

## Efectos del uso del factor estimulante de colonias granulocíticas en la obtención de células madre en un grupo de pacientes con enfermedad arterial oclusiva crónica

Luz Mabel Ávila Portillo<sup>1,2,3\*</sup>, Benjamín Ospino<sup>2,3</sup>, Carlos A. Franco<sup>2,3</sup>, Francisco Arroyo<sup>2</sup>, Jennifer Ávila<sup>1</sup>, Liliana Pareja<sup>1</sup>, Fabio A. Aristizábal<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Stem Medicina Regenerativa, Calle 113 No. 7-45 TB of. 703, Bogotá, D. C., Colombia. \*Correo electrónico: *mabelavila\_us@yahoo.com*.

<sup>2</sup> Hospital Militar Central, Transv. 3 No. 49-00, Bogotá, D. C., Colombia.

<sup>3</sup> Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, D. C., Colombia.

<sup>4</sup> Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, A. A. 14490, Bogotá, D. C., Colombia. Correo electrónico: *faaristizabal@unal.edu.co*.

Recibido para evaluación: 12 de agosto de 2010.

Aceptado para publicación: 15 de octubre de 2010.

### RESUMEN

Es importante evaluar el perfil del uso del factor estimulante de colonias granulocíticas (FEC-G) en pacientes con enfermedad arterial oclusiva crónica (EAOC), mediante el análisis de aspectos como eficacia y seguridad. Se examinaron los datos obtenidos de la cohorte de pacientes con EAOC que asistían regularmente a la clínica de Cirugía Vasculardel Hospital Militar Central en Bogotá. El protocolo de movilización de células CD34+ hacia sangre periférica consistió en el uso de FEC-Grh a dosis de 600  $\mu\text{g}/\text{día}$  por vía subcutánea (Filgrastim FEC-G 300  $\mu\text{g}$  Roche®), repartido en dos dosis diarias, en forma continua durante cinco días. Al realizar la comparación de valores a partir de hemogramas realizados antes y después de la movilización, se demostró incremento significativo en el número de leucocitos así como en la proporción de neutrófilos y basófilos; mientras que las proporciones de monocitos, eosinófilos y linfocitos disminuyeron significativamente. Con respecto al comportamiento de las células CD34+, no se muestra una diferencia significativa en el comportamiento del CD34+ con la edad, así como tampoco con el índice de masa corporal (IMC). En lo relacionado con el peso y los niveles de CD34+, se observó que los pacientes que

lograron una buena respuesta tenían un peso de 59,7 kg, mientras que los pacientes con regular respuesta, 68,1 kg.

*Palabras clave:* filgrastim, célula hematopoyética, movilización.

## SUMMARY

### Effects of the use of granulocyte colony stimulating factor for obtaining stem cells in a group of patients with chronic occlusive arterial disease

The analyzed aspects such as efficacy and safety are important in the use of Granulocyte Colony Stimulating Factor in patients with chronic occlusive arterial disease were analyzed data from the cohort of patients with EAO that regularly attended the Clinic for Vascular Surgery of the Hospital Militar Central in Bogotá. The protocol for CD34+ cell mobilization into peripheral blood involved the use of FEC-Grh at a dose of 600 mg/day administered subcutaneously (Filgrastim G-CSF 300 µg Roche®) divided into two daily doses, continuously for five days. By comparing the values from blood counts performed before and after mobilization showed increased significant number of leukocytes as well as proportion of neutrophils and basophiles, whereas proportions of monocytes, eosinophils and lymphocytes decreased significantly. About the CD34+ cell behavior, it's not shown significant difference between the behaviors of CD34+ with age, neither the IMC. The analyzed done on the weight and CD34+ levels was observed that patients achieved a good response with a weight of 59.7 kg while 68.1 kg patients with regular response.

*Key words:* filgrastim, hematopoietic cells mobilization.

