17	5,12	5,06	,75	3,99	6,33
HGB. NO-MV.	17	15,09	15,00	2,36	11,4	21,3
HCT. NO-MV.	17	45,82	46,10	6,94	35,1	64,7
MCV. NO-MV.	16	89,46	88,30	6,34	75,5	103,7
MCH. NO-MV.	17	29,48	29,80	2,05	25,2	34,2
CHCM. NO-MV.	17	33,31	33,40	1,26	29,8	35,8
RDW. NO-MV.	17	15,04	14,80	1,82	12,4	20,1
PLT. NO-MV.	17	300,29	296,00	109,12	127,0	488,0
MPV NO-MV.	16	9,64	9,45	1,50	7,7	12,0

**Tabla 5.** Química sanguínea basal previa a movilización celular

	N					
	Válidos	Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo
GLICEMIA PRETP.	10	125,40	103,00	50,269	65	210
UREA PRETP.	9	18,133	14,900	6,8877	11,1	33,3
CREAT. PRETP.	9	1,0500	,9900	,22483	,74	1,40
FOSF. ALCALINA PRETP.	10	204,90	197,50	47,134	127	275
ASTSPP PRETP.	10	18,30	17,50	3,335	14	26
ALTSPP PRETP.	10	17,20	17,50	4,104	10	24
PCR PRETP.	9	1,950	,960	1,7280	,5	4,7

### **Valoración hematológica durante la movilización**

Al realizar los procedimientos de movilización celular, se realizó a los pacientes nuevamente cuadro hemático obteniendo los resultados que se presentan en la **Tabla 6** que corresponden al 4 ó 5 día movilización indicando el estado hematológico del paciente.

### **Valoración por citometría de flujo de la movilización celular**

Mediante citometría de flujo se valoró el estado hematológico del paciente a partir del 4 día de movilización particularmente en lo que se refiere al comportamiento de las células CD34+, en su valor absoluto. La **Tabla 7** muestra los resultados muestrales respectivos. Adicionalmente, se reportan las diferencias absolutas como gradiente de cambio en los niveles de CD34+ del día 5 vs día 4.

**Tabla 6.** Estado hematológico del paciente durante movilización

	Estadísticos					
	N	Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo
	Válidos					
WBC MV.	10	31,3490	28,8600	13,40898	14,00	56,00
%NEUTRÓF. MV.	10	82,220	83,050	4,3711	72,0	87,8
%LINFOC. MV.	10	10,560	9,550	4,1380	6,4	19,4
% MONOC. MV.	10	3,390	3,450	,6367	2,7	4,6
% EOSINÓF. MV.	10	1,850	1,550	1,0533	,5	3,5
% BASÓF. MV.	10	,520	,450	,2348	,2	,9
% LUC. MV.	10	1,460	1,350	,5461	,8	2,5
# NEU MV.	10	25,8440	23,7250	11,38960	12,28	46,70
# LINFOC. MV.	10	3,1610	3,2250	1,21577	,90	4,86
# MONOC. MV.	10	1,0760	,9800	,52669	,37	2,13
# EOSINÓF. MV.	10	,6460	,4150	,54261	,11	1,79
# BASOF. MV.	10	,1780	,1250	,13653	,03	,46
# LUC MV.	10	,4460	,4050	,22574	,15	,96
RBC MV.	10	5,1440	5,3300	,66071	3,52	5,93
HGB MV.	10	15,090	15,550	1,8941	10,4	16,7
HCT MV.	10	45,910	46,850	5,6048	31,5	50,5
MCV MV.	10	89,350	89,050	3,3659	84,8	96,0
MV. MV.	10	29,390	29,600	1,6895	26,4	32,6
CHCM MV.	10	32,86	33,00	,789	31	34
RDW MV.	10	14,930	14,550	1,8756	12,9	19,3
PLT MV.	10	245,00	250,00	89,080	109	432
MPV MV.	10	8,823	8,900	,7811	7,4	10,2

**Tabla 7.** Valoración de CD34+ durante movilización

	N					
	Válidos	Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo
CD34 DIA4	18	32,92	23,71	33,01	,36	145,98
CD34 DIA5	16	63,05	42,93	64,13	1,30	217,00
DIF. CD34 5ºd.vs.4ºd.	16	38,90	14,98	54,30	-10,80	167,31



### **Extracción de CPH movilizadas**

Los procedimientos utilizados para la extracción celular se eligieron de acuerdo a la respuesta a la estimulación con FEC-Grh, encontrándose que 11 pacientes (61,1%) fueron sometidos a aféresis mientras que 7 (38,9%) se sometieron a extracción de médula ósea. Los pacientes que al 5 día presentaran menos de 10 células/ $\mu$ l se llevaban a extracción por médula ósea y quienes tenían más de 10 células/ $\mu$ l se continuaba la movilización hasta el día 7, de manera que se pudiese obtener más de 40 células/ $\mu$ l.

Al comparar el volumen de células y el número de CMN obtenidas entre la técnica de aféresis vs. Extracción de médula ósea se encontraron los datos de la **Tabla 8**. Se puede apreciar que al comparar los límites de los intervalos de confianza tanto de volumen como del número de CMN no se encontraron diferencias significativas; lo que a su vez fue corroborado con la prueba U de Mann-Whitney, la cual reveló diferencias no significativas que indican que tanto el volumen de muestra como el número de CMN obtenidas son similares entre las dos técnicas de extracción.

### **Relación del comportamiento de CD34+ con género, edad y peso durante la movilización**

En el grupo de pacientes sometidos a movilización con FEC-Grh se obtuvo una respuesta del 61,1% con lo que se logró comprobar que variables como la edad, el género y las enfermedades no son limitantes, a diferencia del peso que sí influyó de manera significativa.

