

Obtención y procesamiento de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica para terapia celular en enfermedades angiológicas

Obtaining and processing of peripheral blood hematopoietic progenitor cells for cell therapy of angiological diseases

Lic. Ana Iris González Iglesias,^I MSc. Mariela Forrellat Barrios,^I Lic. Tania González Suárez,^I Lic. Odalis Salgado Arozena,^I Dra. Norma D. Fernández Delgado,^I Prof. Dr. C. Porfirio Hernández Ramírez,^I Lic. María de los A. Matamoros Martínez de Pinillos,^I Dra. Rosa M. Lam Díaz,^I Lic. Berta B. Socarrás Ferrer,^I Téc. Yakima Hernández Rego^I

^I Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Se evaluó la seguridad y efectividad de un método manual de recolección de células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica movilizadas con factores estimuladores de colonias granulocíticas (FEC-G) de producción nacional (Leukocim y Hebevital). Se estudiaron 250 pacientes seleccionados para terapia celular en el Servicio de Angiología del Hospital General Docente "Enrique Cabrera". La obtención y separación de las células mononucleares autólogas de sangre periférica (CMN-SP) se realizó mediante el método diseñado en el Instituto de Hematología e Inmunología. Para valorar la eficacia del método se analizaron en el concentrado obtenido las variables: contenido de células nucleadas, de células mononucleadas y de células CD 34+. Además, se determinó la viabilidad celular y la contaminación microbiológica. Se comprobó la eficiencia y seguridad del método de recolección y procesamiento para la obtención de un concentrado con un contenido de células mononucleares adecuado, sin complicaciones de importancia clínica. Se demostró la eficacia de los factores estimuladores de colonias granulocíticas empleados. Los efectos adversos de la movilización resultaron ligeros e independientes del factor estimulador utilizado.

Palabras clave: medicina regenerativa, células madre, factor estimulador de colonias granulocíticas, células mononucleares.

ABSTRACT

The safety and effectiveness of a manual collection method of peripheral blood hematopoietic progenitor cells mobilized by the Cuban-made granulocytic colony-stimulating factors (Leukocim and Hebevital) were evaluated. Two hundred patients, who had been selected for the cell therapy at the Angiology Service of "Enrique Cabrera" General Teaching Hospital, were studied. The method designed by the Institute of Hematology and Immunology served to obtain and separate autologous mononuclear cells from the peripheral blood. For the purpose of assessing the efficacy of this method, the variables contents of nucleate cells, of mononucleate cells and of CD 34+ cells were analyzed in the final concentrate. Additionally, the cell viability and the microbiological pollution were determined. The efficiency and safety of the collecting and processing method for obtaining one concentrate with adequate content of mononuclear cells and no significant clinical complications was confirmed. The efficacy of the Cuban granulocytic colony-stimulating factors was proved. The adverse effects of the mobilization were mild and unrelated to the used stimulating factor.

Key words: regenerative medicine, stem cells, granulocytic colony-stimulating factors, mononuclear cells.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la medicina regenerativa se ha establecido como una alternativa para la reparación de tejidos y órganos afectados por distintas enfermedades. En este campo se han producido avances muy vinculados con los nuevos conocimientos sobre la biología y las potencialidades de las células madre (CM), embrionarias o adultas, y su capacidad de convertirse en células de diferentes tejidos. En sentido general, esta rama médica se sustenta en mecanismos usados por el organismo para reemplazar las células dañadas por células sanas, en determinados tejidos.¹⁻³

Las fuentes de las cuales se han aislado CM son diversas e incluyen: médula ósea, sangre periférica, sangre de cordón umbilical, cerebro, médula espinal, tejido adiposo, pulpa dentaria, vasos sanguíneos, hígado, músculo esquelético, piel, tejido conjuntivo, córnea, retina, conductos pancreáticos, tejido gastrointestinal y pulmón.⁴⁻⁶

