

---

**Cuantificación de las células  
madre mesenquimales  
autólogas infundidas en el  
tratamiento de pacientes  
diagnosticados de necrosis  
avascular de la cabeza  
del fémur**

---

**David Serrano Simonneau**  
Cristina Pascual Izquierd | Ana Pérez Corral  
J.L. Díez-Martín | Rafael Laguna Aranda  
Manuel Cuervas-Mon Cantón  
Javier Vaquero Martín

**Ayudas a la investigación 2012**

## **Equipo de trabajo:**

### **Investigador Principal:**

**David Serrano Simonneau**

*Servicio de Hematología*

*Hospital General Universitario Gregorio Marañón Madrid*

### **Equipo investigador:**

**Cristina Pascual Izquierdo**

*Servicio de Hematología*

*Hospital General Universitario Gregorio Marañón Madrid*

**Ana Pérez Corral**

*Servicio de Hematología*

*Hospital General Universitario Gregorio Marañón Madrid*

**J.L. Díez-Martín**

*Servicio de Hematología*

*Hospital General Universitario Gregorio Marañón Madrid*

**Rafael Laguna Aranda**

*Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología*

*Hospital General Universitario Gregorio Marañón Madrid*

**Manuel Cuervas-Mon Cantón**

*Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología*

*Hospital General Universitario Gregorio Marañón Madrid*

**Javier Vaquero Martin**

*Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología*

*Hospital General Universitario Gregorio Marañón Madrid*

## AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer muy especialmente el trabajo desarrollado, en este estudio, por **Gloria Fernández Ruano**, técnico especialista de laboratorio, perteneciente al laboratorio de citometría de flujo del servicio de Hematología del HGUGM.

## AUTORES

### **David Serrano Simonneau**

Licenciatura en Medicina y Cirugía en la Univ Complutense de Madrid en 1977, obtuvo el grado de licenciatura con calificación de sobresaliente en 1982, en la Univ. Autónoma de Madrid. Médico especialista en hematología y hemoterapia 1982. Diplomatura en diseño y estadística para la investigación en ciencias de la salud, en la Univ. Autónoma de Barcelona en 1995.

Ha desarrollado su labor asistencial como médico interno rotatorio en H Clínico de S Carlos de Madrid, médico residente de hematología y hemoterapia en la Fundación Jimenez Díaz y como médico adjunto en el Hospital Gral de Albacete y Hospital Gral Univ Gregorio Marañón, donde desarrolla su labor actualmente dedicado fundamentalmente en la atención clínica de los pacientes sometidos a trasplante de progenitores hemopoyéticos.

Profesor colaborador de clases prácticas en la universidad complutense. Trabajos publicados en revistas internacionales 40, y nacionales 17. Comunicaciones a congresos internacionales 140 y nacionales 115. Participación en ponencias, mesas redondas y conferencias nacionales 30 Capítulos de libros 5 Participación en Proyectos de Investigación 12

### **Cristina Pascual Izquierdo**

Licenciatura: Medicina y Cirugía por la Univ Autónoma de Madrid, 1987; Grado de licenciatura con la calificación de Sobresaliente. Médico Especialidad: Hematología y Hemoterapia 1992..

Ha desarrollado su labor asistencial como médico residente de hematología y hemoterapia en el Hospital Ramón y Cajal de Madrid y como médico adjunto en el Hospital Gómez Ulla de Madrid y Hospital Gral Univ Gregorio Marañón, donde desarrolla su labor actualmente en la Sección de Banco de Sangre- Citometría de Flujo y Trasplante hematopoyético.(OPA), dedicada a la obtención, procesamiento y almacenamiento de progenitores hematopoyéticos, incluido el procesamiento de células mesenquimales para la atención clínica de los pacientes sometidos a trasplante de progenitores hemopoyéticos

Profesor colaborador de clases prácticas en la universidad complutense

Trabajos publicados en revistas internacionales y nacionales 19, Comunicaciones a congresos 57 Proyectos de Investigación 6

### **Ana Pérez Corral**

Licenciatura: Medicina y Cirugía por la Univ Complutense de Madrid, 1999; Grado de licenciatura con la calificación de Sobresaliente. Médico Especialidad: Hematología y Hemoterapia 1992..

Ha desarrollado su labor asistencial como médico residente de hematología y hemoterapia en el Hospital Gral Univ Gregorio Marañón de Madrid y como médico adjunto en el mismo hospital, donde desarrolla su labor en las áreas de gestión de Banco de Sangre, sistemas de calidad, laboratorio de citometría de flujo y realización de procedimientos de obtención, manipulación, criopreservación e infusión de células hemopoyéticas para trasplante de médula ósea y terapia celular, incluido el procesamiento de células mesenquimales.

Profesor colaborador de clases prácticas en la universidad complutense

Trabajos publicados en revistas internacionales 5, Comunicaciones a congresos 35

Proyectos de Investigación con participación en 7 proyectos financiados de investigación competitiva dentro del area del trasplante hemopoyético, terapia celular con células mesenquimales, y reconstitución inmune

### **José Luis Díez-Martín**

Licenciatura en Medicina y Cirugía en la Univ de Salamanca 1979, obtuvo el grado de licenciatura con calificación de sobresaliente en 1979, en la misma universidad. Médico especialista en hematología y hemoterapia 1984. Board certificate USA 1986. Médico especialista en hematología clínica por la Postgraduate Mayo Medical School Clinica Mayo USA1988. Doctor cum laude y premio extraordinario, en medicina y cirugía en la Univ Autónoma de Madrid 1982

Ha desarrollado su labor asistencial como médico residente de hematología y hemoterapia en la Clínica Puerta de Hierro de Madrid. Investigador becado en la Clínica Mayo USA 1984. Formación en trasplante medular en Fred Htchinson Cancer Research Center USA 1985. Firts clinical assistant en hematología en la Postgraduate Mayo medical Scholl USA 1986/88. Médico adjunto en el Hospital Clínica Puerta de Hierro, Jefe de sección de trasplante hemopoyetico en el H Gral univ Gregorio Marañón en 1996 y desde 2006 Jefe de servicio de hematología y hemoterapia del mismo hospital., donde desarrolla su labor actualmente dedicado a la gestión y desarrollo de todas las facetas hematológicas y en especial en el trasplante de progenitores hemopoyeticos.