En algunos casos la movilización no fue la esperada, por esto se estudiaron los grupos por separado (buenos y regulares movilizadores) para poder correlacionar y conocer las variables que no permitieron que fuera efectiva la movilización de CD34+. **Tabla 9 y 10.**

**Tabla 8.** Comparación de volumen y CMN según técnica de obtención de la muestra

		N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
VOLUMEN	AFÉRESIS	11	199,099	52,0589	164,125	234,073	119,4	280,0
	MÉD. ÓSEA	7	183,143	28,0917	157,162	209,123	132,0	225,0
	Total	18	192,894	44,0089	171,009	214,779	119,4	280,0
CÉL. MONONUCL.	AFÉRESIS	10	2,13E+08	3,74E+08	-54339685	480925685	1490000	9,E+08
	MÉD. ÓSEA	4	3,75E+13	7,50E+13	-8,18E+13	1,568E+14	5600000	1,5E+14
	Total	14	1,07E+13	4,01E+13	-1,24E+13	3,386E+13	1490000	1,5E+14

**Tabla 9.** Pacientes con Movilización regular

PACIENTES CON MOVILIZACIÓN REGULAR							
PACIENTE	EDAD	SEXO	PESO (Kg)	CD34 DIA 4	CD34 DIA 5	ANTECEDENTES	
						Diabetes	HTA
1	77	M	55	3,07	17,87	x	x
2	73	M	73	0,36	1,3		x
3	65	M	75	1,01	2,13	x	x
4	70	M	72	20,2	27,42	x	
5	71	F	60	13,5	12,36	x	x
6	72	M	72	21,31	26		x
7	45	F	70	12,7	21,23		
<b>Totales</b>	67,6	%M: 71,4 %F: 28,6	68,1*	11,5*	13,9*	57,1 %	71,4 %

\* Totales en promedio

**Tabla 10. Pacientes con Movilización Buena**

PACIENTES CON MOVILIZACIÓN BUENA							
PACIENTES	EDAD	SEXO	PESO (Kg)	CD34 DIA 4	CD34 DIA 5	ANTECEDENTES	
						Diabetes	HTA
8	52	F	51	145,98		x	
9	65	M	65	60,19		x	x
10	61	M	69	16.7	145	x	
11	80	F	64	49.60	217	x	x
12	50	F	70	46.7	77.37		
13	77	M	57	15,06	48.3		
14	80	M	57	42,3	44,6		
15	53	M	55	41,1	121.61		
16	79	M	62	26.1	41.26		x
17	71	M	58	31.81	58.01		
18	71	F	49	40.46	158.13		x
	67,2	%M: 63;6 %F: 36,4	59,7	46,5	101,3	36,4	36,4
Significancia p	0,892	0,732	0,026 **	0,003 **	0,001 **	0,387	0,147

\*\* Significancia de  $p$  menor a 0.05

Al comparar los datos de los pacientes movilizados, se obtuvo que los pacientes pertenecientes al grupo de buenos movilizadores tenían en promedio  $67,2 \pm 11,7$  años de edad, peso de  $59,7 \pm 6,9$  Kg y niveles de CD34+ de 46,5 y 101,3 de el día 4 y 5, respectivamente; y el grupo de movilizadores regulares con un promedio de  $67,6 \pm 10,6$  años de edad, peso de  $68,1 \pm 7,6$  Kg y niveles de CD34+ de 11,5 y 13,9 en el día 4 y 5, respectivamente.

Se puede ver que los pacientes sometidos a movilización con FEC-Grh, la edad no presento correlaciones significativas con un nivel  $p$  de 0,05 con los valores de CD34+ valorados tanto el día 4 como el día 5, como se muestra en la matriz de correlaciones (*Tabla 11*). Por su parte, el peso del paciente presento correlación inversa significativa con el CD34 del día 4, mientras que la correlación con el CD34+ del día 5 no fue significativa. *Figura 5*

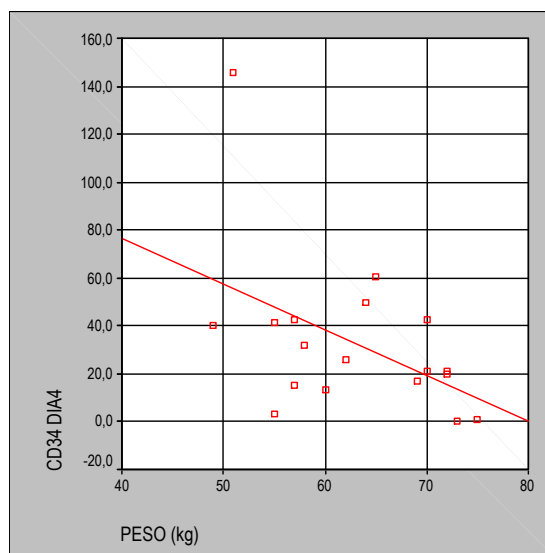
Adicionalmente, se encontró correlación significativa directa entre el nivel de CD34 del día 4 con los niveles de CD34 del día 5. De manera que se puede afirmar que en los pacientes sometidos a movilización con FEC-Grh independientemente del nivel de CD34 el día cuarto aumentaran el día quinto. *Figura 6*

