



Trasplante autólogo de células mononucleares de sangre periférica en fractura del húmero de difícil solución

Anwar Hussein Aidroos,* Yolanda Valdés Rodríguez,* J Carnot Uria, Carballo Treto,** Jesús Diego de la Campa,** Rubén López Beltrán,** Julio Antonio López Silva,** E Abraham Marcel***

Palabras clave:

Medicina regenerativa, células madre adultas, trasplante autólogo, injerto de cresta ilíaca, citometría de flujo.

Key words:
Regenerative medicine, adult stem cells, autologous transplant, iliac crest graft, flow cytometry.

* Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba.

** Hospital Clínico Quirúrgico «Hermanos Ameijeras» (HHA), Cuba.

*** Ministerio de Salud Pública, Cuba.

Correspondencia:
MSC. Anwar Hussein Aidroos
Instituto de Farmacia y Alimentos,
Universidad de La Habana,
Residencia Estudiantil.
Calle 222 La Lisa. Ciudad Habana.
Tel: (0053) 53346202
E-mail: kakiloder@yahoo.es

Recibido:
11/02/2013.
Aceptado:
23/05/2013.

RESUMEN

Hombre de 34 años y 115 kg de peso, que presentaba una fractura de húmero de difícil solución, a pesar de haberse sometido a tres intervenciones quirúrgicas previas. Se decidió aplicar la terapia regenerativa mediante injerto óseo autólogo de cresta ilíaca junto a células mononucleadas de la circulación periférica del paciente. Con el objetivo de lograr la movilización de células madre de médula ósea hacia la circulación periférica, se le administraron 5 µg/kg de peso del factor estimulador de colonias de granulocitos (FEC-G) recombinante cada 12 horas durante tres días. A partir de 1,000 mL de sangre, obtenida por venopunción, se aislaron las células mononucleadas y se determinó el fenotipaje por citometría de flujo, empleando los anticuerpos monoclonales CD34 y CD45. Al siguiente día, se le inoculó al paciente durante la operación del injerto óseo autólogo de cresta ilíaca. La solución de la fractura del húmero se siguió mediante estudio de rayos X, y a los tres meses se logró la consolidación.

ABSTRACT

A male patient of 34 years old weighed 115kg, had difficult fractured humerus condition besides having been surgically operated three times. And finally, they decided to apply regenerative therapy by use of autologous transplant of iliac crest together with mononuclear cells from peripheral blood circulation of the patient. With objective of achieving the mobilization of stem cells of the bone marrow towards peripheral blood circulation, they administered 5µg/kg of the total body weight of colonial granulocytes stimulation factor (FSC-G) recombinant every 12 hours for three days from the 1,000 mL of blood obtained by veinpuncture, they isolated the mononuclear cells and determined the phenotype using flow cytometric technique employing monoclonal antibodies CD34 and CD45. The following day, they administered or transplanted the iliac crest to the patient. They monitored the fracture of the humerus by perfuming an X-ray, and in three months they achieved consolidation.

INTRODUCCIÓN

La medicina regenerativa actualmente se aplica en el tratamiento de un amplio grupo de enfermedades, como en cardiopatía isquémica, falla hepática, enfermedades neurodegenerativas, regeneración de heridas, en miembros isquémicos, traumas óseos y en pacientes con diferentes tipos de cáncer.¹⁻⁴ En ortopedia, se ha demostrado su efectividad en el tratamiento de retrasos de consolidación y la pseudoartrosis, así como en las necrosis óseas avasculares no traumáticas de la cadera y el hombro.⁵ La consolidación de las fracturas del hueso puede ser alterada por factores mecánicos, biológicos o una combinación de ambos.^{6,7} En estos casos se suele utilizar el

injerto óseo para suprir la pérdida del tejido óseo mediante la formación de éste por el receptor. El injerto de cresta ilíaca ha mostrado mejores resultados e integración que otros; aumenta los contornos, estabiliza las hendiduras y reconstruye diversos defectos óseos. A su vez, la médula ósea de la cresta ilíaca es una importante fuente de células madres hematopoyéticas (CMH), lo cual favorece la formación de osteoblastos y osteoclastos que participan en la remodelación ósea.⁸⁻¹⁴

Por otra parte, el factor estimulante de colonias granulocíticas (FEC-G) es un excelente inductor de la proliferación y diferenciación de las células madres hematopoyéticas (CMH) hacia líneas de células mononucleadas (CMN) (polimorfonucleares, eosinófilos y monocitos),

pues favorece la movilización de éstas desde la médula ósea hacia la sangre periférica.¹⁵⁻¹⁸ La magnitud de la movilización puede medirse mediante la cuantificación de los marcadores específicos de superficie, como CD34⁺ y CD45⁺.¹⁹ La sangre periférica es la fuente preferida de progenitores hematopoyéticos para trasplante autólogo, se considera un tratamiento preciso y susceptible de dosificación.²⁰

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio de un caso clínico con fractura distal de húmero del miembro derecho.