Profesor asociado de la Univ Autonoma de Madrid (1992/95) y Complutense de Madrid. desde 2004.

Trabajos publicados en revistas internacionales 51, y nacionales 40. Comunicaciones a congresos internacionales 160 y nacionales 145. Capítulos de libros 20

Participación en Proyectos de Investigación 15

### **Rafael Laguna Aranda**

Licenciatura en Medicina y Cirugía en la Univ Complutense de Madrid en 1989, Médico especialista en cirugía ortopédica y traumatológica en 1995.

Ha desarrollado su labor asistencial como médico residente de cirugía ortopédica y traumatológica en el Hospital Gral Univ Gregorio Marañón y como médico adjunto en el mismo hospital desde 1996 donde desarrolla su labor fundamentalmente dedicado a la cirugía protésica de cadera y rodilla.

Profesor colaborador de clases prácticas en la universidad complutense. Cursos sobre dolor lumbar, IMAP y agencia Lain Entralgo (2003 y 2004), hombro y codo dolorosos 2004 (Agencia Lain Entralgo)

Trabajos publicados en revistas internacionales 10 y nacionales 4. Comunicaciones a congresos 35 Ponencias y cursos impartidos 11 .Participación en Proyectos de Investigación 1

### **Manuel Cuervas-Mons**

Licenciatura en Medicina y Cirugía en la Univ Autónoma de Madrid en 2009,

Desarrolla su Labor Asistencial como médico residente de cirugía ortopédica y traumatológica en el Hospital Gral Univ Gregorio Marañón desde 2010.

Profesor colaborador de clases prácticas en la universidad complutense. Profesor de Epidemiología y estadística en CTO Madrid desde 2010. Profesor de traumatología en CTO Madrid desde 2014.

Trabajos publicados en revistas nacionales 2. Comunicaciones a congresos 10 Capitulo de libros 1. Participacion en Proyectos de Investigación 1

### **Javier Vaquero Martín**

Licenciatura: Universidad Complutense. Facultad de Medicina.

Doctorado: Universidad de Bologna- Italia (Sobresaliente "cum laude" y Premio Extraordinario "Vittorio Emanuele II")

### **Puesto docente desempeñado**

Categoría: Profesor Titular. Universidad Complutense. Facultad de Medicina. Departamento de Cirugía. -1995

### **Puesto asistencial desempeñado**

Jefe de Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Hospital Universitario Gregorio Marañón. 2006

Trabajos publicados en revistas nacionales: 96 y extranjeras: 45, Capítulos de libros: 41 , Libros publicados: 5. Comunicaciones a cursos y congresos más de 500

### **Premios**

Premio de la Real Academia Nacional de Medicina (Fundación Rodríguez Abaytua) al mejor expediente universitario (1981). Premio Nacional de Investigación de la Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología (SECOT), en cuatro ocasiones (1986, 1990, 1994, 2010)

Premio de la FUNDACION MAPFRE de Investigación Aplicada en Traumatología. Abril 2008.

***Juntas directivas de sociedades y revistas científicas***

Presidente de la Asociación Española de Artroscopia (1999-2001) Secretario General de la SECOT (2009-2010). Director de la Revista "CUADERNOS DE ARTROSCOPIA" (1998-2014)

Director de REVISTA ESPAÑOLA CIRUGIA DE ORTOPEDICA Y TRAUMATOLOGIA (desde OCT 2012 hasta la actualidad)

# Índice

	Página
1. RESUMEN.....	7
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES .....	7
3. OBJETIVOS .....	8
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
5. RESULTADOS .....	9
6. DISCUSIÓN .....	10
7. CONCLUSIONES .....	12
8. BIBLIOGRAFÍA .....	13

## 1. RESUMEN

La necrosis avascular de la cabeza del fémur (NACF) es una enfermedad producida por un déficit del aporte sanguíneo en la parte proximal del fémur, que provoca una destrucción del tejido óseo de la cabeza femoral.

La descompresión quirúrgica de la cabeza femoral, con infusión de concentrado de células madre pluripotenciales (células CD34+) y células madre mesenquimales (CMM), de médula ósea autóloga, ha presentado excelentes resultados en la corrección del daño tisular, sobre todo en fases no avanzadas de lesión ósea.

El potencial osteogénico de las CMM de médula ósea está relacionado directamente con la concentración de éstas. El número de CMM presentes en la médula ósea (MO) es pequeño (aproximadamente 1-3 células por 10.000 a 100.000 células nucleadas medulares) por lo que es necesaria su concentración en el material extraído de la médula ósea. Esta concentración permite infundir suficiente cantidad de células madre con una mínima cantidad del material medular extraído, dadas las dificultades añadidas de espacio donde infundir el material medular.

Existe actualmente un consenso en la literatura acerca del número mínimo aconsejable de células nucleadas totales (CNT) y CMM necesario para tratar la NACF. Se asume que al menos se deben infundir  $2-5 \times 10^8$  de CN y  $5 \times 10^4$  de CMM, siendo éstas extrapoladas a partir de las CNT, células CD34+, y tras los estudios de cultivos celulares del material infundido cuantificando las unidades formadoras de colonias de fibroblastos en el producto concentrado de MO. No hay estudios de citometría de flujo que avalen la cuantificación directa de CMM, debido a la dificultad en estandarizar la técnica de cuantificación de las CMM.