## INTRODUCCIÓN

El uso de células madre de origen hematopoyético, como estrategia terapéutica para pacientes con enfermedades de origen tumoral y no tumoral, ha aumentado en forma significativa durante la última década (1); razón por la cual es necesario profundizar el conocimiento de la técnica para su obtención. El objetivo final de la técnica para utilizar, es lograr el mayor número de células posibles con los menores efectos secundarios a corto y largo plazo para el donante (2). La mayoría de métodos empleados en la obtención de células madre utilizan factores estimulantes de colonias de origen

recombinante, en especial para llevar a cabo dicha movilización a partir de donantes sanos para trasplante alogénico (3, 4); sin embargo, la experiencia publicada es escasa respecto a su uso para movilizar células madre para trasplante autólogo en pacientes sin patología neoplásica (5).

El factor estimulante de colonias granulocíticas de origen recombinante (FEC-Grh), es un medicamento utilizado en la movilización de células madre hematopoyéticas CD34+ con efecto sobre su diferenciación a línea mieloide, acompañado de pérdida de las moléculas de adhesión que permiten su movilización desde la médula ósea a sangre periférica (6); lo que justifica ante el clínico su empleo tanto en pacientes con neutropenia posquimioterapia como para la obtención de células madre hematopoyéticas en los programas de trasplante tanto autólogo como alogénico.

El éxito en el proceso de movilización depende de diferentes factores, como los relacionados con el paciente (edad, peso, patologías de base) y las citoquinas usadas dentro de las cuales el FEC-Grh es la más usada para inducir movilización de células madre; otros factores relacionados con el medicamento, serían el tipo de molécula a utilizar, dosificación (7) y duración de la administración (8).

Gracias al auge del uso de células madre para el tratamiento de diversas patologías como enfermedad arterial isquémica (9, 10), cobra vital importancia la identificación de características clínicas específicas que puedan asociarse al tipo de respuesta alcanzada en la movilización celular, así como las posibles complicaciones que puedan presentarse con el uso de FEC-Grh en pacientes con patologías de base de origen no neoplásico; razón por la cual decidimos analizar la respuesta de pacientes con enfermedad arterial oclusiva crónica (EAOC), candidatos a trasplante de células madre como angiogénesis terapéutica, sometidos a nuestro protocolo de movilización y obtención de células madre usando FEC-Grh recombinante.

## PACIENTES Y MÉTODOS

Se analizaron los datos obtenidos de la cohorte de pacientes con EAOC que asistían regularmente a la Clínica de Cirugía Vascular del Hospital Militar Central en Bogotá, durante el período comprendido de enero a junio de 2008; todos mayores de 18 años con EAOC severa y claudicación intermitente (Fontaine IIb y III), candidatos a angiogénesis terapéutica, excluyéndose del estudio quienes tuvieran evidencia de infección por HIV, hepatitis B, hepatitis C y con VDRL positivo o como contraindicación enfermedad cardiovascular o pulmonar severa o descompensada. Ningún paciente cumplía

criterio de revascularización quirúrgica definida por ausencia de lechos distales y todos aceptaron participar en el estudio previa firma del consentimiento informado. Las características de los 18 pacientes seleccionados se observan en la tabla 1.

Tabla 1. Características clínicas basales de los pacientes llevados a trasplante de células madre.

n	18
Edad (años)	67,4 ± 10,3
Género masculino	13
Género femenino	5
Hipertensión arterial	8
Diabetes mellitus	7
Tabaquismo	2
Intervención quirúrgica vascular previa	5
Amputación previa	4

### Protocolo de movilización

El protocolo de movilización de células CD34+ hacia sangre periférica consistió en la administración vía subcutánea de FEC-Grh (Filgrastim FEC-G 300 µg Roche®), a dosis de 600 µg/día, repartido en dos dosis diarias y en forma continua durante cinco días. Si la cifra de células CD34+ en sangre periférica al quinto día era adecuada (mayor a 40 células CD34+/µL), se procedía al inicio de la aféresis o de lo contrario, si no se alcanzaba este valor, se continuaba con la estimulación, a igual dosis, verificando mediante cartometría de flujo el número de CD34+ en sangre periférica hasta proceder a la extracción periférica. Finalmente, si el paciente no alcanzaba el conteo de células CD34+ en sangre periférica adecuado para iniciar la extracción en el séptimo día, se optaba por aspiración de médula ósea.

