

Células madre: Una alternativa prometedora para el tratamiento de las fístulas perianales

Pablo Piccinini¹, Mateo Santillán², Leonardo Ugartemendia³, Augusto Carrie², Nicolás Avellaneda^{1,2}

Departamento de Cirugía, CEMIC. Buenos Aires, Argentina

¹ Médico Cirujano. Unidad de Patología Orificial

² Médico Cirujano. Servicio de Cirugía General

³ Especialista en Biotecnología Bioquímica Farmacéutica. Laboratorio EterCell de Biomedicina Eternity

RESUMEN

Presentamos dos pacientes con fístulas anales transesfinterianas en los que se combinó un tratamiento de ablación con láser con la aplicación de células madre derivadas de adipocitos liofilizadas. Se describe la técnica quirúrgica utilizada y el método de obtención y expansión de las células madre autólogas obtenidas. Se pudo lograr una acelerada cicatrización y bajo nivel de dolor posoperatorio. Proponemos la necesidad de continuar con esta línea de investigación.

Palabras clave: fístula anal, células madre mesenquimáticas, células madre derivadas de adipocitos

ABSTRACT

We present two patients with transsphincteric anal fistulas in whom laser ablation treatment was combined with the application of lyophilized adipose-derived stem cells. The surgical technique used and the method of obtaining and expanding the autologous stem cells obtained are described. Accelerated healing and a low level of postoperative pain were achieved. We propose the need to continue with this line of research.

Keywords: Anal fistula; Mesenchymal stem cells; Adipose-derived stem cells

INTRODUCCIÓN

En la última década, a la par de los avances y descubrimientos en el campo de la biomedicina, han surgido numerosas alternativas para el tratamiento de las fístulas anales que buscan mejorar la calidad de vida del paciente reduciendo el dolor postoperatorio, el tiempo de tratamiento y las tasas de recidiva e incontinencia.¹

Las células madre pluripotenciales han sido objeto de investigación en los últimos años, sobre todo en el campo del tratamiento de heridas de difícil cicatrización, como también en otras áreas de la medicina.² Las células madre mesenquimáticas (MSCs, por su sigla en inglés) derivan de una variedad de tejidos, incluida la médula ósea y el tejido adiposo (ADSCs, por su sigla en inglés). Existen dos técnicas principales para la aplicación de las ADSCs: ADSCs liofilizadas y autotrasplante de células madre derivadas del tejido adiposo fresco centrifugado.

La aplicación de células madre sobre el tejido cicatrizal se basa en la regeneración y migración de la microvasculatura debido a su acción angiogénica, tanto por diferenciación en tejido endotelial,³ como por secreción de factores proangiogénicos como el VEGF-A.⁴ Las células madre favorecen

la cicatrización promoviendo la acción de los queratinocitos y fibroblastos.⁵ Además, se observa una inmunomodulación que favorece la creación del medio propicio para una cicatrización adecuada.

El objetivo de este trabajo es presentar dos pacientes con fístulas anales transesfinterianas criptoglandulares en los que se utilizó la técnica de inyección de ADSC liofilizadas como complemento al tratamiento láser estándar y analizar sus resultados.

CASOS

Se analizaron en forma retrospectiva dos pacientes con fístula transesfinteriana a nivel medio, tratados con fotocoagulación láser, a los que se les realizó en forma complementaria la aplicación de células madre en un hospital universitario de Buenos Aires, Argentina.

Paciente 1: Sexo femenino, 82 años, con antecedentes de tabaquismo severo, EPOC, cirugía hemorroidal hace 25 años con estenosis posoperatoria y posterior anoplastia. En contexto de abscesos perianales a repetición con drenaje espontáneo, fue

Los autores declaran ausencia de conflictos de interés. **Mateo Santillán:** msantillan@cemic.edu.ar

Fecha recepción: 21/1/2024 Fecha aprobación: 25/8/2024

Piccinini Pablo: <https://orcid.org/0000-0001-6866-942X>; Santillán Mateo: <https://orcid.org/0000-0002-9663-8601>; Leonardo Ugartemendia: <https://orcid.org/0009-0002-0945-1302>;

Carrie Augusto: <https://orcid.org/0000-0003-4226-7240>; Avellaneda Nicolás: <https://orcid.org/0000-0002-6802-7125>

estudiada con una ecografía endorrectal de 360° que mostró un trayecto fistuloso transesfinteriano único a nivel medio, con orificio externo e interno en hora siete. El esfínter se encontraba normotónico, sin clínica de incontinencia fecal.