Este estudio tiene como objetivo la cuantificación directa de las CMM de la MO extraída e infundida en los pacientes sometidos a descompresión y aporte de MO. Durante el período del estudio hemos realizado esta cuantificación en cuatro pacientes con cinco procesos de descompresión e infusión celular.

La cuantificación de CNT infundidas, tras su concentración en sistema *Harvest* ha sido de media  $3.95 \times 10^8$ . Este sistema, en nuestros pacientes, ha tenido una capacidad de concentración de las células nucleadas (CN) de 4,7 veces de media. El porcentaje de CD34+ con respecto a las CN se ha mantenido prácticamente estable entre las muestras pre y post concentración 0,21-0,87% y 0,44-0,82% respectivamente. El número de CD34+ ha sido de media 6 veces mayor en el producto final.

Los tres primeros pacientes estudiados presentaron recuentos de CMM indetectables en la médula extraída previa a su concentración. Tras ésta, los niveles de CMM siguen siendo bajos, y representan entre 10 y 100 de CMM por millón de CN. La escasa cantidad celular

cuantificada hace más complicada su identificación como CMM. Tras estos primeros casos se amplió el número de eventos estudiados desde  $2-5 \times 10^5$  hasta los  $3 \times 10^6$ , en las muestras 4 y 5, lo que nos ha permitido detectar y cuantificar mejor este tipo celular, observándose cifras de CMM de 102.000 y 132.000 en la muestra infundida. Este recuento se encuentra por encima del mínimo aconsejable para una buena evolución de los pacientes sometidos a esta técnica de descompresión

A pesar de la escasa casuística de nuestro estudio el método de análisis de CMM con citometría de flujo, alcanzando los 3 millones de eventos en el citómetro de flujo, parece adecuada para demostrar la presencia de estas células tanto en la MO extraída como infundida tras su concentración. El recuento de estas células está dentro de los niveles aceptados como suficientes para una buena evolución de los pacientes diagnosticados de NACF y que han sido sometidos a técnicas quirúrgicas de descompresión y aporte de MO autogénica

## 2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La necrosis avascular de la cabeza del fémur (NACF) es una enfermedad producida por un déficit, o interrupción, del aporte sanguíneo en la parte proximal del fémur, que provoca una destrucción del tejido óseo de la cabeza femoral. Su incidencia, con un elevado porcentaje de pacientes entre la tercera y cuarta década de la vida, y su evolución natural hacia el colapso de la cabeza femoral, hace que el tratamiento óptimo sea un reto para la cirugía traumatológica y ortopédica actuales

Desde el punto de vista etiopatogénico existen dos grandes grupos<sup>1</sup>. Un primer grupo secundarias a traumatismos y un segundo grupo de etiología no bien definida, en el que sin embargo se han encontrado factores claramente asociados como alcoholismo, uso prolongado de esteroides, enfermedad metastásica, radioterapia, estados de hipercoagulabilidad, hiperlipemia, y embarazo.

El diagnóstico se inicia tras la aparición de dolor intenso en la articulación coxofemoral de características mecánicas, a veces también de reposo y nocturno. El cuadro de dolor se acompaña generalmente de rigidez y cojera. Las pruebas de imagen confirman el diagnóstico clínico, siendo de gran importancia el uso de la Resonancia Nuclear Magnética.

El tratamiento tiene múltiples opciones terapéuticas como son: (1) Tratamiento conservador mediante reposo y descarga de la articulación, eficaz en aproximadamente el 25% de los pacientes. (2) Injertos óseos vascularizados, técnica compleja con resultados muy irregulares. (3) Osteotomías, poco aceptada por su agresividad y por

dificultar posibles futuras intervenciones. (4) Artroplastia, al ser una enfermedad diagnosticada generalmente en individuos jóvenes la indicación ha de estar bien contrastada, y la técnica quirúrgica debe ser lo más conservadora posible, ya que probablemente precisará sucesivas intervenciones. (5) Descompresión quirúrgica de la cabeza femoral<sup>2,3</sup>. Es el tratamiento más utilizado sobre todo en fases no avanzadas, cuando menos del 30 % de la cabeza femoral está afectada. Se realiza mediante una perforación hasta la zona lesionada. Se basa en la teoría de que la vascularización se halla comprometida por un aumento de la presión intraósea, a modo de síndrome compartimental.

Más recientemente esta descompresión se ha asociado con el aporte de concentrado de células nucleadas (CN) obtenidas a partir de un aspirado de médula ósea autogénica (MO)<sup>4-8</sup>. Tras la extracción de MO, en el mismo acto quirúrgico, se realiza un concentrado de células madre que se infunde en la zona de la necrosis ósea a través de la perforación realizada en la descompresión<sup>9</sup>. En este concentrado de MO se hallan células madre hematopoyéticas (células que expresan el marcador CD34+, CD "cluster of differentiation") y células madre mesenquimales (CMM). Las CMM pueden generar células osteoinductoras y angiogénicas que reparen la zona de osteonecrosis. Esta técnica es poco agresiva y está obteniendo unos resultados excelentes, con mejoría clínica y retraso en la utilización de artroplastia.

