



CIRUGÍA y CIRUJANOS

Órgano de difusión científica de la Academia Mexicana de Cirugía
Fundada en 1933

www.amc.org.mx www.elsevier.es/circir



CASO CLÍNICO

Células troncales mesenquimales autólogas e injerto cutáneo autólogo para tratamiento de una úlcera crónica secundaria a diabetes mellitus tipo 2



Gamaliel Benítez-Arvizu^{a,*}, Ícela Palma-Lara^a, René Vazquez-Campos^b,
Raimundo Alfonso Sesma-Villalpando^b, Alberto Parra-Barrera^c
y Gisela Gutiérrez-Iglesias^c

^a Departamento de Laboratorio de Morfología Celular, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México D.F., México

^b Servicio de Ortopedia, Hospital General de Puebla, Secretaría de Salud del estado de Puebla, Puebla, Puebla, México

^c Departamento de Laboratorio de Medicina Regenerativa y Cáncer, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México D.F., México

Recibido el 12 de marzo de 2014; aceptado el 31 de octubre de 2014

Disponible en Internet el 9 de julio de 2015

PALABRAS CLAVE

Células troncales
mesenquimales;
Úlcera crónica;
Diabetes mellitus
tipo 2

Resumen

Antecedentes: La diabetes mellitus tipo 2 se ha convertido en un problema a nivel mundial. Se estima que del 15 al 25% de los pacientes desarrollarán una úlcera crónica a lo largo de su vida, y cerca del 33% de los costos directos de atención a diabetes mellitus tipo 2 se gasta en la atención de estas úlceras. Las células troncales mesenquimales han surgido como una fuente celular prometedora para el tratamiento de este tipo de úlceras.

Caso clínico: Masculino de 67 años con antecedentes de diabetes mellitus tipo 2, infarto agudo de miocardio y úlcera crónica en miembro inferior derecho que involucra la cara interna del pie y parte de la pierna derecha; se le trató con células troncales mesenquimales, resultando una adecuada integración del injerto de piel y la cobertura total de la lesión.

Conclusión: La implementación de células troncales mesenquimales para el tratamiento de la úlcera crónica es factible. El impacto en la población sería importante, al mejorar la calidad de vida de los pacientes y disminuir los costos de atención.

© 2015 Academia Mexicana de Cirugía A.C. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia: Av. Salvador Díaz Mirón s/n, esq. Plan de San Luís, Col.: Casco de Santo Tomás Miguel Hidalgo, C.P. 11340 Ciudad de México, DF., México. Tel.: +55 57 29 63 00 Ext 62811.

Correo electrónico: gamaliel.benitez@imss.gob.mx (G. Benítez-Arvizu).

KEYWORDS

Mesenchymal stem cells;
Chronic ulcer;
Type 2 diabetes mellitus

Autologous mesenchymal stem cells and cutaneous autograft as a treatment for chronic ulcer secondary to diabetes mellitus 2**Abstract**

Background: Diabetes mellitus 2 has become a global problem. It is estimated that 15% to 25% of patients could develop a chronic ulcer in their life, and nearly 33% of direct care costs of the diabetes mellitus 2 is spent on treating these ulcers. Mesenchymal stem cells have emerged as a promising cell source for the treatment of these ulcers.

Clinical case: The case is presented of a 67 year-old male with a history of diabetes mellitus, acute myocardial infarction, and food ulcer chronic involving right foot and part of his leg. He was treated with mesenchymal stem cell management, resulting in skin graft integration and full coverage of the lesion.

Conclusion: The implementation of mesenchymal stem cell techniques for treatment of chronic ulcer is feasible. The impact on the population would lead to a significant improvement in their quality of life and reduce healthcare spending.