Paciente 2: Sexo masculino, 52 años de edad, con antecedentes de sobrepeso y hernia de disco. Concorre al consultorio por presentar secreción purulenta espontánea. En la ecografía endoanal 360° se evidencia fístula transesfinteriana de trayecto único a nivel medio, con orificio interno y externo en hora 6. El paciente no presentaba tratamientos previos. El esfínter se encontraba normotónico, sin clínica de incontinencia fecal.

Ambos pacientes firmaron un consentimiento informado previo al procedimiento explicando la naturaleza del mismo y los potenciales riesgos.

Los pacientes fueron evaluados a los 7 y 21 días del postoperatorio y posteriormente a los 2, 4 y 12 meses.

El método de obtención de las células mesenquimales se detalla a continuación

Recolección del tejido adiposo

El material de partida utilizado fue 3 cc de tejido adiposo y 90 cc de sangre entera con anticoagulante. Las muestras de tejido adiposo fueron obtenidas por abdominoplastía y la sangre por punción venosa en tubos con citrato de sodio. Las muestras del abdomen fueron tomadas bajo anestesia local por dos cirujanos especializados en esta técnica. El sitio donante se infiltró previamente con 5 ml de lidocaína al 2% y 5 ml de bupivacaína al 0,2% con epinefrina y se dejó durante actuar por 3 minutos. Las muestras se obtuvieron utilizando bisturí frío y posterior hemostasia del lecho cruento con electrobisturí. ueron recolectadas en tubos tipo falcon estériles con medio acondicionado para tal fin. con 1% de antibióticos (Penicilina y Estreptomina).

Aislamiento y cultivo de células madre

Las muestras de tejido adiposo obtenidas se lavaron con PBS suplementado con 1% de antibióticos (100 µU/ml de Penicilina y 100 µg/ml de Estreptomina), hasta que se eliminó la sangre remanente. Se procedió a la digestión con una solución de colagenasa con homogenización constante. La suspensión celular se purificó con filtros de 100 µm, el contenido se llevó a volumen con PBS con 1% PE, para luego ser centrifugado. La fase oleosa y acuosa presente en el tubo se descartó por volcado. Al botón celular obtenido en este punto se lo denomina Fracción Vascular Estromal (FVE). Está compuesto principalmente por ADSCs, células endoteliales, fibroblastos, macrófagos, pericitos y preadipocitos.

La FVE se resuspendió en medio de cultivo con factores de crecimiento concentrados y puros obtenidos del concentrado de plaquetas del propio paciente y 1% de PE. Se utilizó antibióticos en el cultivo primario, dado que no se observó y se constató ausencia microbiológica. Transcurridas 24 h, las células comenzaron a adherirse y extenderse por la superficie de la botella de cultivo, llegando a las 48 h la formación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Luego de las 72 h, se observaron nuevamente bajo microscopio invertido con contraste de fase, se enjuagaron con PBS y se le agregó medio de cultivo y factores de crecimiento frescos. Los factores de crecimiento concentrados y puros se obtienen luego de centrifugar suavemente la sangre entera anticoagulada con citrato por 15 minutos. A continuación, se congela a -20°C por 2 h, tras tres ciclos de criolisis e incubación se procede a centrifugar 30 minutos a 3000 RPM.

Pasajes celulares

Cuando las células alcanzaron una confluencia mayor al 80% en la botella T75, se hizo el primer pasaje, que consta en levantar las células y pasarlas a una mayor superficie; fueron pasadas a tres botellas T175. A los 3 días, cuando llegaron a una confluencia mayor al 80%, se repitió el mismo procedimiento para hacer la expansión final. Se tomaron alícuotas de las diferentes suspensiones celulares para hacer conteo y lectura de viabilidad por el método de exclusión con azul de tripan en los diferentes pasajes.

Conteo celular

Para realizar el conteo de las células se utilizó el método de exclusión con azul de tripan.

Se realizó conteo de la FVE y luego cada vez que se efectuaron pasajes de las células (Tabla 1).