El potencial osteogénico de las CMM de médula ósea está relacionado con la concentración de éstas<sup>10,11</sup>. El número de CMM presentes en MO es pequeño (aproximadamente 1-3 células por 10.000 a 100.000 CN<sup>6</sup>.) por lo que son necesarios sistemas que aumenten la concentración de las células progenitoras (CM) del material extraído de la médula ósea, infundiendo una mínima parte del mismo. Además, la concentración de CMM en MO varía en distintos pacientes, en función de la edad, comorbilidad asociada y de las diferentes etiologías de la NACF<sup>12,13</sup>

Estudios experimentales y la experiencia clínica han avalado el número mínimo aconsejable a infundir de células nucleadas totales (CNT) y CMM para tratar la NACF. Se asume que al menos se deben infundir de  $2-5 \times 10^8$  CNT y  $2,5-5 \times 10^4$  células CMM, en el producto final o concentrado de MO, para asegurar una adecuada respuesta clínica<sup>10</sup>. No hay, sin embargo, estudios de citometría de flujo que hayan realizado una cuantificación directa de CMM en el material medular infundido, siendo éstas extrapoladas a partir de las CNT, CD34+, y tras los recuentos de unidades formadoras de colonias de fibroblastos en cultivos celulares, a los 14 días, del material infundido.<sup>6,8,10,11</sup>

La falta de estudios cuantitativos de las CMM por citometría de flujo reside fundamentalmente en la dificultad para la caracterización de estas CMM y en la estandarización de la técnica de cuantificación de éstas, debido a su escaso número en la MO. De tal manera que este

análisis citométrico no es un estudio de rutina en los servicios de hematología

El propósito del presente estudio ha sido conocer, mediante la citometría de flujo, la cantidad de CMM infundidas en el material medular infundido en la cabeza femoral, en aquellos pacientes diagnosticados de NACF y sometidos a técnicas quirúrgicas de descompresión e implante de MO autóloga. Para ello se ha estandarizado la técnica de identificación y cuantificación, asegurando su sensibilidad, de las CMM por medio de la citometría de flujo.

### 3. OBJETIVOS

El objetivo del estudio es conocer la concentración, mediante técnicas de citometría de flujo multiparamétricas, de las CN, células CD34+ y CMM en el aspirado de MO y concentrado de medular posterior, en los pacientes diagnosticados de NACF que van a ser sometidos a intervención quirúrgica de descompresión e implante de concentrado de MO autóloga.

### 4. MATERIAL Y MÉTODOS

Los pacientes en los que se ha realizado el estudio han sido los procedentes de la consulta del servicio de COT del HGUGM con el diagnóstico de NACF, que han sido tratados con técnicas quirúrgicas de descompresión e implante de MO autóloga, según el protocolo de tratamiento vigente en el servicio de COT del HGUGM.

Durante el primer año del estudio hemos tenido la oportunidad de estudiar cuatro pacientes, dos mujeres y dos hombres, con edades de 31, 39, 45 y 55 años. En los pacientes se han realizado 5 procesos de descompresión (un paciente presentó NACF bilateral precisando doble intervención) así como la obtención de MO autóloga e infusión posterior de un concentrado de MO en las zonas de descompresión. En dos pacientes no se detectó causa etiológica de la NACF (idiopáticas) y otros dos pacientes habían recibido tratamiento esteroideo prolongado,

Se ha seguido en todo momento el protocolo de tratamiento quirúrgico de la NACF vigente en el servicio de COT del HGUGM y que ha sido publicado recientemente<sup>14</sup>. El estudio no ha realizado ningún cambio sustancial en la práctica quirúrgica habitual en este tipo de pacientes. Únicamente se han tomado muestras para el estudio de la MO que se ha extraído de forma habitual en quirófano y del producto de concentrado medular obtenido tras la centrifugación de la misma en quirófano. No se ha visto alterada la cronología de la intervención

quirúrgica puesto que los resultados y su interpretación se han hecho con posterioridad a la misma.

El estudio ha contado con la aprobación del Comité Ético y de Investigación del HGUGM, y se clasificó por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios como “Estudio Observacional No Postautorización (No-EPA).

Los pacientes firmaron el Consentimiento Informado previsto en el protocolo aprobado por el CEIC del HGUGM.

Se han seguido los siguientes pasos en la obtención y procesamiento de las muestra:

Bajo anestesia epidural, se extrajeron entre 60 y 120 cc de médula ósea de la cresta ilíaca y se procesaron en el dispositivo Harvest SmartPReP2® (Harvest Technologies Corp). Dicho sistema centrifuga las bolsas del aspirado medular durante 15 minutos y en un proceso automático obtiene la separación del plasma y la capa leucoplaquetaria. Por cada 60 ml de aspirado de MO se obtienen alrededor de 10 ml de concentrado que son infundidos posteriormente en la zona de necrosis ósea. Este proceso automatizado consigue aproximadamente una concentración celular de 5 a 7 veces superior al aspirado original. Todo el procedimiento se realiza dentro del quirófano y en el mismo acto quirúrgico.

Se procedió a la toma de 3 ml de la médula extraída en un tubo con EDTA (muestra “pre” o muestra nº1) y entre 1-2 ml en EDTA de la médula concentrada (muestra “post” o muestra nº2) para su estudio en citometría de flujo.

En ambas muestras de médula ósea se ha realizado el recuento de las CNT en el contador hematológico LH-700 (Coulter®) tras dilución al 1/10 en líquido isotónico o PBS