Paciente masculino de 34 años de edad, con 115 kg de peso con pseudoartrosis del tercio distal del húmero derecho, secundaria a fractura espiroidea con fragmento en ala de mariposa debida a un accidente de tránsito; operado en tres ocasiones en otros centros en los que se le aplicaron fijadores externos e injerto óseo de banco. Se realizó el seguimiento mediante estudio radiológico durante seis meses; sin embargo, el dolor persistía y el húmero no había consolidado (*figura 1*). Se aplicó entonces resección del foco pseudoartrósico, se colocaron dos alambres rígidos intramedulares, un fijador externo monopolar RALCA (doble barra) e injerto de cresta ilíaca ipsilateral tricortical y esponjoso y además injerto autólogo de células madres adultas, de origen hematopoyético (*figura 2*).

Obtención de células madres adultas. Para la obtención de las células madre hematopoyéticas adultas, se

estimuló la movilización a sangre periférica de las células mononucleadas de médula ósea. El paciente fue sometido a un pretratamiento mediante la administración del FEC-G recombinante en dosis de 5 µg/kg de peso, cada 12 horas, durante tres días. Posteriormente se realizaron dos extracciones de 500 mL de sangre del paciente mediante venopunción para aislar las células mononucleadas.

Aislamiento de células mononucleadas con técnica de plasmagel. Cada bolsa de 500 mL de sangre total se centrifugó durante diez minutos, a 3,000 revoluciones por minuto (rpm) y a 4 °C. Al terminar el tiempo de centrifugación, fueron colocadas en los desplasmatizadores; liberamos el brazo del desplasmatizador y rompimos el sello que da salida al plasma hacia la bolsa satélite, pinzamos y sellamos la tubuladura, quedando el paquete celular desplasmatizado; posteriormente separamos ambas bolsas, pesamos la bolsa con el contenido celular y determinamos su volumen en mililitros. En el gabinete de seguridad biológica agregamos, a la bolsa que contiene las células, la misma cantidad de plasmagel y dejamos sedimentar en posición vertical durante 25 o 30 minutos, logrando en este gradiente de densidad la separación evidente del plasma rico en células del concentrado de eritrocitos y este último para reinfundir al paciente. La bolsa que contiene el plasma rico en células se sometió a una centrifugación pesada para ajustar el volumen final de la colecta de células quedando en 50 mL; luego se almacenó la bolsa de células mononucleadas en la nevera de conservación de sangre (temperatura de 2 a 4 °C) hasta el siguiente día en que fue implantada la terapia celular.

