

Implantación de células madre alogénicas de origen adiposo para el tratamiento de la habronemiasis cutánea

Roberto Estrada ^{1*}, Margarita Ramírez ², Juan Manuel Estrada McDermott ³ y Manuel Estrada Umaña ⁴

- 1 Unidad de Terapia Celular, Cátedra de Cirugía de Especies Mayores, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Costa Rica.
- 2 Centro de Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- 3 Unidad de Equinos y Especies Mayores, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Costa Rica.
- 4 Coordinador Unidad de Terapia Celular y Cátedra de Cirugía de Especies Mayores, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Costa Rica.

ABSTRACT

The cutaneous habronemiasis is a common cause of ulcerative granulomas in equines around the world. Different studies suggest that the animal produces a hypersensitivity reaction to the larvae deposited in their skin. The scientific literature reports positive results in the majority of the cases treated with traditional therapies.

In this case the animal presented a massive chronic granulomatous lesion in his right front limb. After performing the habronemiasis diagnosis the horse was treated using traditional therapies without a satisfactory result. Because of this, we proceeded to implant approximately 3 millions of allogenic adipose derived stem cells in the jugular vein. A complete remission of the granuloma was obtained 53 days after the implantation of the cells. The results obtained in this clinical case suggest that the implanted stem cells had an immunomodulatory effect over the hypersensitivity reaction of the patient.

Keywords: *habronemiasis, hypersensitivity, mesenchymal stem cells, immune regulation, equine.*

RESUMEN

La habronemiasis cutánea es una causa común de granulomas ulcerativos en equinos alrededor del mundo. Diferentes estudios sugieren que el animal desencadena una reacción de hipersensibilidad a las microfilarias depositadas en su piel. La literatura científica reporta que en la mayoría de los casos se obtienen resultados positivos al utilizar las terapias tradicionales.

En este caso el animal presentaba una lesión granulomatosa masiva crónica en su miembro anterior derecho. Luego de realizar el diagnóstico de habronemiasis cutánea, el caballo se trató por medio de terapias tradicionales sin obtener una respuesta satisfactoria. Debido a esto se procedió a implantar aproximadamente 3 millones de células madre alogénicas de origen adiposo en la vena yugular. Después de realizado este procedimiento se obtuvo una remisión total del granuloma, 53 días después de implantadas las células. Los resultados obtenidos en este caso clínico sugieren que las células madre implantadas tuvieron un efecto inmunomodulador sobre la reacción de hipersensibilidad que sufría el paciente.

Palabras claves: *habronemiasis, hipersensibilidad, células madre mesenquimales, regulación inmune, equino.*

Recibido: 4 de abril del 2008

Aceptado: 26 de marzo del 2009

* Autor para correspondencia: tel.: (506) 2562-4531, correo electrónico: remvet69@hotmail.com, apartado postal: 379-2150, San José, Costa Rica.

Abreviaturas

MSC: Células madre mesenquimales.

ADSC: Células madre derivadas de tejido adiposo.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α .

IFN- γ : Interferón γ .

IL-10: Interleukina-10.

RAO: Obstrucción recurrente de las vías respiratorias.

INTRODUCCIÓN

La habronemiasis cutánea es una causa común de granulomas ulcerativos en equinos alrededor del mundo. Existen tres especies de nematodos relacionados con esta enfermedad, estos son: *Habronema muscae*, *Habronema microstoma* y *Draschia megastoma*. Dichos parásitos habitan en el estómago de los equinos. Los huevos y las larvas son excretados en las heces y son ingeridos por los estadios inmaduros de la mosca (*Musca domestica* y *Stomoxys calcitrans*) que habitan allí. Las larvas infectantes son depositadas en zonas húmedas o heridas abiertas donde la mosca se alimenta (Klei, 1992; Moriello *et al.*, 1998; Pusterla *et al.*, 2003; Scott & Miller, 2003). Una vez que la larva ingresa en el hospedero este monta una respuesta de hipersensibilidad a la presencia de larvas muertas en el tejido, lo que produce una lesión granulomatosa ulcerativa, la cual es esporádica dentro de un grupo de animales, pero existen individuos que pueden presentar una predisposición genética a la recurrencia (Moriello *et al.*, 1998). Normalmente, las lesiones se localizan en los miembros, la región ventral del abdomen, el prepucio, el proceso uretral y el canto medial del ojo (Klei, 1992; Moriello *et al.*, 1998; Pusterla *et al.*, 2003;

