

Efecto aditivo de las células madre mesenquimales y del defibrótido en un modelo de trombosis arterial en ratas

Additive effect of mesenchymal stem cells and defibrotide in an arterial rat thrombosis model

Prof. Asoc. Dra. Dilek Dilli^a, Dra. Emine Kılıç^{b,c}, Dr. Nihat Yumuşak^d,
Prof. Asoc. Dr. Serdar Beken^a, Prof. Dra. Duygu Uçkan Çetinkaya^e,
Prof. Asoc. Dr. Ramazan Karabulut^e y Prof. Asoc. Dra. Aysegül Zenciroğlu^a

- Departamento de Neonatología, Hospital Universitario y de Investigación Materno Infantil Dr. Sami Ulus, Angora, Turquía.
- Departamento de Ciencias Biológicas, Servicios de Formación y TI Hemosoft, Tecnópolis de la Hacettepe Üniversitesi, Angora, Turquía.
- Centro PEDI-STEM de Investigación y Desarrollo de Células Madre, Facultad de Medicina de Hacettepe Üniversitesi, Angora, Turquía.
- Departamento de Patología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria de Harran Üniversitesi, Sanliurfa, Turquía.
- Departamento de Cirugía Pediátrica, Facultad de Medicina de Gazi Üniversitesi, Angora, Turquía.

Correspondencia:
Dra. Dilek Dilli:
dilekdilli2@yahoo.com

Financiamiento:
Este proyecto recibió financiación del Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Turquía (TUBITAK), ARDEB/SBAG, n.º de proyecto: 3001/114S237-2014

Conflicto de intereses:
Ninguno que declarar.

Recibido: 23-9-2016
Aceptado: 29-11-2016

RESUMEN

Introducción. El objetivo de este estudio consistió en investigar el efecto aditivo de las células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) y del defibrótido (DFT) en un modelo de trombosis arterial femoral en ratas.

Métodos. Se incluyeron 30 ratas Sprague Dawley. Se desarrolló un modelo de trombosis arterial mediante cloruro de hierro (FeCl₃) en la arteria femoral izquierda. Las ratas se asignaron equitativamente en cinco grupos: grupo 1, intervención quirúrgica simulada (sin lesión arterial); grupo 2, inyección de solución salina tamponada con fosfato (PBS); grupo 3, MSC; grupo 4, DFT; grupo 5, MSC + DFT. Todas las ratas recibieron dos inyecciones intraperitoneales de 0,5 ml: la primera se administró 4 horas después del procedimiento y la segunda 48 horas después de la primera. Se sacrificó a las ratas siete días después de la segunda inyección.

Resultados. Aunque el uso por separado de MSC derivadas de médula ósea humana (hBM-MSC) o de DFT permitió una resolución parcial del trombo, la combinación de ambos tuvo como resultado la resolución casi completa. La neovascularización fue doblemente mejor en las ratas tratadas con hBM-MSC + DFT (11,6 ± 2,4 canales) en comparación con los grupos asignados por separado a hBM-MSC (3,8 ± 2,7 canales) y DFT (5,5 ± 1,8 canales) ($P < 0,0001$ y $P = 0,002$, respectivamente).

Conclusión. El uso combinado de hBM-MSC y DFT en un modelo de trombosis arterial en ratas mostró que el efecto aditivo tuvo como resultado la resolución casi completa del trombo.

Palabras clave: trombosis, célula madre mesenquimal, defibrótido, ratas.

<http://dx.doi.org/10.5546/aap.2017.249>

Texto completo en inglés:

<http://dx.doi.org/10.5546/aap.2017.eng.249>

Cómo citar: Dilli D, Kılıç E, Yumuşak N, et al. Efecto aditivo de las células madre mesenquimales y del defibrótido en un modelo de trombosis arterial en ratas. *Arch Argent Pediatr* 2017;115(3):249-256.

Abreviaturas:

- Anticuerpo del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 1: anti-VEGFR-1
- Anticuerpo del factor de von Willebrand: anti-VWF
- Cardiopatía congénita: CC
- Defibrótido: DFT
- Cloruro de hierro: FeCl₃
- Hematoxilina y eosina: H&E
- Derivado de médula ósea humana: hBM
- Células madre mesenquimales: MSC
- Solución salina tamponada con fosfato: PBS
- Prostaglandina I₂: PGI₂
- Tromboxano A₂: TXA₂

INTRODUCCIÓN

El cateterismo de la arteria umbilical para colocar en la aorta y en ocasiones la arteria femoral, ya sea como catéteres arteriales permanentes para la monitorización continua de la presión arterial y la obtención de muestras de sangre, o un catéter cardíaco para el diagnóstico y el tratamiento de niños con cardiopatías congénitas (CC), son procedimientos frecuentes en las unidades de cuidados intensivos neonatales. La inserción del catéter puede provocar lesiones endoteliales locales y la interrupción del flujo sanguíneo en la arteria femoral, lo que genera condiciones que favorecen la trombosis.¹⁻³ La trombosis arterial puede causar complicaciones agudas que revisten gravedad, como la necrosis cutánea y la isquemia de