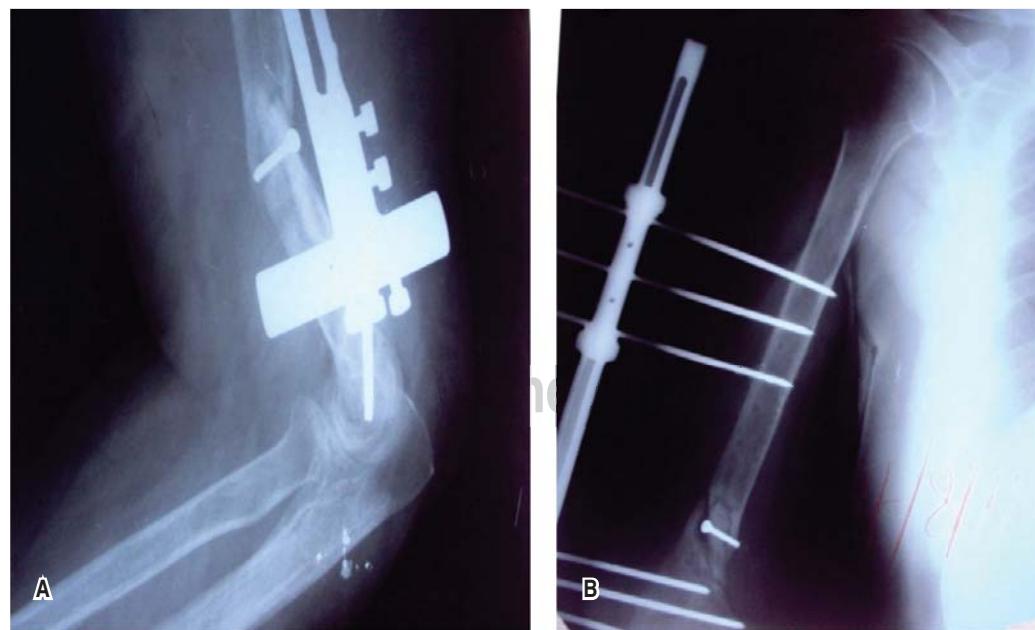


Figura 1.

Placas radiográficas del húmero derecho antes de aplicar el protocolo de la terapia combinada.

Se midió la viabilidad de las células mononucleadas aisladas mediante la técnica de azul tripán al 1%; posteriormente se procedió a determinar el conteo de leucocitos en el contador hematológico y la proporción y fenotipaje de las células madres se realizó mediante la técnica de citometría de flujo, marcadas con los anticuerpos monoclonales CD34 conjugado con ficoeritrina y CD45 conjugado con isiotiocianato de fluoresceína. Las lecturas se realizaron en un citómetro de flujo FACScan, en el Centro de Inmunología Molecular. Los histogramas biparamétricos se construyeron a partir del porcentaje absoluto de células mononucleadas CD45⁺ y CD34⁺ obtenido a partir de las lecturas de dispersión frontal (FS) y dispersión lateral (SS) a 675 nm, lo que permitió el cálculo del porcentaje de las subpoblaciones celulares CD34⁺/CD45⁺.

Obtención de tejido de la cresta ilíaca. El paciente se colocó en decúbito lateral izquierdo, se le aplicó anestesia general orotraqueal y se obtuvo un injerto tricortical de 4 cm de la cresta ilíaca derecha más injerto de hueso esponjoso. Se realizó disección cuidadosa, respetando el nervio femorocutáneo derecho; al finalizar se aplicó cera hemostática para evitar el sangrado óseo de la zona donante.

Primero se resecó el foco de pseudoartrosis, se colocó el injerto tricortical y aplicaron dos alambres intramedulares. Después se colocó el fijador externo descrito, se realizó arrastre mecánico y se aplicaron las células madre. Finalmente, se colocó el injerto de hueso esponjoso de la cresta ilíaca y se procedió a cerrar por planos, dejando drenajes de aspiración en el brazo derecho y a nivel de la cresta ilíaca derecha.

Se realizó una incisión oblicua con orientación inferior y posterior a la cresta ilíaca, a un centímetro del dorso

de la espina y una longitud de 5 cm; se seccionaron las inserciones anteriores de los músculos abdominales oblicuo externo e interno y un segmento del tensor de la fascia lata, hasta alcanzar el periostio. Para obtener un injerto de tipo cortical se separaron las tablas óseas con el auxilio de un esteótomo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fenotipaje de células madre hematopoyéticas por citometría de flujo. Los histogramas obtenidos por citometría de flujo de las células mononucleadas aisladas de la sangre total del paciente y marcadas con anticuerpos monoclonales CD34 y CD45, respectivamente, se muestran en la figura 3. En ausencia de los marcadores de superficie se pueden observar los diferentes tipos de las células mononucleadas, teniendo en cuenta su tamaño y complejidad nuclear (figura 3A: R1-SSC-H/FSC-H), la región R1 del histograma corresponde a las células mononucleadas, como se demostró mediante el marcaje con el anticuerpo monoclonal anti-CD45, específico para células linfocitarias.

El histograma de la figura 3B, FL1-H/FSC-H (color rojo), se corresponde con los linfocitos marcados con el anticuerpo monoclonal CD45⁺⁺FITC (FL1-H/FSC-H). El 98.27% de las células resultaron CD45⁺⁺FITC. En la figura 3C se observa la región R2 (color verde), se presentan las células madre marcadas con el anticuerpo monoclonal anti-CD34⁺⁺RPE (FL2-H/FSC-H), las cuales son 3.21% del total.