© 2015 Academia Mexicana de Cirugía A.C. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Antecedentes

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) se ha convertido en un problema a nivel mundial. Se estima que para el año 2030 el 70% de los pacientes con este padecimiento se concentrarán en países en vías de desarrollo, y México ocupará en la clasificación internacional el sexto o séptimo lugar¹. Considerando las tendencias actuales y el comportamiento de los pacientes con DM2, las complicaciones derivadas de este padecimiento a largo plazo, entre las que se encuentran nefropatía, retinopatía, enfermedad vascular periférica y neuropatía, representan un verdadero reto a la medicina dada su complejidad^{2,3}. Se estima que entre el 15 y el 25% de los pacientes con DM2 desarrollarán una úlcera crónica a lo largo de su vida, siendo además una población que tiene de 10 a 20 veces más probabilidad de tener una amputación no traumática de algún miembro, comparada con la población que no presenta esta patología⁴⁻⁹. Es indispensable considerar el impacto social de este tipo de lesiones, ya que en promedio una úlcera tiene una duración de entre 12 y 13 meses; cerca del 70% de los pacientes que han padecido una úlcera presentarán por lo menos la formación de otra úlcera a lo largo de su vida, estimando una pérdida de 2 millones de días de trabajo por incapacidad¹⁰. Tan solo en el año 2010, se estimó para México un gasto de \$778,427,475 US Dólar para la atención de la DM2¹¹⁻¹⁷ (\$343,226,541 US Dólar en costos directos y \$435,200,934 US Dólar en indirectos)¹⁸, y cerca del 33% de los costos directos de la atención en DM2¹¹⁻¹⁷ se emplearon en la atención de las úlceras crónicas¹⁹.

Uno de los problemas a los que nos enfrentamos al tratar este tipo de lesiones es la baja probabilidad de éxito, ya que en las mejores condiciones solo el 50% del total de casos remiten, y para el otro 50% de los pacientes las úlceras son una de las principales causas de amputación, con una sobrevivencia estimada del 70% a un año y del 20% a 5 años²⁰. Atendiendo a las características orgánicas que dan origen a las úlceras, como la deficiente perfusión de los tejidos por daño en la microvasculatura^{2,3}, recientemente se han propuesto

tratamientos a base de células o sus productos (terapia celular) con el objeto de mejorar los mecanismos de reparación de la microvasculatura y favorecer la re-epitelización de los mismos²¹. Estas nuevas alternativas proponen un tratamiento a base de células troncales mesenquimales, con la premisa de que estas células producen moduladores tanto de la respuesta inflamatoria como de los factores de crecimiento que favorecen la regeneración tisular^{11,22}.

Las células troncales mesenquimales se originan durante la vida embrionaria en el mesodermo, dando origen al tejido conectivo, hueso, músculo y cartílago. Una vez formado el embrión, quedan reservorios de células troncales en casi todo el organismo; estos se han podido identificar, al igual que su función, a partir de marcadores celulares específicos. Estas células se han aislado en médula ósea, cordón umbilical, tejido adiposo y tejido placentario. Clínicamente está justificada su aplicación en úlceras de diversa etiología, exceptuando las úlceras neoplásicas.

El objetivo de este trabajo es compartir la experiencia que registramos al tratar con células mesenquimales e injerto cutáneo autólogo a un paciente portador de una úlcera crónica secundaria a DM2¹¹⁻¹⁷.

Caso clínico

Paciente masculino de 67 años de edad con antecedente de DM2 de 15 años de evolución, que fue valorado por el servicio de Ortopedia del Hospital General de Puebla por una úlcera crónica (un año de evolución) en miembro pélvico derecho, que se extiende desde la cara interna del pie en su porción plantar que involucra el primero y segundo orfejos, la cara interna de la pierna hasta el tercio medio de esta. El resultado del cultivo de la lesión es *Staphylococcus* sp. y *Escherichia coli* dadas las condiciones de la úlcera y tratándose de un paciente multitratado, se le propuso como opción terapéutica amputación o el empleo de células troncales mesenquimales con injerto mallado autólogo. Tras describir el procedimiento, los riesgos y las probabilidades de mejora de ambos procedimientos, el paciente eligió células

troncales mesenquimales e injerto mallado autólogo, para lo cual otorgó su consentimiento bajo información.

El primer paso consistió en mantener hospitalizado al paciente mientras se controló la infección mediante el empleo de cefalosporinas de tercera generación; se realizó una primera desbridación, como la amputación del primer y segundo orjeos. Se realizaron 4 intervenciones más (con 15 días de diferencia entre cada una de ellas); durante la primera intervención se realizó escarificación de la lesión así como punción de la cresta iliaca para la obtención de 60 ml de médula ósea; para evitar la coagulación de la muestra y el mantenimiento de las células se empleó citrato fosfato dextrosa, la cual se sometió a procesamiento en el Laboratorio de Medicina Regenerativa en coordinación con el Laboratorio de Morfología de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional para la obtención y cultivo de células troncales mesenquimales durante 30 días de cultivo.