La fuente de CM más estudiada ha sido la médula ósea donde se han identificado diferentes tipos celulares. En la sangre periférica (SP) se han encontrado poblaciones celulares similares, aunque en menor concentración, lo que, unido a la experiencia acumulada durante 50 años en la obtención y el procesamiento de progenitores hematopoyéticos, han determinado que estas sean las fuentes más utilizadas para la obtención de CM.⁷

Hoy día es cada vez más frecuente el uso de CM recolectadas de SP, aun cuando en esta fuente las CM existen en bajas concentraciones y, supuestamente, las probabilidades de lograr una recolección adecuada son escasas. Esta situación se soluciona con el empleo del factor estimulador de colonias granulocíticas (FEC-G) como agente movilizador, que desencadena una serie de eventos que culminan con la liberación y migración de las CM desde los nichos de la médula ósea hacia la circulación. Una vez que se alcanzan los niveles óptimos de movilización, las células son recolectadas, de modo habitual con un separador celular o máquina de aféresis. Este proceder garantiza un producto parcialmente procesado con elevada pureza y alta concentración de CM, porque los eritrocitos y el plasma son retirados durante el procesamiento; sin embargo, el uso de este equipo limita su empleo por su alto costo.⁸⁻¹¹

En el Instituto de Hematología e Inmunología (IHI) se estandarizó un método de obtención y procesamiento de sangre periférica, en el cual se vinculan elementos de movilización de progenitores hematopoyéticos con FEC-G, autodonación de sangre y procesamiento manual. Con este método se pueden obtener niveles adecuados de células mononucleares (CMN), entre las que están las CM CD 34+, marcador inmunológico que identifica las CM hematopoyéticas. Este proceder es de fácil realización y más económico, lo cual permite extender su empleo a otras regiones del país.⁶ En este trabajo se evaluó la seguridad y la efectividad de esta técnica en la recolección de células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica, para su aplicación terapéutica en enfermedades angiológicas.

MÉTODOS

En el estudio se incluyeron 250 pacientes seleccionados para terapia celular por el Servicio de Angiología del Hospital General Docente "Enrique Cabrera", desde octubre de 2007 hasta diciembre de 2009, 105 mujeres y 145 hombres, con una edad promedio de 62,8 años.

Todos los enfermos cumplían los criterios de inclusión establecidos en los protocolos de investigación. Sus parámetros cardiovasculares y respiratorios se encontraban normales y ellos firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio. La cifra de hemoglobina siempre fue mayor que 100 g/L y las determinaciones de glicemia, creatinina y transaminasas resultaron normales.

Se excluyeron los casos con enfermedades malignas activas, con enfermedades crónicas (insuficiencia cardíaca, renal, hepática y diabetes mellitus) descompensadas y aquellos con evidencia de infección que contraindicara alguna de las etapas requeridas para la obtención e implante de las células madre.

Movilización

La movilización de CM se efectuó utilizando FEC-G en dosis de 40 µg/ kg de peso divididos en 4 subdosis de 10 µg/kg cada 12 h. La última dosis se administró entre 3 y 6 h antes de la autodonación de sangre. Se hizo hemograma antes de la movilización y a las 3 horas de la última dosis del medicamento. Si el conteo de leucocitos era mayor que $20 \times 10^9/L$ y el resto de los parámetros normales, se procedió a la extracción de sangre periférica. Si el conteo era menor, se continuó con la movilización por razón de 10 µg/kg cada 12 h hasta alcanzar la cifra de leucocitos antes mencionada. En ningún caso se administraron más de 6 dosis.

Se utilizaron 2 FEC-G de producción nacional: Leukocim (CIMAB SA, La Habana) y Hebervital (HeberBiotec SA, La Habana), los cuales se compararon con un grupo control movilizado con el factor comercial NEUPOGEN[®] (Roche SA, Suiza).