órganos o extremidades que puede afectar su viabilidad. El tratamiento de la trombosis abarca desde el uso de agentes trombolíticos y anticoagulantes hasta la intervención quirúrgica. La resolución natural de un trombo se produce mediante un proceso organizado similar al de la cicatrización de las heridas.⁴ Se cree que la recanalización de la arteria se produce por medio de la coalescencia de estos canales vasculares. Influenciar estos procesos podría ayudar a optimizar la resolución del trombo.^{5,6}

Se demostraron los beneficios terapéuticos de las células madre mesenquimales (MSC) en los procesos de recanalización y neovascularización.⁷⁻⁹ Las MSC pueden diferenciarse en tipos distintivos de células maduras, como las que producen tejidos mesenquimales específicos, incluidos huesos, cartílagos, músculos, estroma de médula ósea, tendones y ligamentos, grasa, dermis y otros tejidos conjuntivos.^{7,10,11} Debido a estas propiedades excepcionales, las MSC podrían ser una opción para tratar diversas enfermedades en el futuro. Recientemente, algunos estudios sobre el uso potencial de las células madre en enfermedades pediátricas suscitaron el interés de los médicos clínicos.^{12,13} Tanto en estudios experimentales como en tratamientos clínicos de casos de isquemia de extremidades, se demostró que las MSC son capaces de diferenciarse en células maduras del endotelio vascular y participar en diversos procesos de reconstrucción vascular, así como en la producción de tejido vascular.^{7,9}

Se descubrió que el defibrótido (DFT), un polidesoxirribonucleótido, modula la función de las células endoteliales y tiene un efecto antitrombótico en arterias, venas y capilares.¹⁴ El DFT aumenta la producción de prostaglandina I₂ (PGI₂) y E₂ (PGE₂), al mismo tiempo que reduce la producción de tromboxano A₂ (TXA₂).¹⁵ Además, el DFT afecta directamente la migración y la formación de tubos de las células endoteliales, lo que depende de la actividad de mTOR-p70S6k.^{16,17} Asimismo, el DFT posee diferentes propiedades (profibrinolíticas, antitrombóticas, trombolíticas, antiisquémicas, antichoque y antiateroscleróticas) que se complementan con la actividad relacionada con la activación de anticuerpos anticélulas endoteliales.^{14,18-20} Por lo tanto, el presente estudio se diseñó para investigar el efecto aditivo de las MSC derivadas de médula ósea humana (hBM) y el DFT en un modelo experimental de trombosis arterial en ratas. Planteamos como hipótesis que este protocolo aumentaría la frecuencia de los precursores

endoteliales circulantes y estimularía la formación de vasos sanguíneos nuevos (neovascularización). Por lo tanto, optimizaría la resolución de trombos y sería el punto de partida de un plan terapéutico novedoso para la trombosis arterial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Los experimentos se llevaron a cabo en 30 ratas Sprague-Dawley macho adultas, con pesos que oscilaban entre los 250 g y los 350 g, y edades comprendidas entre las 8 y 9 semanas al momento del procedimiento. Se permitía a los animales beber agua y comer alimento para ratas de laboratorio estándar sin restricciones. Todos los procedimientos recibieron la aprobación del comité de ética de experimentación con animales del Consejo de Ética del Hospital de Formación e Investigación de Angora (Angora, Turquía).

Modelo de trombosis: trombosis inducida por cloruro de hierro (FeCl₃).

Se anestesió a las ratas con ketamina/xilacina. Se controló la temperatura corporal mediante una sonda rectal y se mantuvo en aproximadamente 37 °C con una almohadilla eléctrica durante todo el experimento. Se expuso la arteria femoral izquierda mediante una incisión oblicua en la ingle y se la separó del tejido adherente. Tras un período de estabilización, se indujo la trombosis mediante la aplicación tópica de un trozo (2 × 1 mm) de papel Whatman embebido en FeCl₃ al 20% en la arteria femoral expuesta, tal como se describió anteriormente.²¹ Se colocó un trozo pequeño de papel aluminio por debajo de la arteria antes de la aplicación tópica de FeCl₃ para que no entrara en contacto con el tejido adyacente ni con el nervio femoral. Se dejó anestesiados a los animales por 30 minutos para permitir la formación del trombo. A continuación, las ratas se recuperaron y se les permitió beber agua y comer normalmente, sin restricciones.

Diseño del estudio

En total, se distribuyeron 30 ratas equitativamente en cinco grupos del estudio; 4 grupos presentaban la lesión arterial: 1) el grupo simulado (sin lesión arterial) recibió 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS); 2) el grupo de PBS recibió 0,5 ml de PBS; 3) el grupo de hBM-MSC recibió 1×10⁶ de hBM-MSC suspendidas en 0,5 ml de PBS; 4) el grupo de DFT recibió DFT (0,5 ml, 40 mg/kg); y 5) el grupo de hBM-MSC + DFT recibió simultáneamente 1×10⁶ de hBM-MSC suspendidas en 0,5 ml de

PBS y DFT (0,5 ml, 40 mg/kg). Con excepción del grupo comparativo simulado, se sometió a las ratas al procedimiento de trombosis. Todas las ratas recibieron 2 inyecciones intraperitoneales de la solución correspondiente: la 1ª inyección se administró 4 horas después del procedimiento y la 2ª inyección, 48 horas después de la primera.

