

Ventajas de la terapia celular con células mononucleares derivadas de la médula ósea, aplicadas en su conjunto

Advantages of cell therapy with bone marrow derived mononuclear cells using the entire mononuclear fraction

Prof. DrC. Porfirio Hernández-Ramírez, MSc. Mariela Forrellat-Barrios

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

RESUMEN

En la médula ósea (MO) existe un grupo heterogéneo de células madre adultas, pues además de las hematopoyéticas hay otras no hematopoyéticas. En estudios en modelos animales con neuropatía diabética o con cardiopatía isquémica, se pudo evidenciar la efectividad de las células mononucleares derivadas de la MO (CMN-MO) aplicadas en su conjunto en el control de estas alteraciones. La administración de CMN procedentes de sangre periférica (CMN-SP) también ha sido efectiva en modelos animales con neuropatía diabética o con extremidades isquémicas. En nuestra práctica se ha introducido un método simplificado para la obtención de las CMN-SP y la alternativa de aplicar el conjunto de CMN-SP para la regeneración de tejidos dañados se ha ido incrementando en Cuba con resultados muy prometedores, sin necesidad de la inmunofenotipificación de las células madre aportadas y controlando su uso mediante el número de células movilizadas y el número absoluto de CMN presentes en el concentrado final que será utilizado.

Palabras clave: células mononucleares, médula ósea, sangre periférica, medicina regenerativa.

ABSTRACT

In the bone marrow (BM) there is a heterogeneous group of adult stem cells formed not only by hematopoietic stem cells but also by a set of non-hematopoietic stem cells. Studies in animal models of diabetic neuropathy or ischemic heart disease,

made it evident the effectiveness of BM derived mononuclear cells (BM-MNC) applied as a whole in the control of these alterations. The use of peripheral blood MNC (PB-MNC) has also been effective in animal models of diabetic neuropathy or ischemic limbs. In our practice a simplified method for obtaining PB-MNCs has been introduced and the alternative of using the entire mononuclear fraction for regeneration of damaged tissues has been progressively increasing increased in Cuba with very promising results without need of immunophenotyping stem cells and monitoring their use only by the number of mobilized cells and the absolute number of MNC present in the final concentrate to be used.

Keywords: mononuclear cells, bone marrow, peripheral blood, regenerative medicine.

INTRODUCCIÓN

En la médula ósea (MO) existe un grupo heterogéneo de células madre adultas pues, además de las hematopoyéticas (CMH), están las endoteliales, las mesenquimales (CMM), las de la población lateral, las progenitoras adultas multipotentes, las ovaes y también las células madre muy pequeñas similares a embrionarias. Ante esta composición tan heterogénea, las células mononucleares (CMN) derivadas de la MO pueden verse en su conjunto como un «coctel» de diferentes células madre adultas.

En las aplicaciones iniciales de la terapia celular regenerativa realizadas en el nuestro Instituto de Hematología e Inmunología institución, se usaron CMN derivadas de la MO autóloga que se extrajeron directamente por punción de las crestas ilíacas, pero poco después su obtención se hizo de la sangre periférica. Con este fin se introdujo un método manual, simple, de recolección y procesamiento de CMN y de células CD34+ movilizadas a la sangre periférica mediante el factor estimulador de colonias de granulocitos (FEC-G), que se extraen por autodonación de sangre en un sistema cerrado de bolsas colectoras. Como potenciador de la sedimentación eritrocitaria se adiciona hidroxietilalmidón al 6 %. De esta forma, el paciente no tiene que ser sometido a anestesia ni llevado al salón quirúrgico para la recolección celular.¹

Este método es de fácil realización y relativamente económico puesto que el FEC-G se produce en el país y está a disposición de toda institución nacional que lo requiera. Con posterioridad, el método se modificó ligeramente al aplicarse, después de la flebotomía, la centrifugación de la sangre a 3 000 rpm durante 10 min a 4°C, seguida del proceso de sedimentación eritrocitaria en la lo que también se puede utilizar el gelofusine al 4 %. De esta forma se dispuso más rápidamente del concentrado celular. Este hecho facilitó la introducción de la terapia celular en otras instituciones de la red nacional de Salud, después de haberse realizado varios estudios comparativos de la efectividad de los FEC-G de producción nacional con el FEC-G comercial extranjero más ampliamente usado, sin que se encontraran diferencias significativas de los resultados.²

CAPACIDAD REGENERATIVA INTEGRAL DE CMN

Se conoce que las células madre existentes en la MO pueden ser movilizadas a la sangre periférica por diferentes factores estimuladores. En general, cuando estas células se extraen en su conjunto como componentes de las CMN se ha aplicado el marcador CD34+ como referencia de las CMH obtenidas; pero habitualmente no se inmunofenotifican las otras células madre presentes.

Con la finalidad de evaluar la capacidad regenerativa integral de este conjunto celular se han realizado varias investigaciones.