La obtención y separación de las CMN-SP autólogas se realizó mediante el método estandarizado en el IHI.⁶

Estudio del concentrado

Para la evaluación del concentrado se determinaron las variables siguientes: volumen del concentrado, conteo global de leucocitos ($\times 10^9/L$) efectuado en

contador automático de células ABX Pentra 120, Roche SA, Suiza; y porcentaje de CMN, que fue calculado a partir del recuento diferencial obtenido mediante microscopía óptica en extensiones del concentrado celular teñidas con May-Grunwald-Giemsa.

A una submuestra se le determinó el porcentaje de células CD34+ por citometría de flujo mediante marcaje con un anticuerpo monoclonal anti-CD34 conjugado con ficoeritrina (Serotec Ltd, Reino Unido) que se leyó en un citómetro FaCScan (Benton Dickinson, EE. UU.).

La determinación de la viabilidad celular se realizó mediante coloración con azul Tripán y en todas las muestras se hizo tinción de Gram y cultivos bacteriológicos.

Para evaluar la respuesta a la movilización se calculó la diferencia entre el conteo de leucocitos premovilización y posmovilización. Se clasificó como baja $< 20 \times 10^9/L$; normal entre 20 y $40 \times 10^9/L$; y alta $> 40 \times 10^9/L$.

Análisis estadístico

Todos los datos de los pacientes y los resultados de los estudios premovilización y posmovilización y de la evaluación de los concentrados se incluyeron en una base de datos, que se procesó con el paquete estadístico SPSS, versión 11.5.

Se calcularon las medias, las desviaciones estándar y el rango de las variables cuantitativas.

Para la evaluación de la movilización se empleó la prueba t de Student para muestras pareadas, y para la comparación de los resultados de los FEC-G se realizó un análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA-I). El nivel de significación utilizado fue de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Con ninguno de los FEC-G empleados se observaron diferencias significativas en las cifras de hemoglobina, hematocrito y plaquetas. Solo se encontraron diferencias significativas entre los valores de leucocitos y CMN, antes y después de la movilización (tabla 1). El análisis de la respuesta leucocitaria y de las CMN de acuerdo con el FEC-G empleado, no mostró diferencias significativas.

Los efectos secundarios de la movilización referidos con mayor frecuencia fueron: cefalea, dolor músculo-esquelético, náuseas, vómitos y dolor en el sitio de inyección. Generalmente, estos efectos resultaron ligeros y sin diferencias significativas al comparar los 3 FEC-G indicados.

El volumen promedio de los concentrados de CMN obtenidos, al analizar en conjunto los 3 FEC-G, fue de 100 mL. En ese volumen, el promedio de leucocitos resultó de $193 \times 10^9/L$; el porcentaje de CMN 35,3 %; y el promedio de CMN $70,6 \times 10^9/L$, con un contenido total de $6,43 \times 10^9$ CMN. El promedio de CMN CD 34+ fue 1,49 %. Los valores promedio de estas células de acuerdo con el FEC-G empleado reflejaron: Hebevital 1,48 %; Leukocim 0,66 %; y Neupogen 1,84 %, sin que se encontraran diferencias significativas entre ellos ($p = 0,166$).

Tabla 1. Evaluación de la movilización celular según el factor estimulador de colonias de granulocitos (FEC-G) empleado

FEC-G	Variable	Premovilización ($\bar{x} \pm DE$)	Posmovilización ($\bar{x} \pm DE$)	p<
Hebervital	leucocitos ($10^9/L$)	8,52 \pm 1,93	42,86 \pm 11,25	0,001
	CMN ($10^9/L$)	2,77 \pm 0,18	6,46 \pm 0,50	0,001
Leukocim	leucocitos ($10^9/L$)	8,46 \pm 2,42	43,5 \pm 15,3	0,001
	CMN ($10^9/L$)	3,03 \pm 0,30	8,71 \pm 1,92	0,001
Neupogen	leucocitos ($10^9/L$)	8,50 \pm 1,39	40,27 \pm 11,73	0,001
	CMN ($10^9/L$)	1,71 \pm 0,07	9,69 \pm 0,98	0,05

CMN: células mononucleares.