Aislamiento y cultivo de hBM-MSC

El Consejo de Revisión Institucional de Hacettepe Üniversitesi (Angora, Turquía) aprobó el aislamiento, la caracterización y el marcado de las hBM-MSC provenientes de donantes sanos para trasplantes de médula ósea, para su utilización en los modelos *in vivo*. Los niños sanos de quienes se extrajo médula ósea ya eran donantes para sus hermanos. En total, se extrajeron entre 200 ml y 400 ml (según el peso del receptor) de médula ósea para el receptor bajo anestesia general.

Se aislaron las hBM-MSC y se cultivaron en el laboratorio de células madre PEDI-STEM de Hacettepe Üniversitesi empleando muestras de médula ósea extraídas de un donante sano de 12 años para trasplante de médula ósea. Se obtuvo el consentimiento informado de los padres y se utilizaron 2 ml de médula ósea. Se llevaron a cabo ensayos de diferenciación y se determinaron los perfiles inmunofenotípicos para caracterizar las hBM-MSC^{22, 23} (Figura 1. A-B).

Marcado de hBM-MSC con partículas de óxido de hierro. Se permitió la proliferación de las hBM-MSC hasta alcanzar una confluencia de entre el 80% y el 90%, antes de cambiar de medio. Se realizó el marcado magnético de las células con óxido de hierro (Endorem, Guerbet, Villepinte, Francia) y se formaron complejos con poli-L-lisina

(Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO), tal como se describió anteriormente²⁴ (Figura 1C).

Inmunofenotipo de las hBM-MSC comparativas y de las hBM-MSC marcadas con hierro. Se realizó la caracterización inmunofenotípica de las hBM-MSC expandidas en cultivo comparativas y marcadas (50 µg/ml de hierro y 0,375 g/ml de poli-L-lisina durante 48 h) mediante citometría de flujo (Becton Dickinson FACS Aria, BD Biosciences, Sparks, MD).²²

Extracción de tejidos

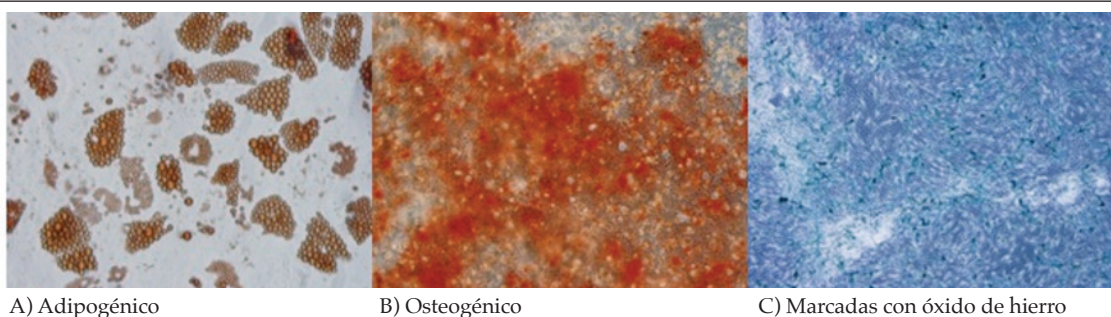
Se sacrificó a las ratas siete días después de la 2ª inyección, tras anestesarlas con ketamina/xilacina. Se abrió la ingle izquierda y se disecó la arteria femoral. Se extrajeron muestras de arterias para realizar una evaluación histopatológica e inmunohistoquímica. Se extrajeron muestras de vasos lesionados del grupo de hBM-MSC + DFT y muestras de vasos, corazón, hígado y pulmón del grupo de hBM-MSC a fin de visualizar las hBM-MSC marcadas con hierro que migraron a distintos órganos.

Evaluación histopatológica

Medición de la neovascularización

Las muestras de arterias femorales que contenían trombos se fijaron en paraformaldehído al 4% durante la noche y se incrustaron en parafina. Se realizaron cortes transversales (5 µm de espesor) a intervalos de 150 µm en toda la longitud de la muestra y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Los cortes de tejidos se evaluaron con aumentos de 20x, 40x, 60x y 100x y se digitalizaron con una cámara montada en un microscopio (cámara Olympus DP 73, microscopio Olympus BX53-DIC, Tokio, Japón).

FIGURA 1. (A) Diferenciación de hBM-MSC en el linaje adipogénico, teñidas con Oil Red O. (B) Diferenciación de hBM-MSC en el linaje osteogénico, teñidas con Alizarin Red S. (C) Marcado de hBM-MSC con partículas de óxido de hierro (50 µg/ml de Endorem Prussian). Micrográficos de contraste de fases en A-C (500x)



A) Adipogénico

B) Osteogénico

C) Marcadas con óxido de hierro

Los canales de recanalización se identificaron como espacios, revestidos de células planas similares a las endoteliales, hallados entre el trombo en proceso de resolución y la pared arterial, y dentro del cuerpo principal del trombo. La neovascularización se midió contando la cantidad de canales vasculares dentro del trombo y alrededor de este (es decir, canales que contienen eritrocitos) en cinco campos para obtener la cantidad promedio de canales vasculares por campo observado (cada 100x).

Todas las imágenes se analizaron en forma ciega. Se comparó la neovascularización entre los animales tratados de los grupos 3, 4 y 5.