### Recuento de células

El recuento de células CD34+ en sangre periférica (tubo con EDTA) se realizó por citometría de flujo, siguiendo el protocolo de la International Society for Hemotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) (11), que lleva a cabo el recuento de células CD34+ mediante un dispersograma SS/CD34 PE realizado sobre la selección previa de células positivas para CD45 FITC (BD Biosciences), usando el citómetro FACScan (Beckton Dickinson) y el programa CellQuest Pro® para análisis de citometría de

flujo (Beckton Dickinson). Adicionalmente se realizó cuadro hemático basal, durante la movilización y previo a la extracción, para tener control del nivel celular al administrar el FEC-Grh.

La información obtenida se analizó en el programa de estadística SPSS versión 11.05, previa depuración y crítica de datos para detección de inconsistencias y posibles errores en la información. Para el análisis univariable se obtuvieron media, mediana, desviación estándar, valores mínimos y máximos, así como frecuencias y proporciones donde fuese necesario. De acuerdo con la distribución de los datos, se practicaron pruebas U de Mann-Whitney y rangos pareados de Wilcoxon para valorar las diferencias intragrupo entre los momentos de premovilización y movilización. Considerando diferencias estadísticamente significativas con valores de  $p < 0,05$ . Para el análisis de correlaciones lineales se utilizó el índice de correlación de Spearman.

## RESULTADOS

### Efecto sobre los parámetros del hemograma

Al efectuar la comparación de valores a partir de hemogramas realizados antes y después de la movilización, se demostró un incremento significativo en el número de células blancas con un aumento en la proporción de neutrófilos y basófilos, pero el porcentaje de monocitos, eosinófilos y linfocitos disminuyó significativamente (véase tabla 2).

Tabla 2. Comparación de parámetros hematológicos pre y posmovilización.

Parámetro hematológico	Premovilización Media (DE)	Posmovilización Media (DE)	<i>p</i>
Recuento leucocitario $\times 10^3$ cel/mL	14,84 (10,9)	31,35 (13,4)	0,015
Porcentaje de neutrófilos	69,56 (11,3)	82,22 (4,3)	0,008
Porcentaje de linfocitos	19,18 (7,7)	10,56 (4,1)	0,017
Porcentaje de monocitos	5,19 (1,3)	3,39 (0,6)	0,008
Porcentaje de eosinófilos	2,84 (2,6)	1,85 (1,0)	0,042
Porcentaje de basófilos	0,43 (0,2)	0,52 (0,2)	0,020
Recuento eritrocitario $\times 10^5$	5,1247 (0,7)	5,1440 (0,66)	0,575
Recuento plaquetario $\times 10^3$	300,29 (109,1)	245,00 (89,08)	0,011

### Valoración por citometría de flujo de la movilización celular

Mediante citometría de flujo, se valoró el estado hematológico de los pacientes a partir del cuarto día de movilización, referente al comportamiento de las células CD34+, y se obtuvo un  $32,9 \pm 33$  células/ $\mu\text{L}$  el día 4 y  $63 \pm 64$  células/ $\mu\text{L}$  el día 5 posmovilización.