Scott & Miller, 2003). La lesión puede ser única o múltiple y se caracteriza por el rápido desarrollo de una inflamación granulomatosa, ulceración, hemorragias intermitentes, exudado serosanguinolento y granulación exuberante. Se pueden encontrar además gránulos calcificados (1 mm), los que representan tejido necrótico caseoso que rodea a la larva del nematodo. Normalmente se presenta prurito de moderado a severo y en algunos casos automutilación (Moriello *et al.*, 1998; Scott & Miller, 2003). Al realizar una biopsia de este tejido se van a observar varios tipos de dermatitis que van de nodular a difusa. La reacción inflamatoria va a contener una numerosa cantidad de eosinófilos y mastocitos. Además de estos hallazgos se van a presentar áreas multifocales de necrosis coagulativa con o sin la presencia de larvas (Moriello *et al.*, 1998; Scott & Miller, 2003). Se reportan diferentes abordajes terapéuticos, pero normalmente se recomienda la terapia antihelmíntica (ivermectina o moxidectina) y el uso de glucocorticoides (tópicos o sistémicos). En casos donde la lesión es de mayor tamaño se reporta la utilización de criocirugía o cirugía (paralelo a las terapias antes mencionadas) (Klei, 1992; Moriello *et al.*, 1998; Pusterla *et al.*, 2003; Scott & Miller, 2003).

Por otro lado, las células madre de origen mesenquimal (MSC) son células primarias que se encuentran en diferentes tejidos de animales adultos. El tejido adiposo se deriva del mesodermo y contiene una población microvascular de células endoteliales, músculo liso y células madre. Estas pueden ser enzimáticamente extraídas del tejido adiposo y separadas de los adipositos por centrifugación y filtración. Una vez realizado este procedimiento una población más homogénea emerge en condiciones de cultivo celular. Esta población, llamada células madre derivadas de tejido adiposo (ADSC, por sus siglas en inglés), comparte muchas características con las MSC de otros tejidos, incluyendo su potencial proliferativo y su habilidad de diferenciación multilinear (Strem *et al.*, 2005; Zuk *et al.*, 2001 y 2002). Diferentes estudios han demostrado que las MSC poseen un efecto regulatorio sobre distintas células del sistema inmune. Estas modulan la respuesta de linfocitos T y B, células NK y células dendríticas (Di Nicola *et al.*, 2002; Meisel *et al.*, 2004; Aggarwal & Pittenger, 2005; Beyth *et al.*, 2005; Glennie *et al.*, 2005). Las MSC estimulan que estas células presenten un fenotipo más antiinflamatorio o tolerante. Específicamente causan que se produzca una disminución de la secreción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interferón γ (IFN- γ) y un incremento en la síntesis de la interleukina-10 (IL-10) (Di Nicola *et al.*, 2002; Aggarwal & Pittenger, 2005; Beyth *et al.*, 2005; Glennie *et al.*, 2005). Estos resultados sugieren que la tolerancia inducida por

las MSC en las células del sistema inmune puede utilizarse con fines terapéuticos modulando la inflamación (Aggarwal & Pittenger, 2005). Se ha determinado, además, que los trasplantes alogénicos de MSC con varios pasajes en cultivo, no son rechazados por el receptor y poseen el mismo efecto inmunorregulatorio que la reimplantación de células autólogas (Di Nicola *et al.*, 2002; Aggarwal & Pittenger, 2005; McIntosh *et al.*, 2006). El objetivo principal de este reporte de caso es resaltar el efecto inmunomodulador de las ADSC y su posible aplicación en casos de reacciones de hipersensibilidad o enfermedades autoinmunes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del caso