Análisis inmunohistoquímicos

Se realizaron cinco cortes de cada rata a intervalos de 150 μ y se procesaron para la inmunotinción con cada anticuerpo. Para los análisis inmunohistoquímicos, se extrajeron células adherentes y se incubaron con los siguientes anticuerpos: anticuerpo del factor de von Willebrand (anti-VWF) (1:200, 36B11, Leica Biosystems, Newcastle, Reino Unido), anticuerpo del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 1 (anti-VEGFR-1, 1:100, ab32152, Abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-CD₆₈ (1:100, 514H12, Leica Biosystems, Newcastle, Reino Unido), anti-CD₃₄ (1:100, QBEnd/10, Leica Biosystems, Newcastle, Reino Unido) y anti-CD₁₃₃ (1:100, 18470-1-AP, Prointech Group, Rosemont, IL 60018, EE. UU.). Los anticuerpos anti-VWF y anti-VEGFR-1 se utilizaron para definir las células endoteliales que migraron alrededor del vaso lesionado y del trombo, mientras que los anticuerpos anti-CD₆₈, anti-CD₃₄ y anti-CD₁₃₃ se utilizaron para mostrar la migración de células progenitoras al área lesionada para la formación

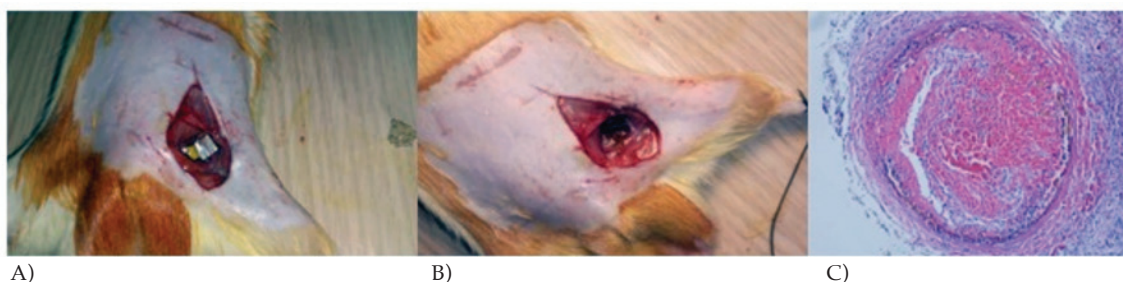
de capilares nuevos.

Se contó la cantidad de células con anticuerpos positivos por campo en cada corte en cinco campos con un aumento de 100x para VWF, CD34, CD68 y CD133, y de 40x para VEGFR-1. Todos los recuentos se realizaron a ciegas y se obtuvieron cantidades promedio de células con anticuerpos positivos por campo de visión (cámara Olympus DP 73, microscopio Olympus BX53-DIC, Tokio, Japón).

Detección de hBM-MSC marcadas con hierro en los tejidos. Las hBM-MSC marcadas con hierro se identificaron con tinte Prussian Blue para distinguir las células humanas inyectadas de las células del huésped. Una vez completados todos los procedimientos, los cortes teñidos se examinaron con un microscopio óptico. El óxido de hierro reactivo en las hBM-MSC se visualizó de color azul.

Examen inmunohistoquímico de las hBM-MSC en los tejidos. Los cortes de 5 μ m de espesor se procesaron con portaobjetos tratados con polilisina. Para el examen inmunohistoquímico, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3%. Los epítomos se estabilizaron con una solución bloqueadora sérica (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los cortes se incubaron con β -2 microglobulina (B2M-02, ab27588, Abcam, Cambridge, Reino Unido) para detectar las células de origen humano. A continuación, los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina de Mayer como contraste y se examinaron con una cámara montada en un microscopio (cámara Olympus DP 73, microscopio Olympus BX53-DIC, Tokio, Japón). Las hBM-MSC con β -2 microglobulina positiva estaban rodeadas de membranas celulares teñidas de color marrón.

FIGURA 2. Sitio de la lesión por FeCl₃ y trombo en desarrollo. (A) Aplicación de FeCl₃ a la arteria femoral izquierda. (B) Sitio decolorado de la lesión por FeCl₃ 30 minutos después de la lesión. (C) Trombosis ocluyente con trombos manifiestos y disminución del diámetro vascular en el grupo de PBS (H&E, 20x)



Análisis estadístico

Se utilizó el paquete SPSS (v15.0; SPSS, Inc., Chicago, IL) para el análisis estadístico. Se empleó la media \pm desviación estándar para mostrar la estadística descriptiva. Se realizaron comparaciones grupales de variables independientes mediante la prueba *t* en muestras independientes para dos grupos y el análisis de la varianza (ANOVA) unidireccional para tres grupos. Se utilizó la prueba κ^2 para analizar las variables categóricas. Se aplicó la prueba de Friedman para las comparaciones de variables dependientes entre grupos. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo en términos estadísticos. Se llevó a cabo un análisis de potencia. Si se usaron una magnitud del efecto de 0,60 y un alfa de 0,05 para obtener una potencia del 80%, seis animales se consideraron adecuados para cada grupo.