En estudios en modelos animales con neuropatía diabética o con cardiopatía isquémica por infarto del miocardio, se evidenció la efectividad de las CMNMO aplicadas en su conjunto en el control de estas alteraciones. El uso de CMN-MO también permitió normalizar la expresión de 2 099 (96,2 %) genes de los que se encontraban alterados como consecuencia del infarto cardiaco.^{3,4}

La administración de CMN-procedentes de sangre periférica (CMN-SP) también ha sido efectiva en modelos animales con neuropatía diabética o con extremidades isquémicas.^{5,6}

En un modelo murino con isquemia de las extremidades se comparó el uso de CMN CD 34+ con el de CMN desprovistas de CD 34. La pérdida de extremidades isquémicas fue significativamente menor en los grupos en que se trasplantaron células en comparación con un grupo que no recibió terapia celular. La depleción de células CD34+ disminuyó pero no eliminó la eficiencia terapéutica de las CMN.⁷ Estos datos indican que las células madre no hematopoyéticas presentes entre las CMN influyeron favorablemente en estos resultados.

Por otra parte, en un grupo de pacientes con extremidades inferiores isquémicas a los que se inyectaron en ellas CMN-SP autólogas movilizadas con FEC-G, En estos casos el número de CMN movilizadas fue un mejor indicador de la efectividad terapéutica que el número de células CD34+; resultado que también apoya la ventaja del uso de las CMN en su conjunto.⁸

Sin embargo, en la actualidad hay gran tendencia a plantear el uso de subpoblaciones individuales de células madre, en particular de las CMM, alegando una mayor capacidad regenerativa. Esta conducta se ha convertido en una de las mayores expectativas en este campo de la medicina.

En 41 pacientes diabéticos tipo 2 con isquemia crítica de miembros inferiores y úlceras en el pie, se inyectaron por vía intramuscular CMM-MO en un grupo y CMN-MO en otro. En un tercero que se usó como grupo control se inyectó solución salina en el tejido isquémico. Aunque en el grupo tratado con CMM-MO la cicatrización de la úlcera fue más rápida y hubo una mejoría más significativa del tiempo de marcha sin dolor, del índice tobillo-brazo, de las presión percutánea de oxígeno y de los resultados de la angiografía por resonancia magnética, no se observaron diferencias entre los grupos tratados con terapia celular en cuanto al alivio del dolor y la necesidad de amputaciones y en ninguno de ellos se presentaron efectos adversos.⁹

Varias investigaciones han sugerido que las CMM tienen su origen en las CMH¹⁰. Se ha planteado que la coadministración de estas células puede mejorar la regeneración de tejidos dañados por una acción sinérgica de ellas. Esa vinculación CMH-CMM también favorece el criterio de la acción sinérgica que se puede establecer entre los diferentes

tipos celulares existentes en la MO, acción que amplía la capacidad regenerativa de ese conjunto celular.^{11,12}

En una investigación en que se usaron CMN-MO autólogas, como tratamiento regenerativo en un pequeño número de pacientes con úlceras por presión, lesiones óseas o úlceras del pie diabético; las evidencias obtenidas sugerían que la efectividad terapéutica era independiente del número de CMM presentes entre las CMN-MO inyectadas, observación que también apoya la efectividad de las CMN aplicadas en su conjunto.¹³

La efectividad de las CMN-MO ya se había señalado en un trabajo previo de los mismos autores en que las CMN-MO autólogas se usaron para el tratamiento de úlceras cutáneas por presión en pacientes con lesiones de la médula espinal.¹⁴ En ese artículo se emitieron algunos criterios, entre ellos, que el método de obtención de las CMN es un proceder sencillo que no requiere gran manipulación ni cultivos celulares y que además permite la implantación de las células rápidamente sin necesidad de su expansión *in vitro*.

En nuestra práctica se ha simplificado más mediante el empleo de células movilizadas a la sangre periférica. El uso de las CMN en su conjunto incluye todas las subpoblaciones de CM/progenitoras derivadas de la MO, de cuya interrelación, balance, estrecha colaboración y coadministración puede depender una respuesta funcional más fisiológica e integral.

Lo antes expuesto ofrece ventajas sobre el uso individual de la subpoblación de CMM, que han sido las más empleadas en la práctica clínica. A pesar de que las CMM se pueden obtener no solo de la MO, sino también de otras fuentes alternativas, su manipulación es más compleja pues requiere su separación del resto de las células presentes en el microambiente, generalmente necesitan ser cultivadas con frecuentes cambios de medios de cultivo para su expansión, mayores riesgos de contaminación y además, mayor demora para su aplicación. Por supuesto, para estos procedimientos se necesitan laboratorios con equipamiento y reactivos específicos, lo que se refleja en un incremento de los costos. Además, se ha señalado con toda lógica, que la demora en el procesamiento de las células puede interferir en el tratamiento oportuno de pacientes en condiciones clínicas tales, que una administración terapéutica rápida pudiera contribuir a la obtención de mejores resultados.