Un caballo de paso costarricense, macho, de 8 años de edad fue referido al Hospital de Especies Mayores, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Costa Rica. El animal presentaba una lesión granulomatosa masiva (30 cm de largo x 12 cm de ancho) en su miembro anterior derecho (Fig. 1). Además, presentaba un prurito intenso y la lesión producía exudados serosanguinolentos. Según los datos obtenidos, la lesión había aparecido aproximadamente hacía un año, luego de que el animal sufrió una herida en dicho miembro. El caballo había sido tratado anteriormente con diferentes protocolos combinando ivermectina y prednisolona sin mucho éxito. Debido a estos hallazgos se procedió a tomar

una serie de biopsias de la lesión. Los resultados revelaron una dermatitis ulcerativa necrótica con una masiva infiltración de eosinófilos. Además, en varias secciones se presentaba necrosis de colágeno y vasculitis. En las biopsias no se encontraron larvas de nematodo, ni ningún indicio de infección fúngica. Estos resultados, en conjunto con la historia y los signos clínicos, llevaron al diagnóstico de habronemiasis cutánea. El granuloma estaba íntimamente relacionado con las estructuras del miembro (tendones, ligamento, vaina sinovial, hueso), por lo que se descartó la excisión quirúrgica o la criocirugía, ya que los tejidos mencionados podían ser dañados. Debido a esto se trató el equino con prednisolona intramuscular (1 mg/kg/día) por dos períodos de 15 días, con un intervalo de una semana cada uno. Además, se le administraron dos dosis de ivermectina oral (200 ug/kg), con una separación de 15 días cada una. Después de terminado este protocolo se observó una mejoría mínima en el aspecto de la lesión e intensidad del prurito (Fig. 2). Aún así, 6 días después de terminar con la terapia hubo una recurrencia del prurito con consecuente automutilación. Al no obtener el resultado esperado se decidió detener los medicamentos y se continuó por un lapso de 6 semanas con hidroterapia dos veces al día, además de lavados con clorhexidina en la lesión. Durante este tiempo la lesión se mantuvo estable, pero el animal presentaba aún mucho prurito.

Aislamiento, cultivo y reimplantación de las ADSC

Con el fin de regular de alguna manera el proceso inflamatorio tan severo que sufría el paciente, se procedió a implantar células madre alogénicas de origen adiposo. Las células utilizadas fueron extraídas de la grasa de una yegua árabe de 12 años, por medio de un protocolo previamente establecido (Estrada, 2007). Una vez que se alcanzó la confluencia en la botella de cultivo (aproximadamente 3 millones de células), se procedió a recolectar las células y montarlas en una solución isotónica para su transporte e implantación. Las ADSC se transportaron en frío hasta el Hospital de Especies Mayores, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional. Al animal se le colocó un catéter gauge 14 x 2 1/2 en la vena yugular, con las debidas medidas de asepsia y depilación. Una vez realizado esto se le administraron las células vía endovenosa.

RESULTADOS

Aproximadamente una semana después de implantadas las células se empezó a notar una mejoría en la tonalidad y el tamaño de la lesión, además, disminuyeron marcadamente el prurito y la automutilación. A los 15 días se podían notar puentes de epitelio en la lesión (Fig. 3). El equino se mantuvo en observación en el hospital hasta que se alcanzó la remisión completa de la lesión, 53 días después de implantadas

las células (Fig. 4). Nueve meses después de realizado este tratamiento, el animal no ha sufrido una recaída.