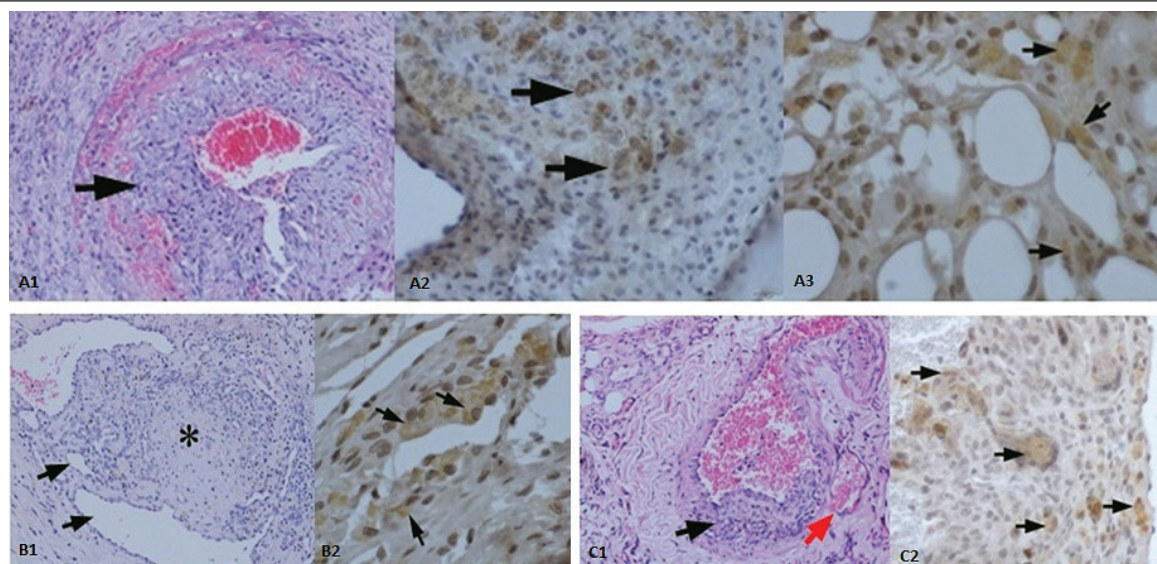
RESULTADOS

Estudio de los animales. Al final del estudio quedaban 29 ratas vivas. Una del grupo de PBS murió debido a necrosis de la extremidad. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la supervivencia entre los cinco grupos ($P = 0,38$).

Las ratas del grupo de la intervención simulada no se sometieron al procedimiento de trombosis. La arteria femoral era de color rosado normal. En los otros grupos, la aplicación durante 30 minutos de FeCl_3 para inducir la lesión causó una decoloración inmediata en el punto de contacto con la arteria femoral (Figura 2A-B). Se mantuvo a las ratas en el mismo estabulario, en condiciones óptimas. A manera de seguimiento, se observó que las ratas del grupo de intervención simulada no presentaron decoloración de la piel en el área de disección ni renguera. La decoloración de la piel hacia un tono gris azulado y la renguera aumentaron gradualmente en el grupo de PBS. Se observaron decoloración de la piel y renguera moderadas en los grupos de hBM-MSc y DFT. Las ratas del grupo de hBM-MSc + DFT no presentaron síntomas o solo presentaron síntomas leves. Se sacrificó a todas las ratas siete días después del procedimiento.

No se produjo trombosis en las ratas sometidas a la intervención simulada. En el grupo de PBS, se observaron trombosis ocluyente con trombos manifiestos y disminución del diámetro

FIGURA 3. (A1) Resolución parcial de los trombos, formación de canales nuevos alrededor de la pared vascular y adyacentes al área del lumen en el grupo de hBM-MSc (flecha) (H&E; 20x). (A2) Células con CD68+ alrededor de los trombos (la flecha muestra las células con CD68+) (40x). (A3) Tinción de VEGFR-1+, formación de vasos nuevos alrededor de los trombos (la flecha muestra células con VEGFR-1+) (60x). (B1) Resolución parcial de los trombos (estrella), adelgazamiento de la túnica íntima, formación de canales nuevos alrededor de la pared vascular y adyacentes al área del lumen en el grupo de DFT (flecha) (H&E; 20x). (B2) Tinción de VEGFR-1+, formación de vasos nuevos alrededor de los trombos (las flechas muestran las células con VEGFR-1+) (40x). (C1) En el grupo de hBM-MSc + DFT, resolución casi completa de los trombos (flecha izquierda) y formación de capilares nuevos (flecha derecha) (H&E; 20x). (C2) Células con VWF+ alrededor de la pared vascular (las flechas muestran las células con VWF+) (40x)



vascular. No se observó recanalización ni neovascularización con patrón de inmunotinción negativo (Figura 2C).