Aislamiento de las células troncales mesenquimales

Las células troncales mesenquimales fueron obtenidas del aspirado de médula ósea del ileon con una jeringa de 60 ml con citrato fosfato dextrosa como anticoagulante. En un medio estéril, el aspirado se diluyó 1:2 con una solución de PBS 1X estéril y fue sometido a un gradiente de NycoPrep™ 1.077 g/ml, por 30 min a 1,500 rpm. De la interfase fueron separadas las células mononucleares, las cuales se lavaron en 2 ocasiones con solución PBS 1X, centrifugadas por 10 min a 2,000 rpm y fueron sembradas en cajas de Petri de 25 cm (CORNING) con 5 ml de medio Poietics Human Mesenchymal Stem Cells, a 37°C y 5% de CO₂; suplementado con antibiótico-antimicótico 1X. A los 3 días se realizó un lavado con la solución de citrato fosfato dextrosa 1X para eliminar las células no adherentes y se adicionó medio fresco.

Alcanzada una confluencia celular del 70-80%, las células adherentes fueron despegadas utilizando una solución de tripsina-EDTA (0.025%, GIBCO) incubadas por 10 min a 37°C. Las células se lavaron con PBS y se sembraron a una concentración de 2×10^3 células/ml en cajas Petri de 100 × 20 mm (CORNING), ahora con 10 ml de DMEM/F-12 adicionado con 10% de SFB y antibióticos. Estas células se resembraron hasta un tercer pase para su evaluación de marcadores de membrana por citometría de flujo, y también fue evaluada su plasticidad/diferenciación celular hacia osteoblastos y adipocitos.

La caracterización de las células troncales mesenquimales se realizó evaluando los marcadores de superficie (anti-CD73, anti-CD90 anti-CD105, anti-CD14, anti-HLA-DR, anti-CD13 y anti-CD45) mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos demostraron que nuestras células expresan altos niveles de CD73, CD90, CD105 y CD13. Sin embargo, no expresan marcadores hematopoyéticos como CD45, CD14 y HLA-DR.

La plasticidad celular fue evaluada cultivando las células en presencia de medios diferenciadores específicos, *StemPro Adipocyte Differentiation Basal Medium* y *StemPro Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium* (GIBCO) por 15 días. Los resultados obtenidos indicaron que nuestras células tienen la capacidad de diferenciarse tanto a adipocitos como a osteoblastos.



Figura 1 Área de la lesión involucrada.

Durante la segunda y la tercera intervención se realizó limpieza quirúrgica de la zona, y en la cuarta intervención sobre un lecho limpio se colocaron células troncales mesenquimales autólogas suspendidas en plasma rico en plaquetas, procurando una distribución de 1 millón de células por cm², y posteriormente un injerto cutáneo autólogo de 15 × 10 cm (mallado) tomado de muslo ipsilateral. Se cubrió el injerto con gasas vaselinadas y se manejó con ciprofloxacino 500 mg durante 2 semanas. El paciente fue evaluado semanalmente, documentándose la integración total del injerto 2 semanas después; 6 meses después el paciente apoyó la extremidad, y al año continuó sin presentar complicaciones. La evolución del paciente se muestra en las figuras 1-4.

Cabe mencionar que la preparación de células troncales mesenquimales autólogas a partir de médula ósea se realizó en el Laboratorio de Medicina Regenerativa y Cáncer en coordinación con el Laboratorio de Morfología, ambos de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, cumpliendo con los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT), que incluyen la verificación de identidad por citometría de flujo expresando (positivas) principalmente marcadores CD105, CD73, CD90 y no expresando (negativas) principalmente CD45, CD34, HLA-DR¹², además de verificar por azul tripan una viabilidad celular del 95% y comprobar mediante cultivo la presencia de un preparado libre de contaminación bacteriana, y con la verificación de la morfología celular mediante microscopía simple. Además, como medida de control se tomó una alícuota de las células troncales mesenquimales autólogas empleadas en la lesión, las cuales se lograron recuperar, sembrar y proliferar de nuevo en el laboratorio de Medicina Regenerativa y Cáncer del Instituto Politécnico Nacional, y se verificó que mantenían sus características biológicas (fig. 5).

