



A

00524
8

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CRIOPRESERVACIÓN DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS
DE CORDÓN UMBILICAL**

**Trabajo monográfico de actualización
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

MARÍA GUADALUPE AVILA CORIA



MÉXICO, D. F.

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

2003





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

B

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROF. JOSE LUIS DOMÍNGUEZ TORIX
VOCAL: PROF. EVA DELIA CALDERON GARCIDUEÑAS
SECRETARIO: PROF. ROSALINDA VELÁSQUEZ SALGADO
1er. SUPLENTE: PROF. AMALIA GUADALUPE BRAVO LINDORO
2do. SUPLENTE: PROF. ARACELI MENDIETA RERGIS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EDIFICIO A DE LA FACULTAD DE QUÍMICA
U.N.A.M.

ASESOR DEL TEMA:


E.B.C. EVA DELIA CALDERÓN GARCIDUEÑAS

SUSTENTANTE:


MARÍA GUADALUPE AVILA CORIA

C

Agradezco a todas las personas que colaboraron brindándome su apoyo para hacer posible la realización de este trabajo monográfico de actualización.

D

ÍNDICE

I	INTRODUCCIÓN	1
II	EL FUTURO DEL BANCO DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL	4
III	BASES DE LA CRIOPRESERVACIÓN	7
IV	AGENTES CRIOPRESERVANTES	9
V	VALIDACIÓN DEL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN	17
VI	PERSPECTIVAS EN MÉXICO	21
VII	CONCLUSIONES	22
VIII	REFERENCIAS	23

I.- INTRODUCCIÓN

La criobiología es la ciencia que estudia el comportamiento de los seres vivos y sus constituyentes a muy bajas temperaturas. La preservación del material biológico a temperaturas criogénicas (criopreservación) consigue detener completamente las reacciones biológicas. Por tanto, la criopreservación del material biológico tiene por objetivo mantenerlo en un estado viable para que sea utilizado con fines terapéuticos en trasplantes y pueda llevar a cabo su función fisiológica después del implante.

Un material biológico criopreservado para su posterior utilización, son las células de sangre de cordón umbilical, ya que son consideradas como una fuente importante para la obtención de células progenitoras, las cuales se han utilizado recientemente debido a la reducida inmunocompetencia que presentan, disminuyendo por ende en un alto porcentaje, la probabilidad de producir enfermedad de injerto contra huésped (EICH). Otra característica fundamental es el gran potencial de proliferación que poseen las células fetales.^{7,8,75,84}

Estas células se obtienen del cordón umbilical y tejido de placenta de mujeres embarazadas al momento del parto;⁷² tomando en cuenta una información previa con respecto al tipo de liberación, peso de la placenta, así como el peso, sexo y condición del infante.^{3,36,81}

El primer intento de trasplante documentado de sangre de cordón fue realizado en 1963, en un paciente con diagnóstico de linfoglioscarinoma. Sin embargo, hasta los 80's el trasplante de cordón umbilical fue aceptado como una

alternativa del origen de células hematopoyéticas para tratar a pacientes con enfermedades malignas (p.ej. leucemia linfocítica aguda) y no malignas (p.ej. anemia de Fanconi).

Datos recientes precisan, que se han llevado a cabo alrededor de 2592⁸² trasplantes de células de cordón umbilical en todo el mundo (NETCORD), los cuales son realizados tanto con donadores relacionados, así como con donadores no relacionados.^{8,36,47,80}

El interés e importancia en el uso clínico se ha incrementado, al igual que el conocimiento de sus propiedades biológicas e inmunológicas, la obtención de una buena cosecha y principalmente su criopreservación.

Las técnicas de criopreservación desarrolladas para médula ósea (MO) y sangre periférica són usadas también para sangre de cordón umbilical.