**Tabla 11.** Matriz de correlaciones

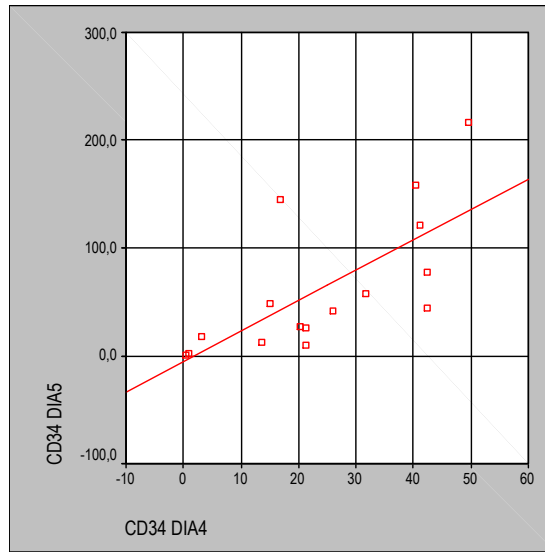
		EDAD	PESO (kg)	CD34 DIA4	CD34 DIA5	DIF. CD34 5ºd.vs.4ºd.
EDAD	r	1	-,144	-,354	,011	,038
	p	.	,568	,150	,966	,888
	n	18	18	18	16	16
PESO (kg)	r	-,144	1	-,469*	-,345	-,294
	p	,568	.	,050	,190	,270
	n	18	18	18	16	16
CD34 DIA4	r	-,354	-,469*	1	,697**	,531*
	p	,150	,050	.	,003	,034
	n	18	18	18	16	16
CD34 DIA5	r	,011	-,345	,697**	1	,978**
	p	,966	,190	,003	.	,000
	n	16	16	16	16	16

\*. La correlación es significativa al nivel 0.05 (bilateral)

\*\*.. La correlación es significativa al nivel 0.01 (bilateral)



**Figura 5.** Correlaciones significativas del CD34 con el peso del paciente



**Figura 6.** Correlaciones entre CD34 del día 4 y día 5

### **Cuadro hematico: antes vs. Durante la movilización con FEC-Grh**

Para valorar el efecto de la estimulación con FEC-Grh sobre las poblaciones celulares valoradas en el cuadro hematico antes vs. Durante el procedimiento, la **Tabla 12** muestra los niveles de significancia según la prueba de rangos de Wilcoxon. Donde se puede apreciar que el total de células blancas incrementó significativamente de la misma manera que el porcentaje de neutrófilos y el porcentaje de basofilos, mientras que los porcentajes de monocitos, eosinófilos y linfocitos disminuyeron significativamente.

Tal como se esperaba, la línea de glóbulos rojos no presento variación significativa en el número entre pre-movilización y durante la movilización al arrojar un valor de  $p$  por encima de 0,05, mientras que el numero de plaquetas disminuyó significativamente en la movilización al compararse con la pre-movilización

**Tabla 12.** Comparación pre movilización vs. Movilización de líneas celulares

	Previa movilización			Movilización		P
	N	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	
WBC	17	14,84	10,91	31,35	13,41	,015
% Neutrófilos	17	69,56	11,39	82,22	4,37	,008
% Linfocitos	16	19,18	7,70	10,56	4,14	,017
% Monocitos	17	5,19	1,37	3,39	0,64	,008
% Eosinófilos	16	2,84	2,64	1,85	1,05	,042
% Basófilos	17	0,43	0,22	0,52	0,23	,020

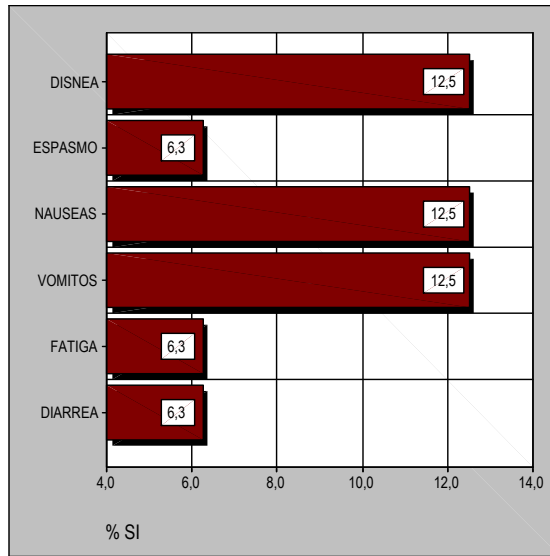
	Previa Movilización			Movilización		P
	N	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	
RBC. NO	17	5,1247	,75251	5,1440	,66071	,575
PLT. NO	17	300,294	109,1151	245,00	89,080	,011



## **Efectos Adversos Observados**

Como complemento al análisis del comportamiento de las líneas celulares y la movilización debida al suministro de FEC-Grh, seguidamente se muestran los efectos adversos presentados por los pacientes durante el proceso de estimulación y movilización. Se encontró que del grupo estudiado en 16 pacientes se tenía tal información, que indico que en cuatro de ellos se presentaron efectos adversos correspondientes al 25% de la muestra. A su vez, en la **Figura 7** se muestra la frecuencia del tipo de complicaciones donde sobresalieron la disnea, las nauseas y el vomito afectando al 12.5% de los pacientes.

En conclusión, este estudio muestra evidencias descriptivas del comportamiento de las células CD34+ en respuesta al proceso de estimulación en pacientes con EAOC seleccionadas para terapia celular. En los grupos que lograron una buena y regular movilización no se muestra una evidencia significativa entre el comportamiento del CD34+ con la edad. En lo relacionado con el peso y los niveles de CD34+ se observó que los pacientes que lograron una buena respuesta tenían un peso de 59,7Kg mientras que los pacientes con regular respuesta 68,1 Kg.



**Figura 7.** Presencia proporcional de los efectos adversos

## 9. DISCUSION

La modificación del microambiente de la médula ósea por el FEC-Grh facilita la salida de las CPH a sangre periférica (Liu, *et al*, 2000). El número de células CD34+ movilizadas se incremento de 32,92 células/ $\mu$ l ( $\pm$ 33,01células/ $\mu$ l) a 63,05células/ $\mu$ l ( $\pm$ 64,13células/ $\mu$ l) en el día 4 y 5, respectivamente. En otras investigaciones se utilizó una dosis total media de FEC-Grh de 78  $\mu$ g/kg (25-210  $\mu$ g /kg), obteniéndose una media de 43.9 células CD34+/ $\mu$ l (1.1-130) (Gabús, *et al*, 2006).