En las muestras de médula pre y post-concentración se han identificado y realizado la cuantificación de las células CD34+ y CMM mediante citometría de flujo. Las células CD34+ y CMM se contabilizaron como porcentaje de las CNT conocidas. El estudio de citometría de flujo se ha realizado sobre las muestras de médula ósea con

hematíes lisados después de marcar con los anticuerpos monoclonales conjugados (Beckman Coulter®). Las muestras fueron analizadas en los citómetros de flujo de 4 colores (FC 500; Beckman Coulter®) y en el de 8 colores (Navios, Beckman Coulter®). El número de eventos adquiridos para analizar las células CD34+ fueron de 2-5 x10<sup>5</sup> y para la correcta caracterización de las células mesenquimales han sido necesarios la adquisición de 3 x10<sup>6</sup> de eventos. En los tres primeros pacientes se estandarizó el número de eventos necesarios para la caracterización y posterior cuantificación de las CMM. Inicialmente se estudiaron un número de eventos entre 2,5 y 5 x10<sup>5</sup>. Siendo preciso subir este número hasta 3 x10<sup>6</sup> para aumentar la sensibilidad del estudio, dada la dificultad inherente en la cuantificación de las CMM en MO por su baja concentración medular. Los marcadores monoclonales utilizados han sido: CD34, CD45 y CD133 para la caracterización de las células CD34+. Para la caracterización de las células mesenquimales se han utilizado los anticuerpos monoclonales: CD105, CD90, CD14, CD34, CD45, HLA-DR, CD133. El software de adquisición CXP Beckman Coulter® ha sido utilizado para la adquisición de datos y el software Infinicyt™ (Cytognos S.L.) para el análisis de los datos.

## 5. RESULTADOS

Durante el período del estudio (1 año) se ha realizado la descompresión e infusión de células madre obtenidas de MO autóloga en 4 pacientes diagnosticados de NACF. En uno de ellos la intervención fue bilateral por lo que el estudio global la cuantificación de CMM se ha realizado en cinco muestras de pacientes.

Los resultados obtenidos del estudio de la muestra extraída de MO (muestra nº1) y de la muestra concentrada ( muestra nº2) se muestran en tabla 1.

Tabla 1. Resultados del estudio por citometría de flujo

Paciente	NACF001	NACF002	NACF003	NACF004	NACF005
<b>Volumen muestra 1 (ml)</b>	<b>60</b>	<b>60</b>	<b>60</b>	<b>60</b>	<b>60</b>
CN /ml pre	3.3 x 10 <sup>6</sup>	2.74 x 10 <sup>6</sup>	8.8 x 10 <sup>6</sup>	17 x 10 <sup>6</sup>	9 x 10 <sup>6</sup>
CN Absolutas pre	1,98 x 10 <sup>8</sup>	1,64 x 10 <sup>8</sup>	5,28 x 10 <sup>8</sup>	10,2 x 10 <sup>8</sup>	5,4 x 10 <sup>8</sup>
% CD34+ pre	0.87	0.54	0.61	0.21	0,67
CD34+ total	1,72 x 10 <sup>6</sup>	0,88 x 10 <sup>6</sup>	3,22 x 10 <sup>6</sup>	2,14 x 10 <sup>6</sup>	3,61 x 10 <sup>6</sup>
% CMM pre	0	0	0	0,14	0,10
<b>Volumen muestra 2 (ml)</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
CN / ml post	19,1 x 10 <sup>6</sup>	14,63 x 10 <sup>6</sup>	4,98 x 10 <sup>6</sup>	51 x 10 <sup>6</sup>	33 x 10 <sup>6</sup>
CN Absolutas post	1,91 x 10 <sup>8</sup>	1,46 x 10 <sup>8</sup>	4,98 x 10 <sup>8</sup>	5,1 x 10 <sup>8</sup>	3,3 x 10 <sup>8</sup>
% CD34+ post	0.82	0.44	0.74	0,78	0,67
CD34+ total	1.56 x 10 <sup>6</sup>	0,64 x 10 <sup>6</sup>	3.68 x 10 <sup>6</sup>	3,9 x 10 <sup>6</sup>	2,21 x 10 <sup>6</sup>
% CMM post	0.01	0.001	0.001	0,02	0,04
Nº absoluto	19100	1460	4980	102000	132000

CN: Cel nucleadas. CD34+:Cel pluriptenciales . CMM: Cel madre mesenquimales  
 Muestras1: (Pre): estudio pre concentración. Muestra 2 (Post): estudio post concentración

La cuantificación de CN por mL ha variado, en las muestras extraídas a los pacientes, de  $2,74 \times 10^6$ /mL a  $17 \times 10^6$ /mL, que en cifras absolutas en los 60 cc de MO pre concentración presentaron una media  $5.4 \times 10^8$  y mediana de  $4.9 \times 10^8$  de CNT (extremos de  $1.64 \times 10^8$  y  $10,2 \times 10^8$ ). Tras la concentración en sistema *Harvest* los valores de CNT han sido de media  $3.95 \times 10^8$  y mediana de  $3.30 \times 10^8$  (extremos de  $1,46$  a  $5,1 \times 10^8$ ) lo que demuestra que el sistema *Harvest*, en nuestros pacientes estudiados, tiene una capacidad de concentración de las CNT de 4,7 veces de media y mediana 5,4 (extremos 3 a 6 veces)

El recuento de células CD34+ ha variado de 0,88 a  $3,61 \times 10^6$  en las muestras pre-concentración (media de  $2.31 \times 10^6$  y mediana de  $2,14 \times 10^6$ ) y de 0,64 a  $3,9 \times 10^6$  post-concentración (media de  $2.39 \times 10^6$  y mediana de  $2,21 \times 10^6$ ). El recuento ha sido entre 3,7 y 11 veces mayor en el producto final, con una media de 6,3 y mediana de 5,4 veces la concentración inicial. Además el porcentaje de CD34+ con respecto a las CNT se ha mantenido prácticamente estable entre las muestras pre y post concentración 0,21- 0,87% y 0,44-0,82% respectivamente.

Los tres primeros pacientes estudiados presentaron, como está descrito en la literatura, recuentos de CMM indetectables en la médula extraída previa a su concentración. Tras la concentración, en el dispositivo *Harvest*, los niveles de CMM siguen siendo bajos, pero dentro de los límites previstos, 19.100, 1.460 y 4.980 células totales, respectivamente, que representan con respecto a la cifra de CNT entre 10 y 100 CMM por millón de CN. En cuanto a la relación con las células CD34+ se observó un recuento de CMM entre 457 y 738 veces menor. Este resultado se encuentra, también, entre los límites establecidos como 100 a 1000 veces menor que el obtenido en células CD34+.