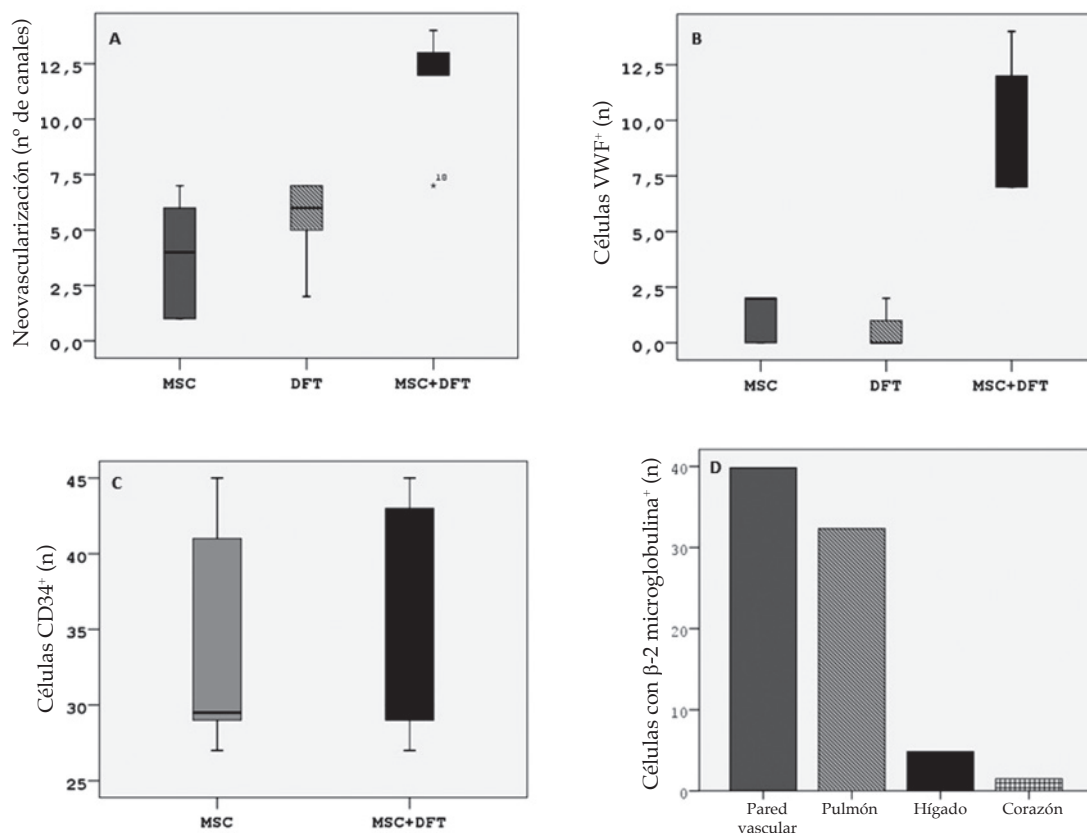
En el grupo 3, solo se administraron las hBM-
MSC después del procedimiento. Se observaron
la resolución parcial de los trombos, la formación
de canales nuevos alrededor de la pared vascular
y adyacentes al área del lumen con un patrón de
inmunotinción positivo por parte de todos los
anticuerpos (Figura 3A1-A3). El grupo 4 recibió
únicamente DFT después del procedimiento.
La investigación histopatológica de las paredes
vasculares mostró la resolución parcial de los
trombos. Se detectó la formación de canales
nuevos alrededor de la pared vascular y
adyacentes al área del lumen. Había células con
VWF⁺, VEGFR-1⁺ y CD68⁺ alrededor del trombo.
La inmunotinción con CD34 y CD133 resultó
negativa (Figura 3B1-B2). Las ratas del grupo 5
recibieron hBM-MSC y DFT simultáneamente. La

investigación histopatológica mostró la resolución
casi completa de los trombos y la formación
de canales vasculares nuevos (Figura 3C1). Se
observó un patrón de inmunotinción positivo con
todos los anticuerpos. La Figura 3C2 muestra las
células con VWF⁺ alrededor de la pared vascular.
Aunque el uso por separado de MSC o DFT
permitió una resolución parcial del trombo, la
combinación de ambos tuvo como resultado la
resolución casi completa.

La neovascularización fue doblemente mayor
en las ratas tratadas con hBM-MSC + DFT
($11,6 \pm 2,4$ canales) en comparación con las ratas
de los grupos asignados por separado a hBM-
MSC ($3,8 \pm 2,7$ canales) y DFT ($5,5 \pm 1,87$ canales)
($P < 0,0001$ y $P = 0,002$, respectivamente). No se
observó ninguna diferencia entre los grupos de
hBM-MSC y DFT ($P = 0,46$) (Figura 4A).

La inmunotinción con VWF y VEGFR-1 reveló
un patrón idéntico en los grupos de hBM-MSC y

FIGURA 4. (A) Neovascularización (canales por campo, 100x) siete días después del procedimiento en los grupos de ratas tratadas. (B) Cantidad de células con VWF⁺ (por campo, 100x). (C) Cantidad de células con CD34⁺ (por campo, 100x) en los grupos tratados con MSC. (D) El diagrama de barras muestra la mayor migración de hBM-MSC hacia la pared vascular lesionada y la menor hacia el tejido cardíaco (cantidad de células con β -2 microglobulina⁺ por campo, 100x).



MSC: células madres mesenquimales.
DFT: Defibrótido.