Todas las evidencias comentadas apoyan la alternativa de aplicar el conjunto de CMN derivadas de la MO como un método simple y práctico para la regeneración de tejidos dañados y que se ha ido generalizando en Cuba con resultados muy prometedores sin necesidad de la inmunofenotipificación de las células madre aportadas y controlando su uso mediante el número de células movilizadas y el número absoluto de CMN presentes en el concentrado final que será utilizado.¹⁵

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Cortina- Rosales L, Hernández- Ramírez P, López- De Roux MR, Artaza-Sanz HM, Dorticós- Balea E, Macías- Abraham 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=e .

- 2- González -Iglesias AI, Forrellat -Barrios M, González -Suárez T, Salgado- Arozena O, Fernández -Delgado N, Hernández- Ramírez P, et al. Obtención y procesamiento de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica para terapia celular en enfermedades angiológicas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2011;27(3): 356-64 .

- 3- Lachtermacher S, Esporcatte BLB, da Silva de Azevedo Fortes F, Novaes Rocha N, Montalvão F, Costa P C, et al. Functional and Transcriptomic Recovery of Infarcted Mouse Myocardium Treated with Bone Marrow Mononuclear Cells. *Stem Cell Rev.* 2012 March; 8 (1): 25161 .

- 4- Naruse K, Sato J, Funakubo M, Hata M, Nakamura N, Kobayashi Y, et al. Transplantation of Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells Improves Mechanical Hyperalgesia, Cold Allodynia and Nerve Function in Diabetic Neuropathy. *PLoS One.* 2011; 6(11): e27458. doi: 10.1371/journal.pone.0027458.

- 5- Hasegawa T, Kosaki A, Shimizu K, Matsubara H, Mori Y, Masaki H, et al . Amelioration of diabetic peripheral neuropathy by implantation of hematopoietic mononuclear cells in streptozocin- induced diabetic rats. *Exp Neurol.* 2006 Jun; 199(2): 274-80.

- 6- Han JW, Sin M, Yoon YS. Cell therapy for diabetic neuropathy using adult stem or progenitor cells. *Diabetes Metab.* 2013 Apr; 37(2): 91-105. doi: 10.4093/dmj.2013.37.2.91.

- 7- Li S, Zhou B, Han ZC. Therapeutic neovascularization by transplantation of mobilized peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. A comparison between CD34+ and CD34- mononuclear cells. *Thromb Haemost.* 2006 Feb; 95 (2):301-11.

- 8- Wu LH, Zhang Y, Huang PP, Li SZ, Zhao YX, Long FL, et al.. Analysis the advantage of autologous mobilized peripheral blood mononuclear cells transplantation on lower limbs ischemia disease. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2011 Feb; 32 (2):112-4.

- 9- Lu D, Chen B, Liang Z, Deng W, Jiang Y, Li S, Xu J, et al. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011 Apr; 92(1):26-36.

- 10- Ogawa M, Larue AC, Watson PM, Watson DK. Hematopoietic stem cell origin of mesenchymal cells: opportunity for novel therapeutic approaches. *Int J Hematol.* 2010 Apr; 91(3):353-9.

- 11- Urbán VS, Kiss J, Kovács J, Gócza E, Vas V, Monostori E, et al. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells* 2008; 26 (1):24453.

- 12- Moioli EK, Clark PA, Chen M, Dennis JE, Erickson HP, Gerson SL, et al. Synergistic Actions of Hematopoietic and Mesenchymal Stem/Progenitor Cells in Vascularizing Bioengineered Tissues. *PLoS ONE.* 2008; 3(12): e3922. doi: 10.1371/journal.pone.0003922.

13- Alvarez-Viejo M, Menendez-Menendez Y, Blanco-Gelaz M A, Ferrero-Gutierrez A, Fernandez-Rodriguez MA, Gala J, et al. Quantifying Mesenchymal Stem Cells in the Mononuclear Cell Fraction of Bone Marrow Samples Obtained for Cell Therapy. *Transplant Proc.* 2013 JAn-Feb; 45(1), 4349.
doi: 10.1016/j.transproceed.2012.05.091.

14- González- Sarasúa J, Pérez- López S , Álvarez- Viejo M, Pérez Basterrechea M, Fernández- Rodríguez A, Ferrero-Gutiérrez A, et al. Treatment of pressure ulcers with autologous bone marrow nuclear cells in patients with spinal cord injury. *J Spinal Cord Med.* 2011; 34 (3): 301-7. doi: 10.1179/2045772311Y.0000000010.

15- Hernández-Ramírez P. Reflexiones sobre la introducción y desarrollo de la terapia celular en Cuba. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2013; 29 (3). Disponible en: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/83/68>

Recibido: junio 16, 2013

Aceptado: julio 08, 2013

Prof. DrC. Porfirio Hernández Ramírez. INSTITUTO DE HEMATOLOGÍA E INMUNOLOGÍA. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, CUBA
Tel (537) 643 8695, 8268
Fax (537) 644 2334
Email: rchematologia@infomed.sld.cu