### Extracción de células progenitoras hematopoyéticas movilizadas

Los procedimientos utilizados para la extracción celular se eligieron de acuerdo con la respuesta a la estimulación con FEC-Grh, encontrándose que once pacientes fueron sometidos a aféresis mientras que siete se sometieron a extracción de médula ósea. Los pacientes que al quinto día presentaron menos de 10 células CD34+/ $\mu\text{L}$  se llevaron a extracción por médula ósea, y quienes tenían más de 10 células CD34+/ $\mu\text{L}$  se continuaba la movilización hasta el séptimo día, de manera que se pudiese obtener más de 40 células CD34+/ $\mu\text{L}$ ; finalmente, once paciente fueron sometidos al procedimiento de aféresis y siete por extracción de médula ósea.

Al comparar, el volumen obtenido y el conteo de células mononucleares, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la técnica de obtención (“aféresis” frente a “extracción de médula ósea”).

### Correlación del comportamiento de CD34+ con género, edad, peso e índice de masa corporal durante la movilización

Al agrupar a los pacientes con comportamiento similar frente a la estimulación realizada se identificaron dos grupos, clasificados en pacientes con respuesta buena y con respuesta regular de acuerdo con el número de células CD34+/ $\mu\text{L}$  en los días 4 y 5, peso, edad e índice de masa corporal obtenidos:

1. Respondedores buenos:  $n = 11$ , con una edad promedio de  $67,2 \pm 11,7$  años, peso de  $59,7 \pm 6,9$  kg e índice de masa corporal de  $22,98 \pm 2,76$ . El conteo de CD34+ al quinto día de estimulación fue de  $101,3 \pm 62,26$  células CD34+/ $\mu\text{L}$ .
2. Respondedores regulares:  $n = 7$ , con una edad promedio de  $67,6 \pm 10,6$  años, peso de  $68,1 \pm 7,6$  kg e índice de masa corporal de  $25,66 \pm 2,66$ . El conteo de CD34+ al quinto día de estimulación fue de  $15,47 \pm 10,65$  células CD34+/ $\mu\text{L}$ .

Al evaluar la relación entre variables clínicas y la respuesta en la movilización, no se encontraron diferencias significativas entre los buenos y regulares movilizadores respecto a la edad  $67,2 \pm 11,7$  frente a  $67,6 \pm 10,6$  años, pero sí respecto al peso  $59,7 \pm 6,9$  kg frente a  $68,1 \pm 7,6$  kg,  $p = 0,027$ . Se encontraron índices de correlación significativos entre el número de células CD34+ obtenidas y edad; además, se demostró correlación

negativa entre el peso del paciente y el número de células obtenidas independientemente de la respuesta. Sin embargo, al realizar el análisis con el índice de masa corporal, no se encontró correlación con el número de células CD34+, obteniéndose una  $p = 0,339$ .

### Efectos adversos

Como complemento al análisis del comportamiento de las líneas celulares y la movilización debida al suministro de FEC-Grh, se analizó la frecuencia de efectos adversos presentados por los pacientes durante el proceso de estimulación y movilización. En cuatro pacientes se reportaron en forma individual efectos clasificados como no severos, entre ellos disnea, náusea y vómito, los cuales no fueron relacionados a la patología base del paciente.

En cuanto a la tolerancia al tratamiento con Filgrastim (FEC-Grh), todos los pacientes pudieron completar el programa de movilización planificado. En muchas investigaciones realizadas se han reportado efectos adversos al FEC-Grh. Stroncek *et al.* (4) reportaron que la administración FEC-Grh en dosis de 2 a 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  en individuos sanos causa efectos adversos como fatiga (14%), náuseas y vómito (12%), dolor de cabeza (39%), dolor en los huesos (83%) y dolor de cuerpo (23%).

## DISCUSIÓN

La modificación del microambiente de la médula ósea por el FEC-Grh facilita la salida de las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) a sangre periférica (12). El número de células CD34+ movilizadas se incrementó de  $32,92 \pm 33,01$  células/ $\mu\text{L}$  a  $63,05 \pm 64,13$  células/ $\mu\text{L}$  en el día 4 y 5, respectivamente. En otras investigaciones se utilizó una dosis total media de FEC-Grh de 78  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , obteniéndose una media de 43,9 células CD34+/ $\mu\text{L}$  (13).