Tabla 1. Características del cultivo de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

Conteo Celular	Día 0: 400,000 en FVE. Día 12: 4,5 x 10 ⁶ Células mesenquimales. Día 21: 120 x 10 ⁶ Células mesenquimales.
Densidad celular de siembra	δci: 5,3 x 10 ³ Células mesenquimales / cm ² δc1er Cultivo: 8,57 x 10 ³ Células mesenquimales / cm ² δc2do Cultivo: 2,38 x 10 ³ Células mesenquimales / cm ²
Concentración Celular	[c]i: 4 x 10 ⁴ Células/ml [c]1er Cultivo: 1 x 10 ⁵ Células/ml [c]2do Cultivo: 2,77 x 10 ⁴ Células/ml
Velocidad específica de crecimiento máxima	µmax (cultivo 1rio): 0,0144 µmax (1er pasaje): 0,0198 µmax (2do pasaje): 0,0224

La observación de los cultivos a diario en microscopio invertido con contraste de fase nos permitió ver y registrar el tiempo de pegado de las células mesenquimales, la formación de las UFC, observar su forma característica fibroblastoide (forma de huso, alargado) y además controlar que el cultivo esté libre de contaminación microbiológica

Análisis inmunofenotípico

Se marcaron las células usando anticuerpos específicos, para lo cual se incubaron con un panel de estudios monoclonales conjugados con CD90 (FITC), CD105 (PE), CD34 (PerCP-Cy5.5), CD73 (APC), HLA-DR (V450), CD45 (V500) y se usaron anticuerpos de control isotipo. Se adquirieron en un citómetro de flujo FacsCanto II de Becton Dickinson de 3 láseres y se analizaron con software Infinicyt versión 1.7i. En ambos casos los resultados fueron mayores al 98% para ADSCs (Figs. 1 y 2).

Técnica quirúrgica

El paciente es colocado en posición de litotomía. Se infiltran ambos nervios pudendos con bupivacaína al 0.5% con epinefrina más Xilocaína al 2%. Se identifica el trayecto fistuloso con estilete. Se realiza fotocoagulación con láser diodo 1470 a 7 watts de potencia modo continuo con fibra óptica circular en todo el trayecto fistuloso, comenzando la ablación desde el orificio interno hacia el orificio externo. Al finalizar el tratamiento del trayecto fistuloso se realiza la inyección de células madre: 0,5 ml en cada uno de los cuatro cuadrantes, alrededor de los orificios interno y externo (total 4 ml) y luego 1,5 ml aplicado con jeringa y aguja en los cuatro puntos cardinales en todo el trayecto de la pared de la fístula (total 6 ml) (Fig. 3). Final 100.000 millones de células madres en 10 ml de plasma rico en factores de crecimiento.

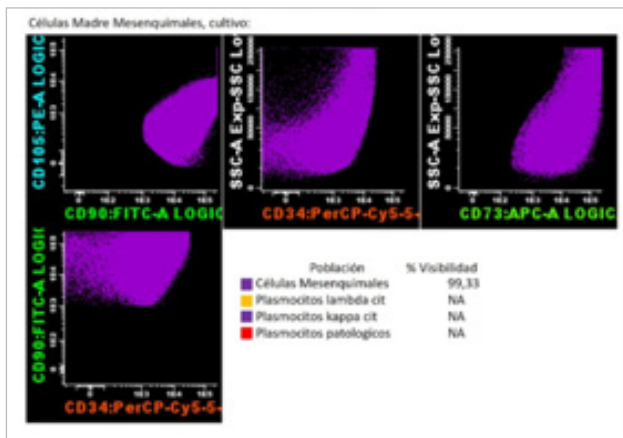


Figura 1. Caso 1. Cultivo de células madre derivadas de tejido adiposo. Células mesenquimales: 99,33%. CD73+, CD105+, CD90+.

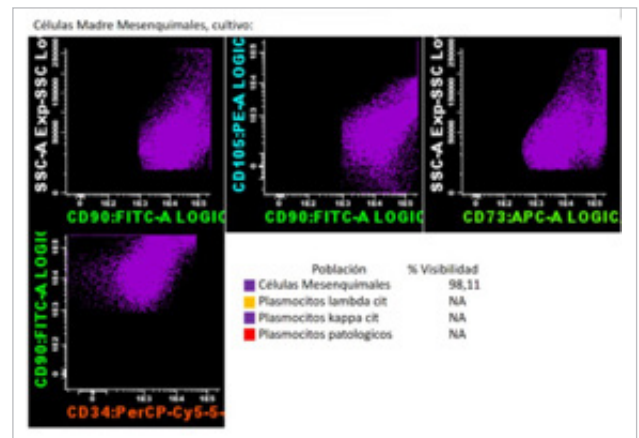


Figura 2. Caso 2. Cultivo de células madre de tejido adiposo. Células mesenquimales: 98,11%. CD73+, CD105+, CD90+.