En el histograma de la figura 3D (color azul) se presenta el resultado del doble marcaje con los anticuerpos monoclonales anti-CD34⁺⁺/anti-CD45⁺⁺ (FL2-H/FL1-H). En éste se encontró 3.45% de la colecta de sangre total antes

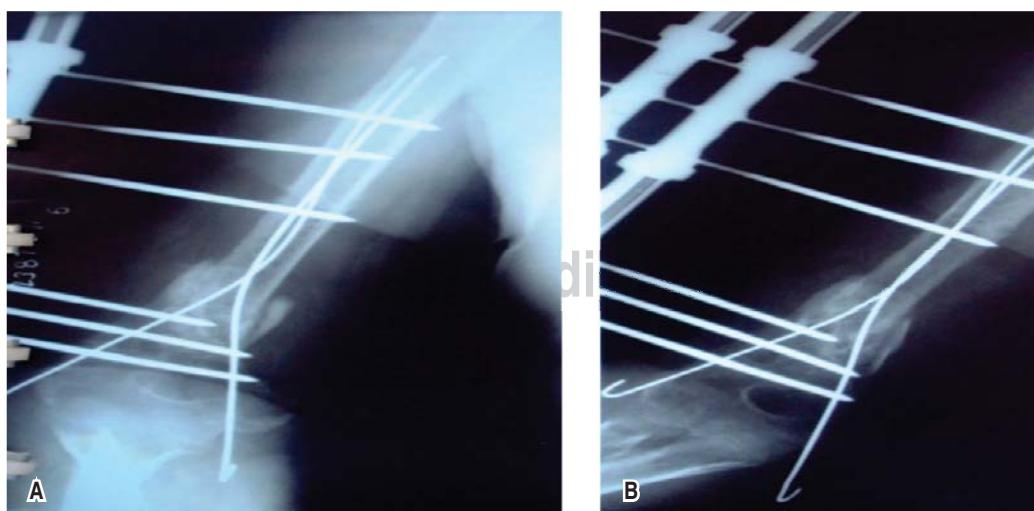
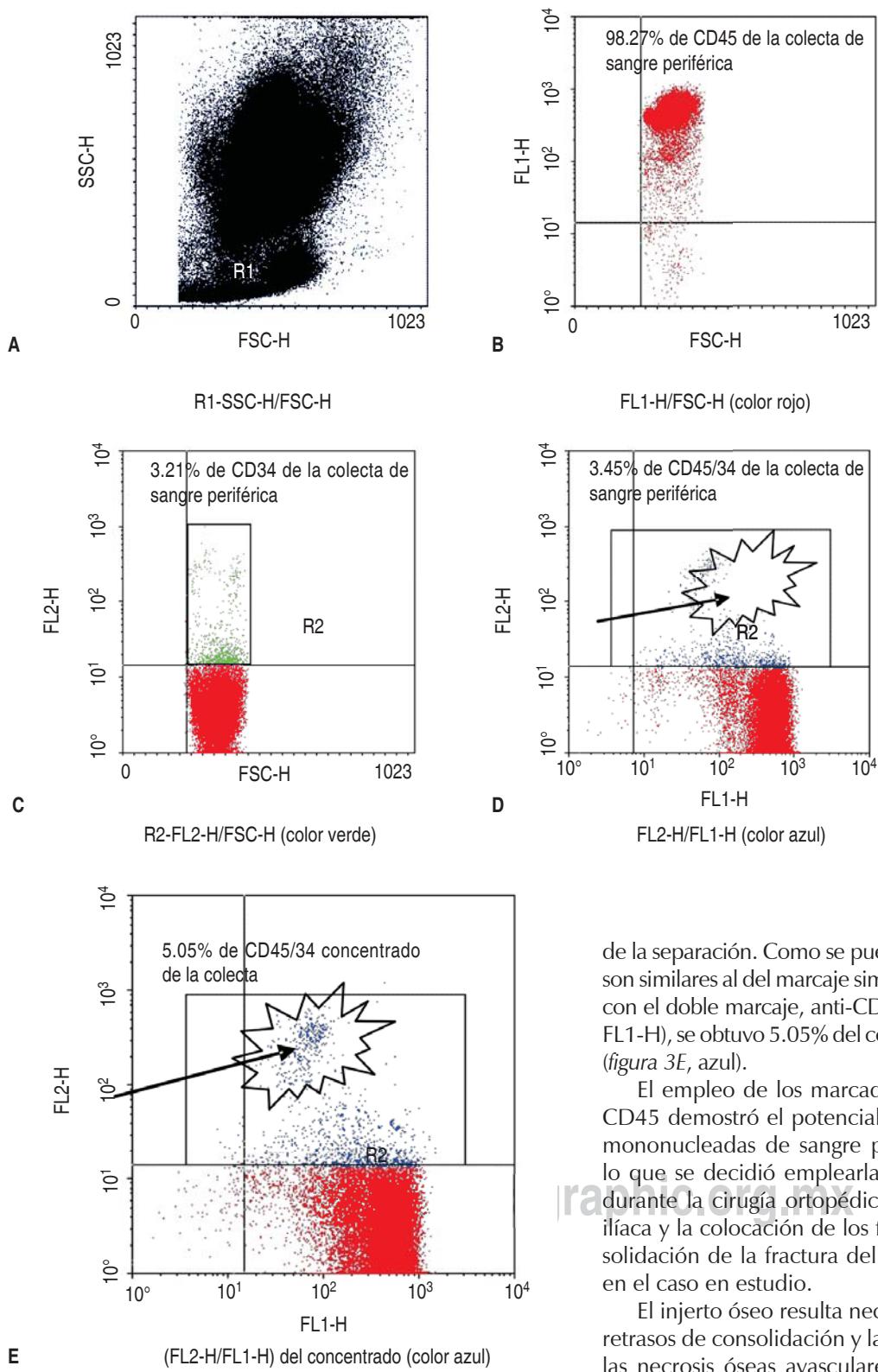