Tal como se esperaba, la línea de glóbulos rojos no presentó variación significativa en el número entre premovilización y durante la movilización al arrojar un valor de  $p$  por encima de 0,05; mientras que el número de plaquetas disminuyó significativamente en la movilización al compararse con la premovilización.

Al agrupar a los pacientes con comportamiento similar frente a la estimulación realizada se identificaron dos grupos:

El análisis por grupos de respuesta demostró que el grupo de respondedores buenos movilizaron con la dosis estándar preestablecida que era de 8 a 16  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  de FEC-Grh, logrando altos recuentos de CD34+ al quinto día. El grupo de movilización regu-

lar, por el contrario, requiere de dosis superiores de FEC-Grh. Como característica relevante en el grupo de movilizadores regulares, se puede señalar el peso promedio que es mayor al del otro grupo ( $68,1 \pm 7,6$  kg). En otros estudios, se ha reportado que algunos pacientes mayores de 50 años muestran una movilización dificultosa de  $13,4$  células/ $\mu$ L (13); sin embargo, en esta investigación se logró una buena movilización de CPH al obtenerse un promedio de  $63,05$  células/ $\mu$ L al quinto día.

La cantidad total de glóbulos blancos, y como era de esperarse, se incrementó tras la administración de FEC-Grh, debido a que las células granulocíticas (neutrófilos y basófilos) tienen receptores específicos para el FEC-G, lo que produjo un aumento en su cifra, resultando en valores previos a la estimulación de  $14,84 \pm 10,91\%$  de WBC y de  $31,35 \pm 13,41\%$  posestimulación.

La dosis empleada normalmente para la movilización es de  $8-12$   $\mu$ g/kg/día; mientras que la dosis utilizada en este estudio fue efectiva para generar una buena migración celular en aquellos pacientes que se encontraban dentro del rango de peso requerido por la cantidad de medicamento utilizado.

En cuanto a la tolerancia al tratamiento con Filgrastim (FEC-Grh), todos los pacientes pudieron completar el programa de movilización planificado. En muchas investigaciones realizadas se reportaron efectos adversos al FEC-Grh. Stroncek *et al.* (4) indicaron que la administración de FEC-Grh en dosis de  $2$  a  $10$   $\mu$ g/kg/día en individuos sanos causa efectos adversos como fatiga (14%), náuseas y vómito (12%), dolor de cabeza (39%), dolor en los huesos (83%) y en el cuerpo (23%). En este estudio, de los 16 pacientes que se encuestaron, 25% presentaron efectos adversos, con mayor frecuencia disnea, náuseas y vómito, que no estaban asociados a la patología base de los pacientes incluidos en el estudio.

El estudio sugiere que la movilización con dosis de  $600$   $\mu$ g/día de FEC-Grh, en adultos mayores, permite obtener un número adecuado de progenitores, aun en aquellos casos con una marcada variación del peso como se comprobó con los dos grupos analizados.

La edad en este caso no se consideró como una variable limitante para lograr una movilización adecuada. Los pacientes no tenían en su historia clínica dosis de quimioterapia, la cual está reportada (14) que puede modificar la respuesta del estímulo del FEC-Grh frente a la movilización de células CD34+.

De igual forma, los efectos adversos presentados no fueron alterantes importantes en la fisiología y en el estado de salud de los pacientes; por lo que sugerimos que usar las dosis suministradas en este estudio, permitiría una adecuada movilización con efectos secundarios menores.

Los pacientes que se clasificaron dentro del grupo de movilizadores regulares presentaron pesos por encima de la media establecida, lo que hace pensar si un aumento en la concentración de FEC-Grh proporcionaría una mejor migración celular o si existe algún otro factor no identificado en este estudio que impidió una adecuada movilización.