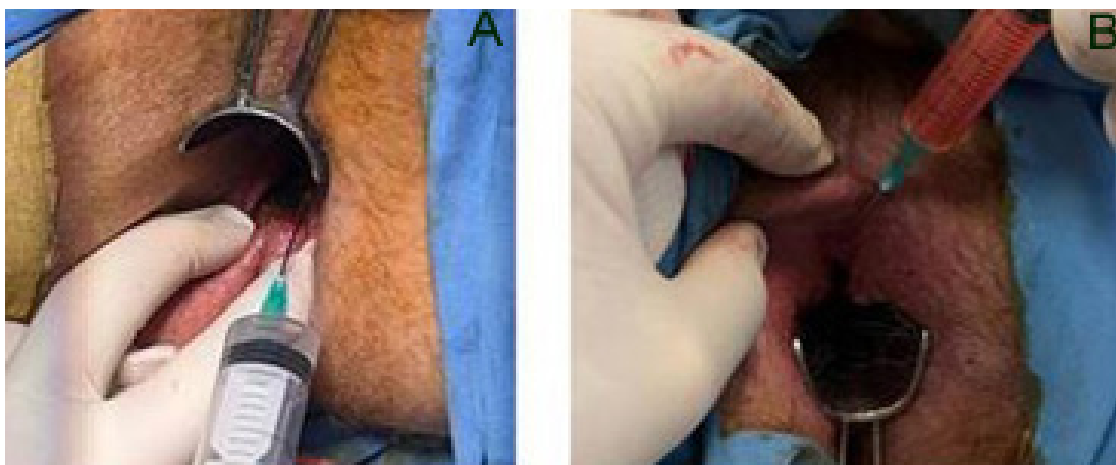


Figura 3. Inyección de células madre liofilizadas en el trayecto fistuloso de ambos pacientes luego de la fotocoagulación con láser.

RESULTADOS

Los pacientes no presentaron complicaciones durante el seguimiento.

La paciente 1 presentó un requerimiento de analgesia vía oral (etoricoxib con rescates de tramadol) por un lapso de siete días debido a un dolor de intensidad 3/10 según la escala visual analógica. No requirió tratamiento analgésico posterior. La herida se encontró cicatrizada por completo a los 21 días. En el control a los 12 meses no se observaron síntomas compatibles con recidiva de la enfermedad ni incontinencia postoperatoria.

El paciente 2, requirió analgesia vía oral (etoricoxib) sin requerimiento de rescates con opioides y refirió dolor 2 /10 según escala visual analógica. A los 25 días la herida se encontró cicatrizada por completo y al año no presentaba recidiva de la enfermedad ni incontinencia postoperatoria.

En ninguno de los dos casos se requirió el uso de antibiotico-terapia postoperatoria.

DISCUSIÓN

El tratamiento de las fístulas perianales ha sido objeto de estudio debido a la complejidad de la patología y el riesgo de complicaciones postoperatorias, especialmente la incontinencia anal. El advenimiento de nuevas tecnologías amplió las opciones de tratamiento, permitiendo un abordaje a medida y aumentando la competencia para disminuir el dolor postoperatorio y las tasas de recidiva e incontinencia. Entre los tratamientos disponibles se encuentran la fistulotomía, fistulectomía, colocación de sedal, instilación de fibrina, ligadura interesfintérica del trayecto fistuloso, ablación con láser, ablación endoscópica y anoplastias con colgajo. Debido a la gran variabilidad entre las técnicas, falta de estandarización y ausencia de ensayos randomizados, ninguno ha demostrado superioridad a lo largo de los años.⁷

En lo relativo a la patología periorificial, desde 2009 se ha reportado el uso de la expansión de células madre del tejido adiposo para el tratamiento de las fístulas anales complejas, sobre todo en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal.⁸ Un meta-análisis de 2019 observó tasas prometedoras de curación de fístulas complejas en pacientes con y sin enfermedad de Crohn, observando la necesidad de un ensayo clínico de gran escala, randomizado y doble ciego para evaluar el verdadero impacto de esta terapéutica.⁹ En una reciente revisión de la literatura publicada por Zahra et al,¹⁰ se comparó la efectividad de los tratamientos alternativos (láser diodo, MSCs, ADSCs) con el tratamiento convencional (fistulectomía y colgajo de avance mucoso), demostrando una mejor respuesta a los trata-

mientos alternativos en los pacientes con enfermedad de Crohn y similares resultados en la fístula compleja no asociada a enfermedad inflamatoria intestinal.¹⁰