Discusión

La DM2¹¹⁻¹⁷ y sus complicaciones representan una carga financiera importante para los sistemas de salud a nivel mundial, y México no es la excepción, ya que estará dentro de los primeros lugares en 2030 y la presión económica para la atención de este padecimiento aumenta desmesuradamente^{18,19}. Dentro de las principales complicaciones encontramos las úlceras crónicas, que representan una de las principales causas de amputación por su difícil manejo y tratamiento, que es complejo^{6-10,18-20}. En las últimas 3 décadas el surgimiento de terapias celulares ha permitido plantear otras opciones terapéuticas que han modificado este escenario, a tal grado que actualmente se consideran intervenciones con mejor costo-efectividad^{13,14},

por lo cual se encuentran incluidas en las guías internacionales de manejo de úlceras como, la de la Sociedad de Atención de Heridas¹⁵⁻¹⁷, así como en los protocolos de algunos hospitales, como el Monte Sinaí en Nueva York.

Las células mesenquimales han sido empleadas con éxito en este tipo de lesiones debido a su capacidad de regular los procesos de inflamación y de regenerar el tejido a través de factores como la interleucina-10 y la interleucina-4, además de favorecer la neoformación de vasos por medio del factor de crecimiento vascular, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el reclutamiento de queratinocitos, la señalización para la migración de células troncales nativas y finalmente la remodelación de la lesión a través de la regulación de queratinocitos, y la presencia de factor de crecimiento β y metaloproteinasas²³, elementos clave para la regeneración de los tejidos.



Figura 2 Aplicación de injerto autólogo y células mesenquimales autólogas.



Figura 4 Paciente a los 3 meses.



Figura 3 Evaluación del paciente a los 7 días.

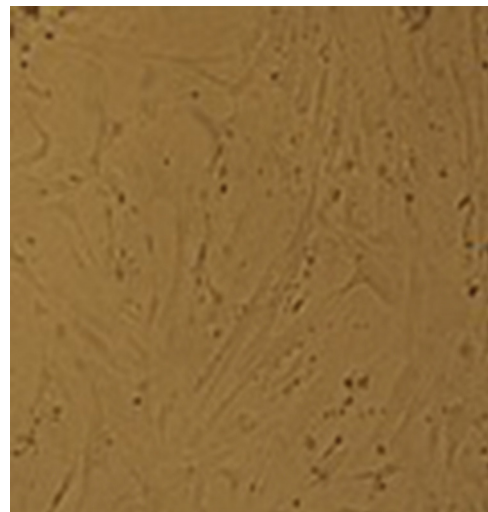


Figura 5 Microscopia de luz de células mesenquimales obtenidas del paciente.

El abordaje transdisciplinario dio como resultado en este paciente el que pudiera preservar su extremidad. El adecuado manejo por parte del equipo medicoquirúrgico del servicio de Ortopedia del Hospital General de Puebla para controlar la infección y limpiar el lecho, así como la obtención de células troncales mesenquimales autólogas por parte del Laboratorio de Medicina Regenerativa y Cáncer, en coordinación con el Laboratorio de Morfología, ambos de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional y con las más altas características de calidad, que permitieron que el paciente integrara el injerto y se cubriera el lecho de la úlcera que bajo otras condiciones tendría que haber sido amputado. El punto más preponderante es la adecuada articulación en cada una de las funciones del equipo transdisciplinario, ya que si alguno no lleva a cabo de manera adecuada su parte, el éxito del tratamiento se ve comprometido.

Este tipo de abordaje transdisciplinario ha permitido tratar pacientes fuera de la terapéutica convencional, permitiendo ofrecerles una opción antes de la amputación.