DISCUSIÓN

La habronemiasis cutánea es una patología relativamente común en equinos. Aunque la patogénesis exacta de la enfermedad no ha sido dilucidada aún, diferentes autores sugieren que la formación del granuloma va a ser dependiente de una reacción de hipersensibilidad a las larvas muertas dentro del tejido (Klei, 1992; Moriello *et al.*, 1998; Pusterla *et al.*, 2003; Scott & Miller, 2003). Estas afirmaciones se basan en que la enfermedad es esporádica y afecta solo a ciertos individuos de un hato; existe cierta predisposición genética a las recurrencias anuales (normalmente en las temporadas secas donde hay un aumento en la población de las moscas) y en algunos casos, la utilización de glucocorticoides como agente único se reporta como curativo (Moriello *et al.*, 1998 Scott & Miller, 2003).

Debido al efecto modulador sobre el sistema inmune se puede inferir que, en este caso en particular, las ADSC regularon de alguna manera la reacción de hipersensibilidad tan severa y descontrolada que presentaba el paciente. Al controlar la cascada inflamatoria se normalizaron los procesos y permitió que se lograra estimular una cicatrización normal en el área afectada. Es probable que el efecto de las terapias celulares para el tratamiento de la habronemiasis no sería tan efectivo

si no se utiliza en combinación con un endectocida (ivermectina o moxidectina), ya que las ADSC no tienen un efecto larvicida. Si persisten las larvas en la lesión, la reacción no podría ser controlada completamente. Sin embargo, aunque el resultado que se presentó en este caso en particular fue excelente, la mayoría de este tipo de lesiones va a responder a las terapias tradicionales. Aún así existen otros tipos de enfermedades con un fondo inmune que no responden tan efectivamente al tratamiento y podrían ser tratadas en un futuro por medio de las MSC. Podemos nombrar algunas como la obstrucción recurrente de las vías respiratorias (RAO), hipersensibilidad a insectos, urticaria, atopías, alergia a alimentos y vasculitis (Swiderski, 1998). Además de estas patologías, las enfermedades autoinmunes también forman parte del grupo de las hipersensibilidades. Estas resultan por la interacción de linfocitos T autorreactivos (dependientes de células B) y autoanticuerpos. Hasta hace poco, el objetivo principal de la terapia era la supresión no específica de los procesos inflamatorios, esto hacía que en la mayoría de los casos, la cura de la enfermedad no se obtuviera. Además, los medicamentos inmunosupresores pueden llegar a producir efectos secundarios severos en los pacientes después de realizarse terapias prolongadas (Swiderski, 1998).

Debido a este efecto regulatorio sobre las células inmunes, se está realizando una numerosa cantidad de estudios en enfermedades tan diversas como lupus, pénfigo, Enfermedad de Crohn,

esclerosis múltiple, artritis reumatoide, escleroderma, etc. (Dazzi *et al.*, 2007). Por las razones anteriormente expuestas, el fin principal de presentar este caso es el de llamar la atención de los profesionales en ciencias médicas sobre el potencial que tiene esta línea de terapia, en lo que respecta al control de reacciones de hipersensibilidad y enfermedades autoinmunes. Por ende, consideramos de vital importancia que esta experiencia se tome como base para realizar estudios científicos que permitan la utilización de esta terapia a mediano plazo en nuestros pacientes.

Agradecimientos

Al Hospital de Especies Mayores, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional y a su personal, por toda la ayuda brindada para realizar este tratamiento.

Al Centro de Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, por el apoyo en lo que respecta al procesamiento del tejido adiposo y cultivo de las células madre.