Tras estos primeros casos se amplió el número de eventos estudiados desde  $2,5 - 5 \times 10^5$  hasta los  $3 \times 10^6$ , en las muestras 4 y 5, lo que nos ha permitido detectar y cuantificar con mayor sensibilidad este tipo celular. De hecho, la concentración de CMM, en las muestras 4 y 5, fue de 102.000 y 132.000 en la muestra infundida respectivamente, que representa entre 200 y 400 CMM por millón de CN.

## 6. DISCUSIÓN

La necrosis avascular de la cabeza del fémur (NACF) es una enfermedad producida por un déficit del aporte sanguíneo en la parte proximal del fémur, que provoca una destrucción del tejido óseo de la cabeza femoral.

Aunque el tratamiento tiene múltiples opciones terapéuticas, como medidas conservadoras, injertos óseos vascularizados, osteotomías, todas presentan una eficacia controvertida no exenta, en algunos casos, de una gran

complejidad. La evolución hacia el colapso óseo se observa casi en dos tercios de los pacientes a los 5 años, siendo necesaria la artroplastia.

La descompresión quirúrgica de la cabeza femoral<sup>2,3</sup>, se realiza mediante una perforación hasta la zona lesionada con el fin de restaurar la vascularización dañada. Es el método más empleado en fases no avanzadas de lesión ósea, cuando menos del 30 % de la cabeza femoral está afectada. Más recientemente esta descompresión se ha asociado con el aporte de concentrado de CN obtenidas a partir de un aspirado de médula ósea (MO)<sup>4-8</sup>.

En este concentrado de MO se hallan células madre hematopoyéticas y células madre mesenquimales. Las Células Madre (CM) son un tipo especial de células con capacidad de auto-replicación, proliferación y diferenciación hacia el tejido del que provienen y otros tejidos. Entre estas células las más conocidas y aplicadas clínicamente son las células madre hematopoyéticas localizadas en la médula ósea y que expresan el marcador CD34 + en su superficie. Existen, además, en este tejido medular las CMM. Ambas son células indiferenciadas con capacidad para regenerarse y dar lugar a células de tejidos, distintos al hematopoyético, dependiendo del microambiente que las rodee. En los últimos años se ha comprobado que existen CMM con estas mismas características en diferentes tejidos adultos (cartílago, piel, músculo, pulpa dental, grasa<sup>15</sup>) y están siendo utilizadas en medicina regenerativa para la reparación de diversas lesiones tisulares<sup>16,17</sup>.

Las CMM del adulto han sido definidas en cuanto a características biológicas y funcionales. De forma resumida deben ser células que se adhieran a superficies plásticas en cultivos en condiciones estándar. Deben expresar los antígenos de diferenciación tales como CD105, CD73, y CD90 y no deben expresar CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 o CD19, y HLA-DR, característicos de células de estirpe hematológica. Además, deben tener capacidad de diferenciación a osteoblastos, adipocitos y condroblastos in vitro. Su actividad está presente en fenómenos de modulación inmune (como enfermedades autoinmunes, enfermedad del injerto contra receptor post-trasplante de progenitores hemopoyéticos etc), y en la regeneración y reparación tisular.<sup>18-21</sup>

Esta técnica es poco agresiva y está obteniendo unos resultados excelentes, con mejoría clínica y retraso en la utilización de artroplastia.

Gangji y colaboradores (col)<sup>22</sup> observaron en un estudio prospectivo y controlado que sólo el 10% de las NACF tratadas con concentrado de MO autogenico evolucionaron a un estadio clínico avanzado de la lesión femoral (estadio III) frente al 63% del grupo control. En otro estudio publicado por Wang y col<sup>23</sup> en 59 pacientes tratados con descompresión e infusión de MO autóloga observaron la necesidad de realizar una artroplastia en un 13% de los pacientes con un seguimiento de casi 30 meses.

Este tratamiento quirúrgico está siendo ya utilizado en el servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatológica (COT) del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM) de forma habitual. Este servicio ha publicado recientemente sus resultados en 17 pacientes y 22 caderas intervenidas<sup>14</sup>. Los autores recogen en un estudio prospectivo, no controlado y abierto la evolución de 17 pacientes con diagnóstico de NACF. Se excluyeron pacientes de más de 70 años; pacientes con tratamiento previo con citostáticos, alcoholismo activo, radiación previa en pelvis, infección activa, anemia y leucopenia o procesos tumorales activos, en los que presumiblemente la colecta de progenitores podría verse reducida y hacer poco evaluable esta técnica.

En doce pacientes la lesión fue unilateral y en cinco bilateral. La edad media fue de 37,5 años (25-59) y la causa de la NACF fue traumática en 6, secundaria a tratamiento esteroideo en 4 y sin causa conocida en doce caderas. Los autores concluyen que el implante de concentrado de MO reduce la necesidad de artroplastia hasta el 25% de los pacientes a los dos años de seguimiento. Y además la mayoría de los pacientes que precisaron artroplastia presentaban en el diagnóstico inicial una enfermedad avanzada con una afectación superior al 30% de la cabeza femoral. Estos resultados representan una mejoría con respecto a los observados con tratamiento conservador, donde más del 50% precisarán de artroplastia en los dos primeros años de diagnóstico, y son similares a los observados en otros trabajos publicados sobre esta práctica quirúrgica<sup>4,5,22,23</sup>.