A partir de su aplicación en diferentes enfermedades autoinmunes, se propuso la instilación de MSCs para el tratamiento de la enfermedad de Crohn,¹¹ logrando demostrar un beneficio en el tiempo de cicatrización y la tasa de recidiva.¹² En cuanto a la fístula criptoglandular, no se encuentra evidencia suficiente en la literatura para comprobar la no inferioridad y/o superioridad de este tratamiento con respecto a las otras terapéuticas.¹³

Un reciente metaanálisis llevado a cabo por Wang et al,¹⁴ evaluó diez ensayos clínicos randomizados con control en los que se aplicaron diferentes volúmenes de MSCs. Encontraron que el tratamiento de las fístulas con células madre agregado al tratamiento convencional, que en la mayoría de los trabajos consistió en pegamento de fibrina, resultó en mejores resultados a corto y largo plazo.

En un ensayo clínico randomizado, Ascanelli et al.¹⁵ observaron una ventaja en la velocidad de cicatrización al realizar tratamiento quirúrgico más inyección de ADSCs en comparación con el tratamiento quirúrgico únicamente. Además, encontraron una diferencia significativa en el dolor postoperatorio, la velocidad de cicatrización y el tiempo de retorno laboral a favor de la inyección de células madre. Sin embargo, se encontraron hematomas abdominales y dolor en la primera semana del postoperatorio en los pacientes en quienes se realizó la lipoaspiración. Cabe destacar que no se observaron diferencias significativas al evaluar la satisfacción de los pacientes entre los dos grupos.

La aplicación tanto de MSCs liofilizadas como las de tejido adiposo fresco se basa en el mismo principio de la inyección de células madre en el tejido dañado. En comparación con el trasplante de tejido fresco, la aplicación de MSCs expandidas es un procedimiento de mayor costo debido a la necesidad de un laboratorio para la expansión de la línea celular. Por otro lado, la necesidad de realizar lipoaspiración requiere entrenamiento adecuado y conlleva los riesgos asociados a dicho procedimiento.

En nuestro grupo creemos que realizar inyecciones de mayor volumen y la presencia de agentes proinflamatorios en el tejido adiposo fresco podrían provocar mayor reacción inflamatoria, por ende, menor efectividad y mayor dolor. Pensamos que sería conveniente disponer de un ensayo clínico randomizado donde se compare la técnica de MSCs liofilizadas con la de tejido adiposo fresco.

Presentamos en estos dos casos nuestra experiencia temprana con la aplicación de ADSCs liofilizadas combinada con el tratamiento estándar con láser para fístulas perianales complejas como primer tratamiento. La sencillez de la técnica

quirúrgica, su reproducibilidad y el tiempo de cicatrización postoperatoria resultan alentadores.

El tratamiento con células madre surge como una nueva alternativa para la fístula anal compleja. El riesgo del tratamiento es bajo, al no reportarse complicaciones mayores asociadas al procedimiento¹⁶ Sus beneficios podrían impactar en el tratamiento de las fístulas complejas, que son las más demandantes para el sistema de salud.

La heterogeneidad de los estudios publicados, la variación en la técnica quirúrgica e incluso la no diferenciación entre los tratamientos con células madre liofilizadas o no liofilizadas, hacen que los resultados no puedan considerarse concluyentes. En la mayoría de las presentaciones se utiliza esta técnica como complemento al tratamiento estándar (láser, pegamento de fibrina, curetaje) lo cual dificulta el análisis de los resultados.

Se destaca la necesidad de estudios prospectivos, de cohorte, en la que se comparen esta técnica con las otras opciones terapéuticas para demostrar con mayor nivel de evidencia los beneficios de su aplicación.

CONCLUSIÓN

Presentamos dos casos en la que se combinó un tratamiento actualmente instalado para la fístula transesfinteriana con la aplicación de células madre derivadas de tejido adiposo liofilizadas. Como dato de interés para la reproducción de nuestros resultados publicamos la técnica quirúrgica utilizada y el método de obtención y expansión de las células madre autólogas obtenidas. Observamos una acelerada cicatrización y bajo nivel de dolor posoperatorio. Proponemos la necesidad de continuar con esta línea de investigación.