Al Consejo Nacional de Rectores (CONARE) por el apoyo económico para formar la Unidad de Terapia Celular, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Costa Rica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal, S. & M. Pittenger. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 105(4): 1815-1822.
- Beyth, S.; Z. Borovsky; D. Mevorach; M. Liebergall; Z. Gazit; H. Aslan; E. Galun & J. Rachmilewitz. 2005. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. 105(5): 2214-2219.
- Dais, F.; J. van Laar; A. Cope & A. Tyndall. 2007. Cell therapy for autoimmune diseases. *Arthritis Research & Therapy*. 9: 206.
- Di Nicola, M.; C. Carlo-Stella; M. Magni; M. Milanese; P. Longoni; P. Matteucci; S. Grisanti & A. Gianni. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 99(10): 3838-3843.
- Estrada, R. 2007. Establecimiento e implementación de un protocolo de extracción, cultivo y reimplantación de células madre mesenquimales de origen adiposo para el tratamiento de tendinitis y desmitis en equinos. Trabajo Final de Graduación. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

- Glennie, S.; I. Soeiro; P. Dyson; E. Lam & F. Dazzi. 2005. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 105(7): 2821-2827.
- Klei, T. 1992. Ivermectin in Dermatologic Disorders, pp. 697. In Robinson, E. (ed.). *Current Therapy in Equine Medicine*. 3rd. ed. W.B. Saunders, Pensilvania, USA.
- McIntosh, K.; S. Zyonic; J.B. Mitchell; Z.E. Floyd; L. Hammil; A. Kloster; Y.D. Halyorsen; J.P. Ting; R.W. Stroms; B. Goh; G. Kilroy; X. Wu & J.M. Gimble. 2006. The immunogenicity of human adipose derived cells: Temporal changes in vitro [en línea]. *StemCells* 24: 1246-1253. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=16410391&query_hl=4&itool=pubmed_DocSu (Consulta: 3 abril, 2006).
- Meisel, R.; A. Zibert; M. Laryea; U. Göbel; W. Däubener & D. Dilloo. 2004. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 103(12): 4619-4621.
- Moriello, A.; D. DeBoer & S. Semrad. 1998. Disease of the Skin, pp. 536. In Reed, S. & W, Bayly (eds.). *Equine Internal Medicine*. W.B. Saunders, Pensilvania, USA.
- Pusterla, N.; J. Watson; D. Wilson; V. Affolter & S. Spier. 2003. Cutaneous and ocular habronemiasis in horses: 63 cases (1988-2002). *JAVMA*. 222(7): 978-982.
- Scott, D. & W. Miller. 2003. *Equine Dermatology*. W.B. Saunders, Missouri, USA.
- Strem, B.; K. Hicok; M. Zhu; I. Wulur; Z. Alfonso; R. Schreiber; J. Fraser & M. Hedrick. 2005. Multipotential Differentiation of Adipose Tissue - Derived Stem. *Keio J. Med.* 54(3): 132-141.
- Swiderski, 1998. Hypersensitivity reactions, pp. 19-41. In Reed, S. & W. Bayly (eds.). *Equine Internal Medicine*. W.B. Saunders, Pensilvania, USA.
- Zuk, P.; M. Zhu; H. Mizuno; J. Huang; W. Futrell; A. Katz; P. Benhaim; P. Lorenz & M. Hedrick. 2001. Multilineage cell from human adipose tissue implications for cell - based therapies [en línea]. *Tissue Engineering*. 7: 211-227. [http://www. Macropore.com/pdf/Tissue_Engineering_Article.pdf](http://www.Macropore.com/pdf/Tissue_Engineering_Article.pdf) (Consulta: 3 abril, 2006).
- Zuk, P.A.; M. Zhu & P. Ashjian. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells [en línea]. *Molecular Biology of the Cell*. 13: 4279. <http://www.vet-stem.com/Enhanced/adipose.htm> (Consulta: 3 abril, 2006).

ANEXOS



Fig. 1. Úlcera debridada en el momento que llegó al Hospital de Especies Mayores, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Costa Rica.



Fig. 2. Mejoría leve después de aplicado el protocolo de prednisolona e ivermectina.



Fig. 3. Normalización del proceso inflamatorio y formación de puentes epiteliales, 15 días después de aplicadas las ADSC.



Fig. 4. Remisión completa de la herida y formación de tejido cicatrizal saludable, 53 días después de aplicada la terapia con ADSC.