Figura 2.

Estudio radiológico transoperatorio. Fijación ósea con alambres intramedulares y aplicación de fijador externo monopolar Ralca (doble barra), injerto tricortical de cresta ilíaca derecha, de hueso esponjoso y células madre.



Imágenes en color en:
www.medigraphic.com/patologiaclinica

de la separación. Como se puede apreciar, estos resultados son similares al del marcaje simple (*figura 3C*); mientras que con el doble marcaje, anti-CD34⁺⁺/anti-CD45⁺⁺ (FL2-H/FL1-H), se obtuvo 5.05% del concentrado de la colecta final (*figura 3E*, azul).

El empleo de los marcadores de superficie CD34 y CD45 demostró el potencial proliferativo de las células mononucleadas de sangre periférica del paciente. Por lo que se decidió emplearlas en el trasplante autólogo durante la cirugía ortopédica del autoinjerto de cresta ilíaca y la colocación de los fijadores para lograr la consolidación de la fractura del húmero de difícil solución en el caso en estudio.

El injerto óseo resulta necesario en el tratamiento de retrasos de consolidación y la seudoartrosis, así como en las necrosis óseas avasculares no traumáticas.⁵ Existen múltiples factores que pueden afectar la consolidación de

Figura 3. Fenotipaje de células madre por citometría de flujo.

**Figura 4.**

Radiografías tomadas tres meses después del trasplante autólogo de células mononucleadas de sangre periférica junto al autoinjerto de cresta ilíaca sin fijadores. Se observa la consolidación de la fractura del tercio terminal del húmero.

las fracturas del hueso.⁶⁻⁷ El injerto óseo permite suplir la pérdida del tejido óseo, particularmente el injerto de la cresta ilíaca, importante fuente de células madre hematopoyéticas (CMH), que ha mostrado mejores resultados e integración en la reconstrucción de defectos óseos.⁸⁻¹⁴

Por otra parte, el tratamiento previo del paciente mediante la adición del FEC-G aseguró la movilización de células madre hematopoyéticas desde la médula ósea hacia la sangre, proporcionando incremento del número de progenitores hematopoyéticos en circulación.¹⁵⁻¹⁸

Por una parte, el trasplante autólogo del concentrado de células mononucleadas CD34⁺/CD45⁺ y la médula ósea de la cresta ilíaca autoinjertada contribuyeron a la consolidación de la fractura del húmero de difícil solución, ya que proporcionaron una mayor magnitud de células hematopoyéticas en la circulación del paciente. Por tanto, el tratamiento mediante la medicina regenerativa y la colocación de los fijadores aseguraron la consolidación del hueso a los tres meses de aplicadas (figura 4).