Conclusión

La implementación de la terapia basada en células —en este caso particular células troncales mesenquimales— es una realidad a nivel mundial, con los consecuentes beneficios a los pacientes y a los sistemas de salud. La implementación de estas técnicas en nuestro medio es factible, y el impacto en la población que se ve afectada por este tipo de padecimientos sería importante, al mejorar su calidad de vida y disminuir los costos de atención de los mismos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Al Dr. Roberto J. Robles Ramirez por su apoyo en los cultivos bacterianos, al Q.F.B. Leonardo Fermín Acevedo Olvera por su apoyo en los cultivos celulares, y al C.P.R. Dr. Gerardo Rayón Nieva por su invaluable colaboración.

Bibliografía

- Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010;87:4–14.
- Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev.* 2013;93:137–88.
- Roberts AC, Porter KE. Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *Diab Vasc Dis Res.* 2013;10:472–82.
- Deshpande AD, Harris-Hayes M, Schootman M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther.* 2008;88:1254–64.
- Reiber GE. The epidemiology of diabetic foot problems. *Diabet Med.* 1996;13 (Suppl 1):S6–11.
- Reiber GE, Boyko EJ, Smith DG. Epidemiology of foot ulcers and amputations in the diabetic foot. En: Bowker JH, Pfeiffer MA, editores. *The Diabetic Foot.* St Louis, Mo: Mosby; 2001. p. 13–32.
- Lavery LA, Armstrong DG, Wunderlich RP, Tredwell J, Boulton AJ. Diabetic foot syndrome: Evaluating the prevalence and incidence of foot pathology in Mexican Americans and non-Hispanic whites from a diabetes disease management cohort. *Diabetes Care.* 2003;26:1435–8.
- Gregg EW, Sorlie P, Paulose-Ram R, Gu Q, Eberhardt MS, Wolz M, et al. Prevalence of lower-extremity disease in the U.S. Adult population ≥ 40 years of age with and without diabetes. 1999–2000 National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care.* 2004;27:1591–7.
- Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA.* 2005;293:217–28.
- Edwards H, Finlayson K, Courtney M, Graves N, Gibb M, Parker C. Health service pathways for patients with chronic leg ulcers: Identifying effective pathways for facilitation of evidence based wound care. *BMC Health Services Research.* 2013;13: 1–10.
- Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: From basic biology to clinical applications. *Gene Therapy.* 2008;15:109–16.
- Dominici M, le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8: 315–7.
- Augustin M, Vanscheidt W. Chronic venous leg ulcers: The future of cell-based therapies. *Lancet.* 2012;380:953–5.
- Kirsner RS, Marston WA, Snyder RJ, Lee TD, Cargill DI, Slade HB. Spray-applied cell therapy with human allogeneic fibroblasts and keratinocytes for the treatment of chronic venous leg ulcers: A phase 2, multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2012;380:977–85.
- Steed DL, Attinger C, Colaizzi T, Crossland M, Franz M, Harkless L, et al. Guidelines for the treatment of diabetic ulcers. *Wound Repair Regen.* 2006;14:680–92.
- Brem H, Jacobs T, Vileikyte L, Weinberger S, Gibber M, Gill K, et al. Wound-healing protocols for diabetic foot and pressure ulcers. *Surg Technol Int.* 2003;11:85–92.
- Kirsner RS, Warriner R, Michela M, Stasik L, Freeman K. Advanced biological therapies for diabetic foot ulcers. *Arch Dermatol.* 2010;146:857–62.
- Arredondo A, de Icaza E. Costos de la diabetes en América Latina: Evidencias del caso mexicano. *Value Health.* 2011;14:S85–8.
- Armstrong DG, Kanda VA, Lavery LA, Marston W, Mills JL Sr, Boulton AJ. Mind the gap: Disparity between research funding and costs of care for diabetic foot ulcers. *Diabetes Care.* 2013;36:1815–7.
- Jeffcoate WJ, Harding KG. Diabetic foot ulcers. *Lancet.* 2003;361:1545–51.
- Rennert RC, Rodrigues M, Wong VW, Duscher D, Hu M, Maan Z, et al. Biological therapies for the treatment of cutaneous wounds: Phase III and launched therapies. *Expert Opin Biol Ther.* 2013;13:1523–41.
- Dabiri G, Heiner D, Falanga V. The emerging use of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of human chronic wounds. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2013;18:405–19.
- Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, LeRoux MA. Concise review. Role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1:142–9.