Al agrupar a los pacientes con comportamiento similar frente a la estimulación realizada se identificaron dos grupos:

1. Respondedores Buenos: (n=11; 61,1%), con una edad promedio de 67,2 años y peso de 59,7 Kg. El conteo de CD34+ al 5 día de estimulación fue de 101,3 células/ $\mu$ l.
2. Respondedores Regulares (n=7; 38,9%), con una edad promedio de 67,6 años y peso de 68,1 Kg. El conteo de CD34+ al 5 día de estimulación fue de 21.23celulas/ $\mu$ l.

El grupo de buenos movilizados (n=11; 61,1%) movilizo con la dosis estándar preestablecida para la movilización que era de 8 a 16  $\mu$ g/kg/día de FEC-Grh, logrando altos recuentos de CD34+ al quinto día. El grupo de movilización regular (n=7; 38,9%), por el contrario, requiere dosis superiores de FEC-Grh. Como característica relevante en el grupo de movilizados regulares, se puede señalar el peso promedio que es mayor al del otro grupo (68,1 Kg). En otros estudios, se ha reportado que pacientes mayores de 50 años muestran una movilización dificultosa de 13.4 células/ $\mu$ l (Gabús, *et al*, 2006). Sin embargo, en esta investigación se logro una buena movilización de CPH al obtenerse un promedio de 63,05 células/ $\mu$ l al quinto día.

El número total de glóbulos blancos (WBC) se incremento tras la administración de FEC-Grh, como era de esperarse, debido a que las células granulocíticas (neutrófilos y basofilos) tienen los receptores específicos para el FEC-G, lo que produjo un aumento en su número. Resultando en valores previos a la estimulación de  $14,84 \pm 10,91$  % de WBC y  $31,35 \pm 13,41$  % post estimulación.

La dosis empleada normalmente para movilización es de 8–12  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ , la movilización realizada en este estudio fue efectiva solo para el grupo de pacientes clasificados como buenos respondedores, debido a que el peso se encontraba dentro del rango requerido para la movilización.

En cuanto a la tolerancia al tratamiento con Filgrastim (FEC-Grh), todos los pacientes pudieron completar el programa de movilización planificado. En muchas investigaciones realizadas se han reportado efectos adversos al FEC-Grh. Stroncek *et al* reporto que la administración de FEC-Grh en dosis de 2 a  $10\mu\text{g}/\text{Kg}$  por día en individuos sanos causa efectos adversos como fatiga (14%), nauseas y vomito (12%), dolor de cabeza (39%), dolor en los huesos (83%) y dolor de cuerpo (23%). En este estudio de los 16 pacientes que se encuestaron 25% presentaron efectos adversos, con mayor frecuencia disnea, nauseas y vomito.

## 10. CONCLUSIONES

El estudio sugiere que la movilización con dosis de 600µg/día de FEC-Grh permite obtener un número adecuado de progenitores, aún en aquellos casos con una marcada variación del peso como se comprobó con los dos grupos analizados.

La edad en este caso no se considero como una variable limitante para lograr una movilización adecuada.

Los pacientes no tenían en su historia clínica dosis de quimioterapia, la cual está reportado que puede modificar la respuesta del estímulo del FEC-Grh frente a la movilización de células CD34+.

De igual forma los efectos adversos presentados no fueron alterantes importantes en la fisiología y el estado de salud de los pacientes, por lo que sugerimos que usar las dosis suministradas en este estudio permitiría una adecuada movilización con efectos secundarios menores.

Los pacientes que se clasificaron dentro del grupo de movilizadores regulares presentaron pesos por encima de la media establecida, lo que permite pensar si un aumento en la concentración de FEC-Grh permitiría una mejor movilización o si existe algún otro factor no identificado en este estudio que impidió una adecuada movilización.

## **11. RECOMENDACIONES**

Para comprobar el efecto de la terapia celular en el tratamiento de los pacientes con Enfermedad Arterial Obstructiva Crónica (EAOC), sugerimos realizar un estudio para determinar la seguridad de la administración intramuscular de las células CD34+ movilizadas a sangre periférica y su capacidad de aumentar la revascularización de miembros inferiores en pacientes con EAOC.

## 12. BIBLIOGRAFIA

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. and Weissman I. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 404:193-7.

Arcenas, A.G. and Vadhan R. 1993. Hematopoietic growth factor therapy of myelodysplastic syndromes. *Leukemia and lymphoma*. Suppl 2 (2): 65.

Baer, M. R., Bernstein, S. H., Brunetto, V. L. 1996. Biological effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients with untreated acute myeloid leukemia. *Blood*. 87:1484-1494

Begley, C., Lopez, A., Nicola, N., Vadas, A., Sanderson, J. and Metcalf, D. 1986. Purified colony-stimulating factors enhance the survival of human neutrophils and eosinophils in vitro: a rapid and sensitive microassay for colony-stimulating factors. *Blood*. 68: 162-166.

Bishop, J. F. 1994. Platelet support and the use of cytokines. *Stem Cells*. 12:370-377

Cebon, J., Layton, J. E., Maher, D. and Morstyn, G. 1994. Endogenous haemopoietic growth factors in neutropenia and infection. *Br J Haematol*. 86:265-274.

Cherry B, *et al.* 1994. Production of hematopoietic stem cell chemotactic factor by bone marrow stromal cells. *Blood* 83(4):964.

Craddock, C., Nakamoto, B. and Papayannopoulou, T. 1995. The VLA<sub>4</sub>/CS-1 pathway does not actively participate in VLA<sub>4</sub> mediated hematopoietic progenitor trafficking in vivo. *Blood*. 86:975a

Cronkite, E. P., Burlington, H., Shimosaka, A., Bullis, J. E. and Pappas, N. 1993. Anemia induced in splenectomized mice by administration of rhG-CSF. *Exp hematol.* 21:319-325.

Demetri, G. D., Griffin, J. D. 1991. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood.* 78:2791-2802

Eastment, E., Ruscetti, F. W. 1981. Generation of erithropoyesis in long term bone marrow suspension cultures. *J Supramolec Struct Cell Biochem (Supl):*III.