CONCLUSIONES

Se demostraron las ventajas de la combinación del trasplante autólogo de células madre adultas de la circulación periférica con el autoinjerto de cresta ilíaca y la colocación de los fijadores en la consolidación de la fractura del tercio terminal del húmero del paciente.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las cosas que nos engrandecen en la vida, jamás un éxito profesional será personal, es la suma de múltiples esfuerzos, por eso gracias a todos: A mi familia, porque todos de alguna manera han participado en este triunfo. A los compañeros de los departamentos implicados, al Hospital «Hermanos Ameijieras» (HHA), al Instituto «Pedro Kouri» (IPK) y al Centro de Inmunología Molecular (CIM) de Cuba, por el apoyo brindado a la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Hernández P et al. Autotransplant of adult stem cells in lower limb fractures with critical ischemia. Rev Esp Invest Quirurg. 2007; X (4): 204-211.
2. Chachques JC, Trainini JC, Lago N et al. Assistance and regeneration of the myocardium combining cell therapy and tissue engineering. Rev Insuf Card. 2008; 3 (1): 2-8.
3. Prósper F. Trasplante celular y terapia regenerativa con células madre. Nefrología. 2008; supl 6: 71-79.
4. Escobedo-Uribe CD, Monsiváis-Urendab AE, López-Quijanoc JM et al. Arch Cardiol Mex. 2012; 82 (3): 218-229.
5. Landro ME, Francalaccia V, Price ALD. Medicina regenerativa. Su aplicación en traumatología. Rev Asoc Argent Ortop Traumatol. 2010; 75 (4): 398-403.
6. Pretell MJA, Ruiz SC 2, Rodríguez MJ. Trastornos de la consolidación. Rev Med Hered. 2009; 20: 31-39.
7. Baganet CAM, Hernández RP, Fernández DN et al. Implante percutáneo de células mononucleares de sangre periférica movilizadas

- con factor estimulante de colonias granulocíticas, en la osteoartrosis de rodilla. Primer caso comunicado en Cuba. Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter. 2010; 26 (1): 246-252.
8. Linares GL, Rico MG. Trasplante de médula ósea autóloga. Experiencia en el tratamiento de lesiones de origen tumoral y seudotumoral para estimulación de neoformación ósea. Rev Mex Ortop Traum. 1998; 12 (5): 437-440.
 9. Connolly JF, Guse R, Tieddeman J et al. Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. Clin Orthop. 1991; 266: 259-269.
 10. Pérez BA, Domínguez RL, Ilisártigui OZT, Hernández RP. Utilización de células madre en el tratamiento de defectos óseos periodontales. Rev Cub Estomagol. 2009; 46 (4): 108-116.
 11. Torrez RLE, Marimón TME, Morejón AFC et al. Autotransplant de células madre adultas en defectos óseo de rama mandibular por quiste dentígeno. Rev Cien Med. 2011; 15 (4): 89-101.
 12. Pesciallo C, Mana PD, Garabano G et al. Utilización del alioinjerto en seudoartrosis diafisarias del fémur y la tibia. Rev Asoc Argent Ortop Traumatol. 2010; 75 (3).
 13. Kessler P, Thorwarth M, Bloch-Birkholz A, Nkenke E, Neukam FW. Harvesting of bone from the iliac crest comparison of the anterior and posterior sites. Br J Oral Maxillofac Surg. 2008; 43 (1): 51-56.
 14. Markus G, Pechlaner S, Zimmermann R. Injerto libre vascularizado de cresta ilíaca para el tratamiento de pseudoartrosis de escafoides con fragmento proximal avascular. Tec Quir Ortop Traumatol. 2011; 20 (1): 29-38.
 15. Khosla S, Eghbali-Fatourechi GZ. Circulating Cells with osteogenic potential. Ann NY Acad Sci. 2006; 1068: 489-497.
 16. Eghbali-Fatourechi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL, Khosla S. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. N Engl J Med. 2005; 352: 1959-1966.
 17. González-Iglesias AI, Forrellat-Barrios M, González ST et al. Obtención y procesamiento de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica para terapia celular en enfermedades angiológicas. Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter. 2011; 27 (3): 356-364.
 18. González IAI, Forrellat BM, Fernández DN, Herández RP. Movilización de progenitores hematopoyéticos en mayores de 60 años. Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter 2012; 28 (2): 192-194.
 19. Macías-Abraham C, Del Valle-Pérez LO, Hernández-Ramírez P, Ballester-Santovenia JM. Características fenotípicas y funcionales de las células madre mesenquimales y endoteliales. Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter. 2010; 26 (4): 256-275.
 20. Pérez CJ. Factores que influyen sobre el injerto en el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica. Tesis Doctoral. Dpto. Medicina. Universidad Computense de Madrid. 2002.