Los efectos secundarios de la movilización referidos con mayor frecuencia fueron: cefalea, dolor músculo-esquelético, náuseas, vómitos y dolor en el sitio de inyección. Generalmente, estos efectos resultaron ligeros y sin diferencias significativas al comparar los 3 FEC-G indicados.

El volumen promedio de los concentrados de CMN obtenidos, al analizar en conjunto los 3 FEC-G, fue de 100 mL. En ese volumen, el promedio de leucocitos resultó de $193 \times 10^9/L$; el porcentaje de CMN 35,3 %; y el promedio de CMN $70,6 \times 10^9/L$, con un contenido total de $6,43 \times 10^9$ CMN. El promedio de CMN CD 34+ fue 1,49 %. Los valores promedio de estas células de acuerdo con el FEC-G empleado reflejaron: Hebervital 1,48 %; Leukocim 0,66 %; y Neupogen 1,84 %, sin que se encontraran diferencias significativas entre ellos ($p= 0,166$).

La viabilidad celular de los concentrados obtenidos, resultó en todos los casos, mayor que 95 %. En ningún caso se detectó contaminación microbiana.

La concentración de leucocitos y de CMN presente en los concentrados celulares obtenidos con cada uno de los FEC-G tampoco evidenció diferencias significativas (tabla 2).

Tabla 2. Características del concentrado celular obtenido según el factor estimulador de colonias de granulocitos (FEC-G) empleado

Variables en el concentrado	Hebervital ($\bar{x} \pm DE$)	Leukocim ($\bar{x} \pm DE$)	Neupogen ($\bar{x} \pm DE$)	p=
Leucocitos ($10^9/L$)	181,66 \pm 109,6	198,82 \pm 172,8	160,26 \pm 76,6	0,485
CMN ($10^9/L$)	45,53 \pm 33,1	75,29 \pm 33,9	52,15 \pm 35,4	0,156
CMN totales (10^9)	4,61 \pm 3,33	6,707 \pm 4,5	5,638 \pm 3,1	0,405

CMN: células mononucleares.

El grado de movilización producido por los 3 FEC-G no mostró diferencias entre ellos ($p= 0,76$). Predominaron las respuestas normales o altas con los 3 FEC-G estudiados (tabla 3).

Tabla 3. Grado de respuesta movilizativa de acuerdo con el factor estimulador de colonias de granulocitos (FEC-G) empleado

FEC-G	Respuesta movilizativa					
	Baja		Normal		Alta	
	N	%	N	%	N	%
Hebervital	2	11,1	9	50	7	38,9
Leukocim	18	10,4	108	62,4	47	27,2
Neupogen	3	10,7	19	67,8	6	21,5

DISCUSIÓN

La fuente convencional de células progenitoras hematopoyéticas ha sido la médula ósea. En la década del sesenta del pasado siglo se conoció de la existencia de células progenitoras circulantes en la SP, aunque en niveles que no permiten una colección significativa para el trasplante.¹² En los años ochenta se reportó que bajo determinadas circunstancias fisiológicas (ejercicios e infecciones) las células progenitoras aumentan sus niveles en SP. Este fenómeno puede ser reproducido mediante estimulación externa con quimioterapia o mediante la administración de algunos tipos de citocinas. Este hecho, unido al desarrollo tecnológico de los separadores celulares, permitió que fueran recolectadas y utilizadas para trasplante.¹³⁻¹⁶

Durante los años de empleo del trasplante de progenitores hematopoyéticos de SP, se ha evidenciado que su uso tiene una serie de ventajas porque se logra recolectar mayor número de CM; los efectos adversos son menos frecuentes, menos intensos y menos duraderos, no se requiere uso del salón de operaciones, ni anestesia, y se puede realizar en casos de deformaciones o afecciones óseas que contraindiquen el empleo de la médula ósea.^{11,17-19} Estas circunstancias determinan beneficios directos sobre el paciente y a nivel institucional, porque disminuyen la estadía hospitalaria y los costos del proceder. La principal limitante ha sido que la recolección a partir de SP movilizada se hace, generalmente, con una máquina separadora de células que no se encuentra al alcance de las instituciones de salud con recursos limitados, debido al elevado costo del equipo y sus accesorios.