Gabrilove, J. L. 1989. Introduction and overview of hematopoietic growth factors. *Sem Hemat.* 26 (suppl 2):1.

Gabús, R., Borelli, G., Citrín, E., Álvarez, R. y Bodega, E. 2006. Evaluación de la movilización de células progenitoras hematopoyéticas para trasplante autólogo en hemopatías malignas y tumores sólidos con Filgen JP (Filgrastim Clausen). *Biomedicina.* 2(3):206-213

Galli, M. C., Giardina, P. V., Migliaccio, A. R. and Migliaccio, G. 1993. The biology of stem cell factor involved in stem cell regulation. *Int J Clin Lab Res* 23:70.

Golde, D. W., Grasson, J. C. 1988. Hormones that stimulate the growth of blood cells. *Sci Am.* 259:62-71

Haas, M., Kerst, J. M., Schoot, C. E., Calafat, J., Hack, C. E., Nuijens, J. H., Roos, D., Oers, R. H. and Borne, A. 1994. Granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: analysis of the immediate activating effects on circulating neutrophils. *Blood,* 84:3885-3894.



Inazawa, J., Fukunaga, R., Seto, Y. 1991. Assignment of the human granulocyte colony-stimulating factor receptor gene (CSF3R) to chromosome 1 at region 35-p34.3. *genomics*. 10:1075-1078

Johnson, K. L. 1992. Basics of flow cytometry. *Clin.lab.sci*. 5:22.

Kanz, L., Brugger, W., Brass, K., and Mertelsmann, R. 1991. Combination of cytokines: current status and future prospects. *Br J Haematol*. 79 (Suppl 1):96.

Koichiro, M. and Krantz, S. B. 1993. Apoptosis of human erythroid colony-forming cells is decreased by stem cell factor and insulin-like growth factor as well as erythropoietin. *J Cell Phys*. 156:264.

Kojima, S., Matsuyama, T., Kodera, Y. 1996. Measurement of endogenous plasmagranulocyte-colony-stimulating factor in patients with acquired aplastic anemia by a sensitive chemiluminescent immunoassay. *Blood*. 87: 1303-1308.

Leavesley, D. I., Oliver, J.M., Swart, B. W., Berndt, M. C., Haylock, D. N. and Simmons, P.J. 1994. Signals from platelet/endothelial cell adhesion molecule enhance the adhesive activity of the very late antigen-4 integrin of human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J immunol*. 153:4673-4683.

Liu, F., Poursine-Laurent, J. and Link, D. C. 2000. Expression of G-CSF receptor on hematopoietic progenitor cells is not required for their mobilization by G-CSF. *Blood*. 95:3025-3031.

Lu, H. S., Clogston, C. L., Narhi, L. O., et al. 1992. Folding and oxidation of recombinant human granulocyte colony stimulating factor produced in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 267:8770-8777.

Mazanet, R., Griffin, J. D. 1992. Hematopoietic growth factors. In High-Dose Cancer Chemotherapy. J.O. Armitage and K. H. Animan, eds. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 289-313

Mckenzie, S. 2000. Hematología Clínica. 2da Edición. Editorial El Manual Moderno. México. Pg. 29-34, 799-801

Mcnicie, I. K., Zsebo, K. M. 1993. The role of stem cell factor in the hematiopoietic system. *Cancer Invest.* 11(6):724.

Metcalf, D. 1980. Clonal extinction of myelomonocytic leukemic cells by serum from mice injected with endotoxin. *Int J Cancer.* 25:225-233

Moehle, R., Haas, R. and Hunstein, W. 1993. Expression of adhesion molecules and c-kit on CD34+ hematopoietic progenitor cells: comparison of cytokine-mobilized blood stem cells with normal bone marrow and peripheral blood. *J Hematother* 2:483-489.

Molineux, G., Pojda, Z. and Dexter, T.M. 1990. A comparison of hematopoiesis in normal and splenectomized mice treated with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 75:563-569.

Moore, M. A., Muench, M. O., Warren, D. J. and Laver, J. 1990. Cytokine networks involved in the regulation of haemopoietic stem cell proliferation and differentiation. *Ciba Found Symp.* 148:43-58.

Morstym, G., Campbell, L., Souza, L. M., *et al.* 1998. Effect of granulocyte colony stimulating factor on neutropenia induceb by cytotoxic chemotherapy. *Lancet.* 1:667-672

Morstym, G., and Burgués, A. W. 1988. Hematopoietic growth factors: a review. *Cancer Res* 48: 5624.

Morstym, G., Dexter T. M. and Foote, M. 1998. Filgrastim (r-metHuG-CSF) in clinical practice. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. Pp. 1 – 25, 41-47, 265-273.

Nicola, N. A. 1990. Granulocyte colony-stimulating factor. *Immunol Ser.* 49:77–109.

Nicola, N. A. 1989. Hemopoietic cell growth factors and their receptors. *Annu Rev Biochem.* 58:45-77

Nicola, N. A., Metcalf, D., Matsumoto, M. and Johnson, G R. 1983. Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *J Biol Chem.* 258:9017-9023.

Ohsaka, A., Saionji, K., Sato, N., Mori, T., Ishimoto, K. and Inamatsu, T. 1993. Granulocyte colony-stimulating factor down-regulates the surface expression of the human leucocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils in vitro and in vivo. *British Journal of Haematology.* 84:574-580.

Ohsaka, A., Saionji, K., Sato, N. and Igari, J. 1994. Local anesthetic lidocaine inhibits the effect of granulocyte colony-stimulating factor on human neutrophil functions. *Experimental Haematology.* 22:460-466.

Pojda, Z., Molineux, G., and Dexter, T. M. 1990. Hematopoietic effects of short-term in vivo treatment of mice with various doses of rhG-CSF. *Exp Hematol.* 18:27-31.