En conclusión, este estudio muestra evidencias descriptivas del comportamiento de las células CD34+ en respuesta al proceso de estimulación en pacientes con EAOC seleccionadas para terapia celular. En los grupos que lograron una buena y regular movilización, no se muestra una diferencia significativa entre el comportamiento del CD34+ con la edad, ni con el índice de masa corporal. En lo relacionado con el peso y los niveles de CD34+, se observó que los pacientes que lograron una buena respuesta tenían un peso de 59,7 kg, mientras que los pacientes con regular respuesta, 68,1 kg.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece a todos los pacientes que de forma desinteresada participaron en este estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

1. O. Arslan, R. Moog, Mobilization of peripheral blood stem cells, *Transfus. Apher. Sci.*, **37**, 179 (2007).
2. P. Anderlini, M. Korbling, D. Dale *et al.*, Allogeneic blood stem cell transplantation: Considerations for donors, *Blood*, **90**, 903 (1997).
3. A.P. Grigg, A.W. Roberts, H. Raunow *et al.*, Optimizing dose and scheduling of filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor) for mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells in normal volunteers, *Blood*, **86**, 4437 (1995).
4. D.F. Stroncek, M.E. Clay, M.L. Petzoldt *et al.*, Treatment of normal individuals with granulocyte-colony-stimulating factor: Donor experiences and the effects on peripheral blood CD34+ cell counts and on the collection of peripheral blood stem cells, *Transfusion*, **36**, 601 (1996).

5. A. Archundia, J.L. Aceves, M. López-Hernández *et al.*, Direct cardiac injection of G-CSF mobilized bone-marrow stem-cells improves ventricular function in old myocardial infarction, *Life Sci.*, **78**, 279 (2005).
6. S. Slowman, C. Danielson, V. Graves, Administration of GM-/G-CSF prior to bone marrow harvest increases collection of CD34+ cells, *Prog. Clin. Biol. Res.*, **389**, 363 (1994).
7. M. Hoglund, B. Smedmyr, B. Simonsson, T. Totterman, M. Bengtsson, Dose-dependent mobilisation of haematopoietic progenitor cells in healthy volunteers receiving glycosylated rHuG-CSF, *Bone Marrow Transplant*, **18**, 19 (1996).
8. C. Arbona, F. Prosper, I. Benet, F. Mena, C. Solano, J. García-Conde, Comparison between once a day vs twice a day G-CSF for mobilization of peripheral blood progenitor cells (PBPC) in normal donors for allogeneic PBPC transplantation, *Bone Marrow Transplant*, **22**, 39 (1998).
9. Q. Xu, Progenitor cells in vascular repair, *Curr. Opin. Lipidol.*, **18**, 534 (2007).
10. Q.B. Xu, X. Wang, Updates on atherogenesis: The stem/progenitor cells hypothesis, *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, **36**, 793 (2007).
11. D.R. Sutherland, A. Keating, The CD34 antigen: Structure, biology and potential clinical applications, *J. Hematother.*, **1**, 115 (1992).
12. F. Liu, J. Poursine-Laurent, D.C. Link, Expression of G-CFS receptor on hematopoietic progenitor cells is not required for their mobilization by G-CSF, *Blood*, **95**, 3025 (2000).
13. R. Gabús, G. Borelli, E. Citrin, R. Álvarez, E. Bodega, Evaluación de la movilización de células progenitoras hematopoyéticas para trasplante autólogo en hemopatías malignas y tumores sólidos con Filgen JP (Filgrastim Clausen), *Bio-medicina*, **2**, 206 (2006).
14. F.A. Holmes, S.E. Jones, J. O'Shaughnessy *et al.*, Comparable efficacy and safety profiles of once-per-cycle pegfilgrastim and daily-injection filgrastim in chemotherapy-induced neutropenia: A multicenter dose-finding study in women with breast cancer, *Ann. Oncol.*, **13**, 903 (2002).