En el presente trabajo se corroboró la validez del esquema de movilización empleado ya que se obtuvo un incremento significativo del conteo de leucocitos, y el contenido de CMN y de células CD 34+ del concentrado estuvo dentro de los valores señalados por otros investigadores. Los efectos adversos como consecuencia de la movilización resultaron ligeros y coinciden con los reportados en la literatura.¹⁹ En ningún caso se produjo trombosis arterial, referida ocasionalmente en otras investigaciones;²⁰ aunque debe señalarse que la mayor parte de los enfermos incluidos en la casuística mantenían terapia con antiagregantes plaquetarios como parte del tratamiento de su enfermedad de base.

Otro elemento a considerar es el alto costo del FEC-G en el mercado internacional, de ahí la gran importancia de su obtención en Cuba.^{21,22} Por sus propiedades estimulantes sobre la diferenciación celular tienen indicación para la recuperación hematopoyética, en el tratamiento de enfermedades infecciosas, como adyuvante de algunas vacunas. Además, se plantea su aplicación local en la mucositis relacionada con la quimioterapia y la radioterapia, y en las úlceras crónicas. En la medicina regenerativa se emplea también con un buen margen de seguridad y pocos efectos adversos conocidos.²³⁻²⁶

Los resultados de la investigación realizada demuestran la factibilidad de utilizar los FEC-G producidos por la industria biofarmacéutica, lo que, además de evidenciar su seguridad y eficacia, facilita la extensión a otros centros de salud de los métodos de obtención y recolección empleados.

Otro elemento a destacar es que el empleo de los sistemas de bolsas permite realizar la mayor parte de la manipulación en un circuito cerrado. En los pasos en que fue necesario abrirlo, se efectuó en un gabinete de seguridad biológica, lo que confiere seguridad al método, avalada por los resultados negativos de los cultivos microbiológicos y de la tinción de Gram de todos los concentrados obtenidos. A esto se une al alto porcentaje de viabilidad celular alcanzado.

Las características del método manual de recolección de CM empleado permiten definirlo como un proceder simple, eficiente y económico, que puede ser empleado satisfactoriamente en otros centros de salud en las cuales se desee introducir la terapia celular regenerativa y que podría ser una solución factible, no solo para Cuba, también para otros países comprendidos entre los menos desarrollados.

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Heriberto Artaza, Pedro Goicoechea, Ángela Blanco, Sandra García, Natalia Poll y Eduardo Atencio, del Servicio de Angiología del Hospital General Docente "Enrique Cabrera", por la colaboración prestada para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hernández P. Medicina regenerativa II. Aplicaciones, realidad y perspectivas de la terapia celular. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 2006;22(1): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S08642892006000100002&lng=es&nrm=iso
2. Hernández P. Medicina regenerativa y células madre. Mecanismos de acción de las células madre adultas. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 2009;25(1): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892009000100002&lng=es
3. Chandran S. What are the prospect of stem cell therapy for neurology? Br Med J. 2008;337:1934.