Ramírez, M y Civin, C. 1997. Fisiología de la hematopoyesis. Hematología y Oncología Pediátricas de Madrid. Ergon. S.A. pg. 1-19.

Roilides, E., Walsh, T.J., Pizzo, P. and Rubin, M. 1991. Granulocyte colony-stimulating factor enhances the phagocytic and bactericidal activity of normal and defective human neutrophils. *Journaln of Infectious Diseases*. 163:579-583.

Russell, A. R., Davies, E. G., McGuigan, S., Scopes, G. J., Daly, S. and Gordon-Smith, E. C. 1994. Plasma granulocyte-colony stimulating factor concentrations (G-CSF) in the early neonatal period. *Br J Haematol* 86:642-644

Saito, S., Kasahara, T., Kato, Y., Ishihara, Y. and Ichijo, M. 1993. Elevation of amniotic fluid interleukin 6 (IL-6), IL-8 and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in term and preterm parturition. *Cytokine*. 5:81-88

Scarffe, J. H., Kamthan, A. 1990. Clinical studies of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). *Cancer surveys*. 9:115-130.

Seto, Y., Fukunaga, R., Nagata, S. 1992. Chromosomal gene organization of the human granulocyte colony- stimulating factor receptor. *J Immunol*. 148:259-266

Sherr, C. L. 1989. Regulation of mononuclear phagocyte proliferation by colony-stimulating factor-1. *Inter J Cell Clon* 8 (Suppl 1):46.

Slowman, S., Danielson, C., Graves, V. 1994. Administration of GM-/G-CSF prior to bone marrow harvest increases collection of CD34+ cells. *Prog Clin Biol Res* 389:363-369.

Smith, S. P. and Yee, G. C. 1992. Hematopoiesis. *Pharmacotherapy*. 12: 11.

- Smith, W.B., Gamble, J. R. and Vadas, M. A. 1994. The role of granulocyte macrophage and granulocyte colony-stimulating factors in neutrophil transendothelial migration: comparison with interleukin-8. *Experimental Haematology*. 22: 329-334.
- Somerville, L. E., Douglas, A. J., Irvine A. E. 1999. Discrimination of granulocyte colony-stimulating factor isoforms by highperformance capillary electrophoresis. *J Chromatogr B*. 732:81-89.
- Stroncek, D. F., Clay, M. E., Petzoldt, M. L. *et al.* 1996. Treatment of normal individuals with granulocyte-colony-stimulating factor: donor experiences and the effects on peripheral blood CD34+ cell counts and on the collection of peripheral blood stem cells. *Transfusion*. 36:601-610.
- Sutherland DR, Keating A. 1992. The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications. *J Hematother*. 1: 115-29.
- Weimann, E., Reisbach, G., Reinsberg, J., and Lentze, M. J. 1995. IL-6 and G-CSF levels in amniotic fluid during the second trimester in normal and abnormal pregnancies. *Arch Gynecol Obstet* 256:125-130.
- Welte, K., Platzer, E., Lu, L. 1985. Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82:1526-1530
- Xu, S., Hoèglund, M. and Venge, P. 1996. The effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on the degranulation of secondary granule proteins from human neutrophils in vivo may be indirect. *British Journal of Haematology*. 93:558-568.

Yong, K. L. 1996. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) increases neutrophil migration across vascular endothelium independent of an effect on adhesion: comparison with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *British Journal of Haematology*. 94:40-47.

Yuo, A., Kitagawa, S., Ohsaka, A., Ohta, M., Miyazono, K., Okabe, T., Urabe, A., Saito, M. and Takaku, F. 1989. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor as an activator of human granulocytes: potentiation of responses triggered by receptor-mediated agonists and stimulation of C3bi receptor expression and adherence. *Blood*. 74:2144-2149.

Zsebo, K. M., Cohen A. M., Murdock D. C., et al. 1986. Recombinant human granulocyte colony stimulating factor: molecular and biological characterization. *Immunobiol*. 172:175-184.

## **RECURSOS ELECTRONICOS**

Wognum, B. Hematopoietic Stem Cells. [**en línea**]. Stem cells. 2003. <[www.stemcelltechnologies.com](http://www.stemcelltechnologies.com)>. [Consulta: Junio 3 de 2008].

## ANEXOS

### Anexo 1

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

HOSPITAL MILITAR CENTRAL

**Paciente:**

**Paciente Número:**

---

#### INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE Y FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Título del estudio:**

**Patrocinador:** HOSPITAL MILITAR CENTRAL  
BANCO DE CELULAS STEM DE COLOMBIA

Dr. Gonzalo Pullas Tapia

**Investigadores:** Dr. Carlos Arturo Franco  
Dr. Francisco Arroyo Arboleda

#### *Introducción*

Por el presente lo invitamos a participar en un estudio de investigación. A los efectos de decidir si desea o no participar en este estudio, usted tiene derecho a saber cuál es el objetivo de este estudio, cómo se selecciona a los pacientes, qué procedimientos se emplearán, cuáles son los posibles beneficios y qué es lo que se espera de usted como participante de una investigación. Este proceso se denomina "*consentimiento informado*". El presente formulario de consentimiento le proporcionará información sobre esta investigación que su médico en el estudio le explicará. Se le solicitará que lea atentamente este formulario de consentimiento y que le pregunte al médico o personal del estudio todo aquello que no comprenda. Cuando haya comprendido la

información y haya decidido participar, se le solicitará que firme y feche este consentimiento y se le entregará una copia del mismo.

### ***Objetivo de la investigación***

A usted se lo está invitando a participar en este estudio por ser portador de Isquemia Crítica de los miembros inferiores que no tiene posibilidad de mejoría debido a que no posee vasos arteriales sanos en sus miembros. Uno de los objetivos de este estudio es lograr que usted mejore su circulación, mediante la aplicación de su propia sangre, que será trabajada en un laboratorio, por inyección en la arteria de su ingle o por inyección en los músculos de su pantorrilla. El segundo objetivo es probar que este procedimiento producirá nuevas arterias en sus piernas.