DFT. La cantidad de células con VWF⁺ por campo (100x) fue de $1,3 \pm 1,0$ en el grupo de HBM-MSC y de $0,5 \pm 0,8$ en el grupo de DFT ($P=0,73$) (Figura 4B). La cantidad de células con VEGFR-1⁺ por campo (40x) fue de $9,5 \pm 10,2$ en el grupo de hBM-MSC y de $3,8 \pm 4,2$ en el grupo de DFT ($P=0,39$). Sin embargo, en el grupo de hBM-MSC + DFT, la cantidad de células con VWF⁺ ($9,1 \pm 3,0$) y con VEGFR-1⁺ ($25,5 \pm 6,2$) por campo (40x) fue significativamente mayor en comparación con los grupos de hBM-MSC y DFT ($P \leq 0,005$ en todas las comparaciones).

Tal como se esperaba, no se observaron células con CD34⁺ y CD133⁺ en el grupo de DFT. Ambos anticuerpos mostraron un patrón de tinción similar en los grupos tratados con hBM-MSC ($P=0,91$; $P=0,42$). La Figura 4C muestra la tinción con CD34⁺ en los grupos tratados con hBM-MSC. Tampoco se observó ninguna diferencia en términos de la cantidad de células con CD68⁺ por campo (100x) entre los grupos de hBM-MSC ($28,8 \pm 1,8$) y hBM-MSC + DFT ($33,6 \pm 6,9$) ($P=0,16$). Se halló una pequeña cantidad de células con CD68⁺ en el grupo de DFT ($1,8 \pm 0,83$), que fue el recuento más bajo en comparación con los grupos tratados con hBM-MSC ($P < 0,001$).

La cantidad de hBM-MSC marcadas con hierro que migraron a la pared vascular lesionada fue similar en los grupos tratados con hBM-MSC. La cantidad de células por campo (100x) fue de $39,8 \pm 8,8$ en el grupo de hBM-MSC y de $41,6 \pm 6,8$ en el grupo de hBM-MSC + DFT ($P=0,69$).

La migración de hBM-MSC fue la mayor hacia la pared vascular lesionada y la menor hacia el tejido cardíaco en el grupo 3 ($P=0,001$). La cantidad de hBM-MSC con β -2 microglobulina⁺ por campo (100x) fue de $39,8 \pm 8,8$ en la pared vascular, de $32,3 \pm 4,3$ en tejido pulmonar, de $4,8 \pm 2,0$ en tejido hepático y de $1,5 \pm 1,9$ en tejido cardíaco ($P=0,001$) (Figura 4D).

DISCUSIÓN

La organización y la recanalización de los trombos son procesos dinámicos y complejos que están influenciados por factores microambientales, como citocinas, fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y leucocitos.^{4,25} En los últimos años, se descubrió que las células progenitoras endoteliales (EPC) tienen una función importante en el proceso trombótico. Xiao-qiang et al.²⁶ investigaron los efectos de las EPC derivadas de médula ósea trasplantada en el microambiente venoso en un modelo de trombosis venosa crónica en ratas. Observaron que los marcadores de

superficie de las células endoteliales, como CD34, VEGF-2 y VWF, eran detectables, y que las células proliferaban gradualmente hasta que comenzaban a diferenciarse en células endoteliales maduras. En el presente modelo de trombosis en ratas, descubrimos que los patrones de inmunotinción de VWF y VEGFR-1 eran similares en los grupos de hBM-MSC y DFT, pero significativamente más potentes en el grupo de hBM-MSC + DFT. Se observó la formación optimizada de capilares nuevos cuando se utilizó una combinación de MSC y DFT.

Recientemente, Guerin et al.,⁹ aislaron células madre similares a las embrionarias de pacientes con isquemia crítica de extremidades y estudiaron su potencial para diferenciarse en linajes vasculares en un modelo en ratones. Los autores informaron que las células madre eran una nueva y potencial fuente de células terapéuticas que podrían dar origen a células del linaje endotelial en seres humanos.⁹

El DFT es capaz de modular la función de las células endoteliales y tiene un efecto antitrombótico en arterias, venas y capilares.¹⁴ Se demostró que el DFT afecta directamente la migración y la formación de tubos de las células endoteliales.¹⁶ Las diferentes propiedades del DFT (profibrinolíticas, antitrombóticas, trombolíticas, antiisquémicas [corazón, hígado, riñón], antichoque y antiateroscleróticas) confirmaron su actividad relacionada con la activación de anticuerpos anticélulas endoteliales.¹⁵ El DFT resultó útil especialmente en condiciones isquémicas y microtrombóticas, y en trastornos vasculares.^{27,28}

En este caso, utilizamos hBM-MSC solas y junto con DFT para activar la formación de canales vasculares nuevos en vasos trombosados. Aunque el uso por separado de MSC o DFT permitió una resolución parcial del trombo, la combinación de ambos tuvo como resultado la resolución casi completa. También demostramos que la migración de hBM-MSC fue la mayor hacia la pared vascular lesionada y la menor hacia el tejido cardíaco. Nuestras observaciones sugieren que el trasplante de MSC puede cambiar el microambiente trombótico y proporcionar un mecanismo molecular para la resolución y neovascularización de los trombos.

Como limitación del estudio, si bien nuestro objetivo era llevar a cabo un ensayo sobre el tratamiento de la trombosis arterial femoral en sujetos recién nacidos, los experimentos se realizaron en ratas Sprague-Dawley macho adultas debido al calibre pequeño de las arterias femorales en ratas recién nacidas. Por lo tanto,

esto puede ocultar la aplicación de los resultados en una población pediátrica. No obstante, este estudio puede servir de inspiración para investigaciones posteriores.