4. Mato E. Células madre: un nuevo concepto de medicina regenerativa. Rev Cubana Endocrinol. 2004;15:1-9.
5. Hernández P, Dorticós E. Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 2004;20(3): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892004000300001&lng=es&nrm=iso&tlng=es
6. Cortina LD, Hernández P, López MR, Artaza H, Dorticós E, Macías C, et al. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica para trasplante de células madre: Método simplificado. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 2008;24(3): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892008000300004&lng=es
7. McCarthy LJ, Danielson CF, Cornetta K, Srour E, Broun R. Autologous Bone Marrow Transplantation. Crit Rev Clin Lab Sci. 1995;32(1):67-119.
8. Insunza A. Estrategias de movilización de progenitores hematopoyéticos. Conferencia de actualización. XII Congreso de la Sociedad Española; 2001. p. 5-11.
9. McCullough J, Clay M, Herr G, Smith J, Stroncek D. Effects of granulocyte-colony-stimulating factor on potential normal granulocyte donors. Transfusion. 1999;39(10):1136-40.
10. Mazzara R, Lozano M. Obtención de PH de sangre periférica. Carreras E. Manual de Trasplante Hemopoyético. 2da ed., Barcelona: Antares; 2000. p. 245-9.
11. Boogaerts MA. Rational use of myeloid growth factors in Hemato-Oncology. Acta Clin Belg. 1999;54(5):312-5.
12. Körbling M, Burke P, Braine H, Elfenbein G, Santos G, Kaizer H. Successful engraftment of blood-derived normal hemopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia. Exp Hematol. 1981;9(6):684-90.
13. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. N Engl J Med. 2003;348(7):593-600.
14. Kessinger A. Utilization of peripheral blood stem cell in autotransplantation. Hematol Oncol Clin North Am. 1993;7(3):535-45.
15. Rowley SD, Prather K, Bui KT, Appel M, Felt T, Bensinger WI. Collection of peripheral blood progenitor cells with an automated leukapheresis system. Transfusion. 1999;39(11-12):1200-6.
16. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda V, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone marrow cells: A pilot study and a randomized controlled trial. Lancet. 2002;360(9331):427-35.
17. American Association of Blood Banks, Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunología. "Células tronco" (stem cells) y progenitores hematopoyéticos. Manual técnico. 12 ed. Buenos Aires: Edigraf; 1997. p. 407-19.

18. Demko SG. Transplantation procedures. In: Burt RK, Joachim Deeg H, Lothian ST, Santos GW, editors. Bone marrow transplantation. Georgetown: Landes Bioscience; 1999. p. 39-51.
19. Gertz MA. Current status of stem cell mobilization. Br J Haematol. 2010;150(6):647-62.
20. Matsubara H. Risk to the coronary arteries of intracoronary stem cell infusion and G-CSF cytokine therapy. Lancet. 2004;363(9411):746-7.
21. Aldana L, Bacardí D, Merino N, Cosme K, Porrás D, Carreras I, et al. Evaluación de la seguridad del factor estimulador de colonias de granulocitos producido por el CIGB. Biotecnología Aplicada. 2005;22(1):45-9.
22. Zsebo KM, Cohen AM, Murdock DC, Boone TC; Inoue H, Chazin VR, et.al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: Molecular and biological characterization. Immunobiology. 1986;172(3-5):175-84.
23. Haas R, Murea S. The role of granulocyte colony-stimulating factor in mobilization and transplantation of peripheral blood progenitor and stem cells. Cytokines Mol Ther. 1995;1(4):249-70.
24. Daley GQ, Goodell MA, Snyder EY. Realistic prospects for stem cell therapeutics. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2003:398-418.
25. Huang PP, Li SZ, Han MZ, Xiao ZJ, Yang RC, Qui Y, et.al. Autologous transplantation of peripheral blood stem cells as an effective therapeutic approach for severe arteriosclerosis of lower extremities. Thromb Haemost. 2004;91(3):606-9.
26. Zohnöfer D, Dibeá A, Koppa T, de Waha A, Ripa RS, Kastrup J, et al. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor for myocardial recovery after acute myocardial infarction: a meta analysis. J Am Coll Cardiol. 2008;51(15):1429-37.

Recibido: 2 de octubre de 2010.

Aprobado: 23 de noviembre de 2010.

Ana Iris González Iglesias. Instituto de Hematología e Inmunología. AP 8070. CP 10800. La Habana, Cuba. Teléf.: (537) 643 8695, 8268. Fax (537) 644 2334. Correo electrónico: ihidir@hemato.sld.cu