### **Duración del estudio**

Durante este estudio, el médico del estudio recabará información respecto del tratamiento de que se le aplique y su respuesta a esta medicación. Si bien la duración del estudio variará, su médico en el estudio recogerá información desde que su sangre sea inyectada, hasta 12 semanas después. Estos datos se recogerán de la información ya registrada en sus registros clínicos. Su participación en este estudio no afectará en modo alguno la forma en que su enfermedad está siendo tratada por su médico ni parte alguna de la atención médica que esté recibiendo.

### **Incorporación**

Alrededor de 20 pacientes con isquemia crítica de sus piernas, participarán en este estudio. A los efectos de ser elegido para participar en el estudio, debe confirmarse la siguiente información respecto del tratamiento:

- Deberá haberse realizado una arteriografía de sus piernas, por inyección de un líquido de contraste que permitirá ver, en rayos X, sus arterias.



## **Visitas del estudio**

### **Visita Basal**

Durante esta visita se le solicitará una muestra de aproximadamente 20 cucharaditas (~200 ml) de sangre. Su nombre no figurará en esta muestra recogida y dicha muestra sólo se empleará para las pruebas de laboratorio.

### **Información a ser recabada**

Si usted decidiera participar en este estudio, el médico del estudio reunirá la información mediante la historia clínica y la repetirá al final del estudio.

### **Nueva información**

Toda nueva información importante que surja durante el estudio que pudiera afectar su seguridad o su decisión de continuar participando le será informada a usted o a su representante legal por escrito. Se le solicitará que firme un nuevo formulario de consentimiento informado (modificado) para documentar que se le ha proporcionado esta nueva información y se le entregará una copia del mismo.

### **Posibles beneficios**

El estudio intenta lograr en usted mejorar su calidad de vida, mediante la mejoría de su circulación arterial lo cual se verá en la distancia que usted puede recorrer sin dolor, o en la cicatrización de sus úlceras o disminuyendo la longitud de amputación de sus miembros inferiores.

### **Posibles riesgos**

Los riesgos asociados con la extracción de sangre y aplicación del producto de su sangre, incluyen dolor, hematoma, sangrado, reacciones alérgicas u otras molestias en el sitio de la extracción. Rara vez, anemia, desmayo o infección en el sitio de la extracción. Se tomarán las precauciones necesarias para minimizar estas dificultades.

### **Remuneración por su participación en el estudio**

Usted no recibirá pago alguno por participar en este estudio.

### **Costos por su participación**

Toda atención médica requerida específicamente por este estudio será cubierta por el Hospital Militar Central de Bogotá.

### **Participación voluntaria / Retiro del estudio**

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. Usted puede negarse a seguir proporcionando información para este estudio en cualquier momento. Su decisión no afectará en modo alguno la disponibilidad o calidad de su actual o futuro tratamiento médico ni su participación en estudios de investigación a realizarse en el futuro en este centro.

El médico del estudio podrá dar por terminada su participación en el estudio en caso de considerarlo necesario para su bienestar. El Comité de Docencia Institucional/Comité Independiente Ética, también podrán suspender la recolección de datos para este estudio en cualquier momento, con o sin su consentimiento.

### **En caso de sufrir daños relacionados con la investigación**

Si durante su participación en este estudio usted sufriera algún daño como consecuencia directa de este estudio, el Hospital Militar Central se compromete a hacerse cargo de todos los gastos médicos razonablemente necesarios para su tratamiento, siempre que usted haya seguido correctamente las indicaciones del médico del estudio.

### **Acceso a los registros médicos y confidencialidad**

Todos los registros o datos que pudieran identificarlo serán protegidos con acceso estrictamente restringido a su archivo. Sólo sus iniciales y número de paciente lo identificarán a usted en toda la información manejada.

Los registros médicos que lo identifican a usted y el formulario de consentimiento firmado por usted, serán inspeccionados por las autoridades regulatorias y el Comité de Docencia Institucional/Comité Independiente de Ética. La confidencialidad de sus datos personales será protegida en la medida permitida por las leyes y disposiciones

vigentes. Es imposible garantizar la confidencialidad absoluta. Los resultados de este estudio de investigación podrán ser presentados en conferencias o publicaciones médicas pero en ningún caso se revelará su identidad.

### **A quién dirigirse para consultas**

Para aclarar dudas relacionadas con este estudio de investigación, sus derechos en calidad de participante de esta investigación, usted podrá comunicarse con:

-Dr. Gonzalo Pullas Tapia, Telf. 316 528 24 26

### **Consentimiento para pruebas adicionales de resistencia**

Consiento en permitir al Hospital Militar Central de Bogotá y al Banco de Células Stem de Colombia, el acceso a mis muestras de sangre previamente conservadas obtenidas para el análisis genotípico y fenotípico. Entiendo que el Hospital Militar Central podrá disponer de estas muestras para pruebas adicionales, sin costo alguno para mí.

Si \_\_\_\_\_ Iniciales del paciente \_\_\_\_\_

No \_\_\_\_\_ Iniciales del paciente \_\_\_\_\_

### **Consentimiento del paciente**

He leído las declaraciones y demás información detallada en este formulario de consentimiento. Todas mis preguntas concernientes al estudio me fueron contestadas. Entiendo que puedo rehusarme a participar en este estudio de investigación.

Autorizo el acceso a mis registros médicos al los médicos del Hospital Militar Central, autoridades regulatorias y al Comité de Docencia Institucional / Comité Independiente de Ética.

Entiendo que recibiré una copia de este formulario de consentimiento firmado y fechado.

Con la firma de este formulario no renuncio a ninguno de mis derechos legales como participante de un estudio de investigación.