El potencial osteogénico de las CMM de médula ósea está relacionado directamente con la concentración de éstas<sup>10,11</sup>. El número de CMM presentes en MO es pequeño (aproximadamente 1-3 células por 10.000 a 100.000 CN medulares<sup>6</sup>) por lo que se han creado sistemas que aumentan la concentración de las células progenitoras (CM) en el material extraído de la médula ósea<sup>9</sup>. Esta concentración permite infundir suficiente cantidad de CM con una mínima cantidad del material medular extraído, dadas las dificultades añadidas de espacio donde infundir el material medular.

El cultivo de CMM podría asegurar el número mínimo necesario de éstas para un tratamiento eficaz<sup>24</sup>. Además, podría permitir la congelación de CMM para poder repetir el proceso quirúrgico si fuera necesario. Este cultivo se debe realizar semanas antes de la cirugía, tras la extracción de pequeñas cantidades de MO. Es un procedimiento complejo y de alto coste, necesitando unidades especiales (salas blancas) donde cumplan las normas GMPs (Good Manufacturing Practices o normas de correcta fabricación).

La zona de extracción de MO debe ser la cresta ilíaca, tal y como se demuestra en el reciente estudio realizado por el servicio de COT del HGUGM<sup>25,26</sup>. Los autores demuestran que la concentración de CN es mayor en cresta ilíaca frente a las observadas en las metafisis de fémur

y tibia (entre 5 y 10 veces superior) y que las cuantificaciones de las CMM, obtenidas en cultivo, son igualmente superiores en la MO de cresta ilíaca (3-7 veces),

Existe actualmente un consenso en la literatura acerca del número mínimo aconsejable de CN y CMM necesario para tratar la NACF. Se asume que al menos se deben infundir  $2-5 \times 10^8$  células nucleadas y  $5 \times 10^4$  células CMM, en el producto final o concentrado de MO, para asegurar una respuesta clínica<sup>6,8,10,11</sup>.

No hay, sin embargo, estudios de citometría de flujo que avalen la cuantificación directa de CMM, siendo éstas extrapoladas a partir de las CNT, CD34+, y tras los estudios de de cultivos celulares del material infundido cuantificando las unidades formadoras de colonias de fibroblastos. La falta de estudios cuantitativos por citometría de flujo de las CMM en el material procesado, reside en la dificultad en estandarizar la técnica de cuantificación de éstas,

En este estudio nos propusimos contestar a la pregunta si era factible la cuantificación de las CMM en el material obtenido medular y post-concentración en el sistema Harvest.

Durante el período del estudio (1 año) hemos realizado la cuantificación de las CMM en cinco procesos de descompresión y aporte de MO, en cuatro pacientes.

La cuantificación de CNT extraídas de MO pre concentración presentó una media  $5.4 \times 10^8$  y mediana de  $4.9 \times 10^8$ . Tras la concentración en sistema *Harvest* estos valores han sido de media  $3.95 \times 10^8$  y mediana de  $3.30 \times 10^8$  lo que muestra que el sistema Harvest, en nuestros pacientes, tiene una capacidad de concentración de las CN en los 10 ml finales de 4,74 veces de media y mediana 5,4. De forma similar, el porcentaje de CD34+ con respecto a las CN se ha mantenido prácticamente estable entre las muestras pre y post concentración 0,21-0,87% y 0,44-0,82% respectivamente. Este recuento ha sido entre 3,7 y 11 veces mayor en el producto final.

Estos resultados confirman la capacidad de concentración de la MO del sistema Harvest permitiendo reducir la cantidad de material a infundir en la zona lesionada y manteniendo un nivel adecuado de células CNT y CD34+.

Los tres primeros pacientes estudiados presentaron, recuentos de CMM indetectables en la médula extraída previa a su concentración. Tras la concentración, en el dispositivo *Harvest*, los niveles de CMM siguen siendo bajos, 19.100, 1.460 y 4.980 células totales, respectivamente, que representan con respecto a la cifra de CN totales entre 10 y 100 CMM por millón de CN. Sin embargo la escasa cantidad celular cuantificada hace más complicada su identificación como CMM. Tras estos primeros casos se amplió el número de eventos estudiados desde  $2-5 \times 10^5$  hasta los  $3 \times 10^6$ , en las muestras 4 y 5, lo que nos ha permitido detectar y cuantificar mejor este

tipo celular. De hecho la concentración de CMM fue de 102.000 y 132.000 en la muestra infundida, claramente por encima del mínimo aconsejable para una buena evolución de los pacientes sometidos a esta técnica de descompresión e infusión de CM de MO

Sólo hemos podido analizar y cuantificar las CMM en cinco caderas sometidas a descompresión e infusión de MO, por lo que nuestros resultados son preliminares. Creemos, sin embargo, que tras la corrección en el número de eventos estudiados en el citómetro, aumentando la sensibilidad de la técnica, nuestros resultados muestran una adecuada cuantificación de las CMM en citometría de flujo. Esperamos seguir con el estudio hasta alcanzar un número más representativo de pacientes donde podamos validar nuestra técnica de identificación y cuantificación de CMM.

En una evaluación final nos proponemos correlacionar los datos biológicos de las muestras de las MO infundidas con las características de los pacientes, edad, etiología de la NACF y evolución clínica tras el procedimiento quirúrgico. Este estudio podría indicarnos el número de CNT, que deberíamos extraer, y que puede ser conocido en el mismo acto quirúrgico, en función de las características de cada paciente, para asegurar una mínima cantidad de CMM infundidas.