REFERENCIAS

1. Narang SK, Keogh K, Alam NN, Pathak S, Daniels IR, Smart NJ. A systematic review of new treatments for cryptoglandular fistula in ano. *Surgeon*. 2017;15(1):30-9.
2. Rodríguez-Fuentes DE, Fernández-Garza LE, Samia-Meza JA, Barrera-Barrera SA, Caplan AI, Barrera-Saldaña HA. Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review. *Arch Med Res*. 2021;52(1):93-101.
3. Shao F, Liu R, Tan X, Zhang Q, Ye L, Yan B, et al. MSC Transplantation

- Attenuates Inflammation, Prevents Endothelial Damage and Enhances the Angiogenic Potency of Endogenous MSCs in a Model of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Inflamm Res*. 2022;15:2087-101.
4. Chen CY, Rao SS, Ren L, Hu XK, Tan YJ, Hu Y, et al. Exosomal DMBT1 from human urine-derived stem cells facilitates diabetic wound repair by promoting angiogenesis. *Theranostics*. 2018;8(6):1607-23.
5. Ferreira ADF, Gomes DA. Stem cell extracellular vesicles in skin repair. *Bioengineering*. 2018;6(1):66.
6. Lee S, Kim HS, Min BH, Kim BG, Kim SA, Nam H, et al. Enhancement of anti-inflammatory and immunomodulatory effects of adipose-derived human mesenchymal stem cells by making uniform spheroid on the new nano-patterned plates. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;552:164-69.
7. Göttgens KW, Smeets RR, Stassen LP, Beets G, Breukink SO. Systematic review and meta-analysis of surgical interventions for high cryptoglandular perianal fistula. *Int J Colorectal Dis*. 2015;30(5):583-93.
8. García-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum*. 2009;52(1):79-86.
9. Choi S, Jeon BG, Chae G, Lee SJ. The clinical efficacy of stem cell therapy for complex perianal fistulas: a meta-analysis. *Tech Coloproctol*. 2019;23(5):411-27.
10. Zahra A, Malla J, Selvaraj R, Dhanoa RK, Venugopal S, Shoukrie SI, et al. Comparison of Different Surgical Treatments for Complex Anal Fistula: A Systematic Review. *Cureus*. 2022;14(8):e28289.
11. García-Olmo D, Gómez-Barrera M, de la Portilla F. Surgical management of complex perianal fistula revisited in a systematic review: a critical view of available scientific evidence. *BMC Surg*. 2023;23(1):29.
12. García-Arranz M, García-Olmo D, Herreros MD, Gracia-Solana J, Gualdajara H, de la Portilla F, et al. Autologous adipose-derived stem cells for the treatment of complex cryptoglandular perianal fistula: A randomized clinical trial with long-term follow-up. *Stem Cells Transl Med*. 2020 Mar;9(3):295-301. doi: 10.1002/sctm.19-0271. Epub 2019 Dec 30. PMID: 31886629; PMCID: PMC7031651.
13. Wang H, Jiang HY, Zhang YX, Jin HY, Fei BY, Jiang JL. Mesenchymal stem cells transplantation for perianal fistulas: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Stem Cell Res Ther*. 2023 Apr 26;14(1):103. doi: 10.1186/s13287-023-03331-6. PMID: 37101285; PMCID: PMC10134595.
14. Wang H, Jiang HY, Zhang YX, Jin HY, Fei BY, Jiang JL. Mesenchymal stem cells transplantation for perianal fistulas: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Stem Cell Res Ther*. 2023 Apr 26;14(1):103. doi: 10.1186/s13287-023-03331-6. PMID: 37101285; PMCID: PMC10134595.
15. Ascanelli S, Zamboni P, Campioni D, Grazia Sibilla M, Chimisso L, Zollino I, Valpiani G, Carcoforo P. Efficacy and Safety of Treatment of Complex Idiopathic Fistula-in-Ano Using Autologous Centrifuged Adipose Tissue Containing Progenitor Cells: A Randomized Controlled Trial. *Dis Colon Rectum*. 2021 Oct 1;64(10):1276-1285. doi: 10.1097/DCR.0000000000001924. PMID: 34016825.
16. Bhat S, Xu W, Varghese C, Dubey N, Wells CI, Harmston C, O'Grady G, Bissett IP, Lin AY. Efficacy of different surgical treatments for management of anal fistula: a network meta-analysis. *Tech Coloproctol*. 2023 Oct;27(10):827-845. doi: 10.1007/s10151-023-02845-8. Epub 2023 Jul 17. PMID: 37460830; PMCID: PMC10485107.