Acepto participar en el “ESTUDIO DE ANGIOGENESIS TERAPEUTICA EN PACIENTES CON ISQUEMIA CRITICA DE MIEMBROS INFERIORES. ESTUDIO PILOTO” del Hospital Militar Central y Banco de Stem de Colombia

---

Firma del paciente	Nombre del paciente	Fecha
--------------------	---------------------	-------

(En letra de imprenta)

---

Firma de la madre/padre/tutor	Nombre de la madre/padre/tutor	Fecha
-------------------------------	--------------------------------	-------

(Si correspondiese)

## **Anexo 2**

### **HOSPITAL MILITAR CENTRAL SERVICIO DE CIRUGIA VASCULAR Y ANGIOLOGIA**

#### **PROTOCOLO**

#### **“ESTUDIO DE ANGIOGENESIS TERAPEUTICA EN PACIENTES CON ISQUEMIA CRITICA DE MIEMBROS INFERIORES. ESTUDIO PILOTO”**

#### **SERVICIO DE HEMATOLOGIA HMC BANCO DE CELULAS STEM DE COLOMBIA**

#### **CRITERIOS DE INCLUSION**

1. Claudicación intermitente. (Fontaine II o III)
2. Ulcera isquémicas no cicatrizadas.
3. Índice tobillo brazo menor a 0.4.
4. Edad entre 18 y 85 años.
5. Serología VIH, VHB, VHC y VDRL negativa.
6. En caso de mujer fértil, test de embarazo negativo.
7. Ausencia de lechos arteriales distales evidenciada por arteriografía.
8. Firma del consentimiento informado por escrito ante testigo.

#### **CRITERIOS DE EXCLUSION**

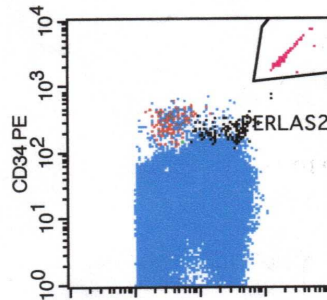
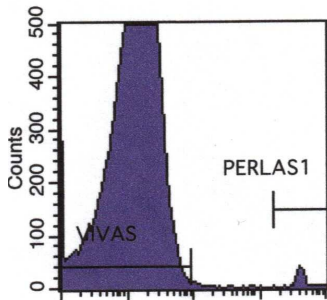
3. Retinopatía proliferativa
4. Enfermedades malignas
5. Antecedente de Infarto de miocardio o cerebral menor a tres meses.
6. Isquemia miocárdica no controlada.
7. Fallo cardíaco severo persistente (Fracción de eyección menor a 30%)
8. Enfermedades hematológicas.
9. Enfermedades infecciosas
10. Insuficiencia renal crónica.

11. Enfermedades con expectativa de vida menor a 1 año.
12. Tratamiento concomitante con prostaglandinas.
13. Tratamiento previo con medicamentos de terapia celular.
14. Estimulación medular eléctrica o simpatectomía concomitante.
15. No consentimiento informado.

### **CRITERIOS DE RETIRADA**

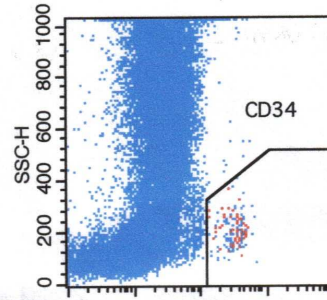
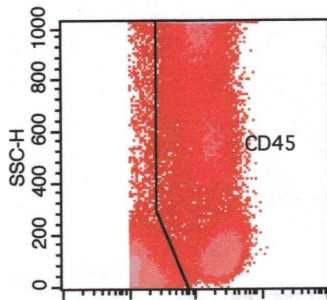
1. Presencia de acontecimiento adverso grave.
2. No obtención del mínimo número de CPCs para estudio ( $2 \times 10^9$ )
3. Condiciones clínicas del paciente que impidan su continuidad:
  - Necesidad de medicación concomitante excluyente del ensayo.
  - Necesidad de procedimiento excluyente del ensayo.
  - Paso a Clasificación Fontain IV (gangrena) durante el estudio.
  - Decisión facultativa.
  - Renuncia del enfermo a continuar el estudio.
  - Pérdida de seguimiento.

Anexo 3



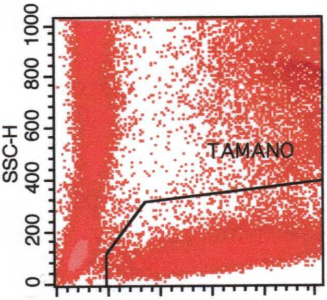
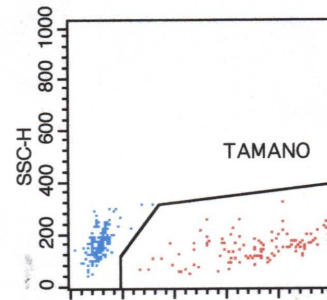
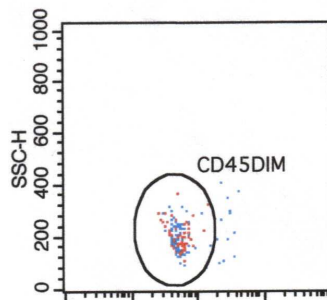
File: 041176.002  
 Sample ID:  
 Patient ID:  
 Acquisition Date: 31-Oct-07  
 Gate: No Gate  
 Gated Events: 142296  
 Total Events: 142296

Gate	Events
STEM CELLS VIVAS	138
STEM CELL MUERTAS	1
PERLAS	867
7AAD VIVAS	141261
CD45 VIVAS	99384
CD34 CD45 VIVAS	158
CD34 CD45DIM VIVAS	310



**STEMCELLS 164.19 VIVAS/UL**

**VIABILIDAD 99.28 %**



**Porcentaje CD34 de CD45 0.14 %**