## 7. CONCLUSIONES

A pesar de la escasa casuística de nuestro estudio el método de análisis de CMM y CD34+ con citometría de flujo alcanzando los 3 millones de eventos parece adecuada para demostrar la presencia de estas células tanto en la MO extraída como infundida tras su concentración. El recuento de estas células está dentro de los niveles aceptados como suficientes para una buena evolución de los pacientes diagnosticados de NACF y que han sido sometidos a técnicas quirúrgicas de descompresión y aporte de MO autogénica

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Assouline-Dayana Y, Chang C, Greenspan A, Shoenfeld Y, Gershwin ME. Pathogenesis and natural history of osteonecrosis. *Semin Arthritis Rheum* 2002, 32, 94-124
2. Liberman JR. Core decompression for osteonecrosis of hip. *Clin Orthop Rel Res* 2004 418: 29-33
3. Lieberman JR, Conduah A, Urist MR. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with core decompression and human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res* 2004, 429, 139-145
4. Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin Orthop Relat Res*. 2002 Dec;(405):14-23.
5. Gangji V, Hauzeur JP. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am*. 2005 Mar;87 Suppl 1(Pt 1):106-12.
6. Hernigou P, Poignard A, Manicom O, Mathieu G, Rouard H. The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. *J Bone Joint Surg Br*. 2005 Jul;87(7):896-902.
7. Hendrich C, Engelmaier F, Waertel G, Krebs R, Jager M. Safety of autologous bone marrow aspiration concentrate transplantation: Initial experiences in 101 patients. *Orthop Rev* 2009, 1, 99-103.
8. Kumar R, Kumar S, Aggarwal S, Marwaha N, Ram R, Khandelwal N. Early results of core decompression and autologous bone marrow mononuclear cells instillation in femoral head osteonecrosis. *J Arthroplasty* , 2012 27, 679-686
9. Jager M, Jelinek EM, Wess KM, Scharfsstadt A, Jaconsen M, Kevy S et al. Bone marrow concentrate: a novel strategy for bone defect treatment. *Curr Stem Cell Res Ther* 2009, 4,34-43
10. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*. 2005 Jul;87(7):1430-7.
11. Hernigou, Ph.; Mathieu, G ; Poignard, A; Manicom, O . Beaujean, F; Rouard, H Percutaneous Autologous Bone-Marrow Grafting for Nonunions: Surgical Technique *J Bone Joint Surg Am*, 2006 Sep 01;88(1 suppl 2): 322-327
12. Hernigou P, Beaujean F. Abnormalities in the bone marrow of the iliac crest in patients who have osteonecrosis secondary to corticosteroid therapy or alcohol abuse. *J Bone Joint Surg Am*. 1997 Jul;79(7):1047-53.
13. Garvin K, Feschuk C, Sharp JG, Berger A. Does the number or quality of pluripotent bone marrow stem cells decrease with age? *Clin Orthop Relat Res*. 2007 Dec;465:202-7.
14. Cuervas –Mons M, Narbona J, Laguna R, Vaquero J, Implante de concentrado de médula ósea autógeno en el tratamiento de la necrosis isquémica de la cabeza femoral: evolución clínica al segundo año de seguimiento de un estudio prospectivo no controlado. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol* 2013; 57 (2) 106-11022
15. Senzsebé L, Krampera M, Schrezenmeier H, Bourin P, Giordano R. Mesenchymal stem cell for clinical application. *Vox Sanguinis* 2101, 98, 93-107
16. Chanda D, Kumar S, Ponnazhagan S. Therapeutic potencial of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in diseases of skeleton. *J Cell Biochem* 2010, 111, 249-257
17. Pak J. Autologous adipose tissue-derived stem cells induce persistent bone-like tissue in osteonecrotic femoral heads. *Pain Physician* 2012, 15, 75-85
18. M. Dominici; K Le Blanc; I. Mueller; I. Slaper-Cortenbach; Fc Marini; Ds Krause; Rj Deans; A. Keating; Dj Prockop; Em Horwitz. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* (2006) Vol. 8, No. 4, 315- 317.
19. Rust PA, Kalsi P, Briggs TW, Cannon SR, Blunn GW. Will mesenchymal stem cells differentiate into osteoblasts on allograft? *Clin Orthop Relat Res*. 2007 Apr;457:220-6.
20. Mafi P, Hindocha S, Mafi R, Griffin M, Khan WS. Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization. A systematic review of literature. *The Open Orthopaedics Journal*. 2011, 5 (suppl2) 253-260.
21. Rodriguez R, García-Castro J, Trigueros C, Garcia M, Menendez P. Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: Clinical applications and cáncer modelling. In: Lopez-Larrea C, Lopez-Vazquez A, Suareaz-Alvarez B eds. *Stem Cell Transplantation*. Landes bioscience and Spinger Science .2012, 187-205
22. Gangji V, Toungouz M, Hauzeur JR Stem cell therapy for osteonecrosis of femoral head. *Expert Opin Biol Ther* 2005, 5:437-42

23. Wang BL, Sun W, Shi ZC, Zhang NF, Yue DB, Guo WS, et al Treatment of nontraumatic osteonecrosis of the femoral head into the implantation of core decompression and concentrated autologous bone marrow containing mononuclear cells Ach Orthop Trauma Surg. 2010; 130: 859-6512.
24. Zhao D, Cui D, Wang B, Tian F, Guo L, Yang L et al, Treatment of early stage osteonecrosis of femoral head with autologous implantation of bone marrow-derived and cultured mesenchymal stem cells. Bone, 2012, 50, 325-330
25. Narbona FJ, Vaquero J, Fernandez-Santos ME. Concentración de células mononucleares como predictor de la población de células madre mesenquimales en aspirado de médula ósea. Estudio comparativo entre cresta ilíaca, metafisis distal del fémur y metafisis proximal de la tibia. Trauma Find MAPFRE, 2012, 23, 91-96
26. Narbona J, Fernandez.-Santos ME, Suarez I, Vquero J. Comparative evaluation of bone marrow mesenchymal stem cells from illiac cresta and the metaphysic of distal femur and proximal tibia. Journal Orhopaedic Research Submitted