CONCLUSIÓN

Según sabemos, este es el primer intento de combinar MSC y DFT para optimizar la resolución de trombos al estimular la neovascularización. Esta aumentó significativamente al emplear el tratamiento combinado de DFT y hBM-MS, pero aún resta obtener información clara sobre los mecanismos moleculares y celulares que regulan este proceso. ■

REFERENCIAS

- Kuhle S, Male C, Mitchell L. Developmental hemostasis: pro- and anticoagulant systems during childhood. *Semin Thromb Hemost* 2003;29(4):329-38.
- Brotschi B, Hug MI, Latal B, Neuhaus D, et al. Incidence and predictors of indwelling arterial catheter-related thrombosis in children. *J Thromb Haemost* 2011;9(6):1157-62.
- Dumond AA, da Cruz E, Almodovar MC, Friesen RH. Femoral artery catheterization in neonates and infants. *Pediatr Crit Care Med* 2012;13(1):39-41.
- McGuinness CL, Humphries J, Waltham M, Burnand KG, et al. Recruitment of labelled monocytes by experimental venous thrombi. *Thromb Haemost* 2001;85(6):1018-24.
- Waltham M, Burnand KG, Collins M, Smith A. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor are found in resolving venous thrombi. *J Vasc Surg* 2000;32(5):988-96.
- Waltham M, Burnand K, Fenske C, Modarai B, et al. Vascular endothelial growth factor naked DNA gene transfer enhances thrombus recanalization and resolution. *J Vasc Surg* 2005;42(6):1183-9.
- Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 2007;213(2):341-7.
- Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: Engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002;73(6):1919-26.
- Guerin CL, Loyer X, Vilar J, Cras A, et al. Bone-marrow-derived very small embryonic-like stem cells in patients with critical leg ischaemia: evidence of vasculogenic potential. *Thromb Haemost* 2015;113(5):1084-94.
- Gnecchi M, Melo LG. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. *Methods Mol Biol* 2009;482:281-94.
- Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 1996;166(3):585-92.
- Pillekamp F, Reppel M, Brockmeier K, Hescheler J. Stem cells and their potential relevance to pediatric cardiology. *Cardiol Young* 2006;16(2):117-24.
- Tayman C, Uckan D, Kilic E, Ulus AT, et al. Mesenchymal stem cell therapy in necrotizing enterocolitis: a rat study. *Pediatr Res* 2011;70(5):489-94.
- Niada R, Mantovani M, Prino G, Pescador R, et al. PGI₂-generation and antithrombotic activity of orally administered DFT. *Pharmacol Res Comm* 1982;14(10):949-57.
- Pescador R, Capuzzi L, Mantovani M, Fulgenzi A, et al. Defibrotide: properties and clinical use of an old/new drug. *Vascul Pharmacol* 2013;59(1-2):1-10.
- Koehl GE, Geissler EK, Iacobelli M, Frei C, et al. Defibrotide: an endothelium protecting and stabilizing drug, has an anti-angiogenic potential in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 2007;6(5):686-90.
- Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* 2010;328(5976):321-6.
- Grodzinska L, Konig E, Schror K. DFT is equipotent to urokinase in stimulating arterial and venous thrombolysis. *Pharmacol Res Comm* 1987;19:609-15.
- Paul W, Gresele P, Momi S, Bianchi G, et al. The effect of defibrotide on thromboembolism in the pulmonary vasculature of mice and rabbits and in the cerebral vasculature of rabbits. *Br J Pharmacol* 1993;110(4):1565-71.
- Tettamanti R, Bianchi G, Vitte PA, Kato G, et al. A novel insight into the mechanism of the antithrombotic action of DFT. *LIFE Sci* 1992;51(19):1545-55.
- Surin WR, Prakash P, Barthwal MK, Dikshit M. Optimization of ferric chloride induced thrombosis model in rats: effect of anti-platelet and anti-coagulant drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010;61(3):287-91.
- Uckan D, Kilic E, Sharafi P, Kazik M, et al. Adipocyte differentiation defect in mesenchymal stromal cells of patients with malignant infantile osteopetrosis. *Cytotherapy* 2009;11(4):392-402.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slapper-Cortenbach I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7.
- Amsalem Y, Mardor Y, Feinberg MS, Landa N, et al. Iron-oxide labeling and outcome of transplanted mesenchymal stem cells in the infarcted myocardium. *Circulation* 2007;116(11 Suppl):I38-45.
- Modarai B, Burnand KG, Humphries J, Waltham M, et al. The role of neovascularisation in the resolution of venous thrombus. *Thromb Haemost* 2005;93(5):801-9.
- Li XQ, Meng QY, Wu HR. Effects of bone marrow-derived endothelial progenitor cell transplantation on vein microenvironment in a rat model of chronic thrombosis. *Chin Med J (Engl)* 2007;120(24):2245-9.
- Coccheri S, Biagi G. Defibrotide. *Cardiovasc Drug Rev* 1991;9(2):172-96.
- Palmer KJ, Goa KL. Defibrotide. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in vascular disorders. *Drugs* 1993;45(2):259-94.