Antes de iniciar el proceso de congelación una alícuota de la sangre de la madre y de la sangre de cordón umbilical recolectadas, se reservan para la tipificación de HLA, así como las pruebas de rutina, incluyendó el conteo de células, VIH, VHC, AgsHB, VDRL, CMV (citomegalovirus). Con la adición de hidroxietil-almidón (HES), que permite la sedimentación de glóbulos rojos, la sangre de cordón umbilical es concentrada, para luego ser protegida de la congelación con dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% y finalmente ser criopreservada.

Las unidades son congeladas empleando un controlador de congelamiento y almacenadas en nitrógeno líquido de acuerdo al procedimiento establecido por Rubinstein y colaboradores. Otros estudios aplicados a todas las donaciones son el cultivo microbiológico de aerobios y anaerobios,^{3,9,83} biometría hemática, grupo

sanguíneo, serología, conteo de CD34+ y cultivo celular por hacer mención de algunas de ellas.

El interés por estudiar la sangre de cordón umbilical surge después de haber sido utilizada con éxito en la reconstitución de células hematopoyéticas en un paciente joven con anemia de Fanconi en 1989 siendo esta la primera aplicación de un trasplante de sangre de cordón con éxito.

Los bancos de células de cordón umbilical, se han establecido en todo el mundo, iniciando con ello esfuerzos para lograr una estandarización en los procesos, y así facilitar la regularización, colección, procesamiento de criopreservación y distribución, con el fin de garantizar la calidad de la sangre de cordón umbilical.

No obstante, hay otras técnicas que se emplean para la criopreservación de sangre de cordón umbilical, iniciando así una búsqueda para proporcionar una solución, que brinde seguridad y sobre todo garantice vida a quien lo necesite.^{18,28, 47,60}

II.- El Futuro del Banco de Sangre de Cordón Umbilical

Diversas enfermedades hematológicas tanto malignas (Leucemias agudas linfocítica y mielocítica, leucemia crónica granulocítica)⁽⁸⁾ y no malignas (Anemia de Fanconi, Talasemia, Anemia celular en hoz)⁽⁸⁾ han podido ser tratadas a través de células progenitoras hematopoyéticas. Durante mucho tiempo la medula ósea constituyó la única fuente para la obtención de estas células; sin embargo recientemente se han empleado dos fuentes alternativas: células de medula ósea movilizada y la sangre de cordón umbilical. Esta última tiene como ventajas:

- a) El número de células progenitoras hematopoyéticas. La experiencia clínica ha demostrado que la sangre de cordón contiene suficientes células hematopoyéticas para reconstituir la hematopoyesis en pacientes, con un peso de hasta 50 kilogramos.

- b) La capacidad proliferativa de las células progenitoras hematopoyéticas. Se ha demostrado que las características de las células progenitoras de la sangre de cordón difieren de la medula ósea. Las células progenitoras hematopoyéticas de la sangre de cordón contiene una mayor proporción de células CD34+ primitivas con mayor capacidad clonógena en presencia de factores de crecimiento añadidos y con capacidad mucho mayor de generar colonias secundarias. Existen así mismo diferencias en las características fenotípicas entre las células progenitoras primitivas de la sangre de cordón umbilical y de la medula ósea.

- c) Una aloreactividad disminuida. Si bien la capacidad de proliferar, de los linfocitos T de la sangre de cordón umbilical frente a estímulos alogénicos primarios, es similar a la de la sangre o la de la medula ósea del adulto, su actividad citotóxica basal es menor. También se han observado niveles inferiores en varias citocinas, inmadurez funcional de las células dendríticas. Los citados hallazgos podrían explicar, al menos en parte, la menor intensidad de las reacciones injerto contra huésped (EICH) observada en los trasplantes con sangre de cordón umbilical y que permiten emplear unidades con diferencias en el complejo mayor de histocompatibilidad en uno y hasta dos antígenos.
- d) La expansión ex vivo de las células progenitoras hematopoyéticas de la sangre de cordón umbilical es superior a las de la medula ósea ó las de la sangre periférica después de la movilización. Esto debido a que en resultados obtenidos con células progenitoras hematopoyéticas comprometidas han tenido éxito y que en estudios más recientes parecen demostrar que las células progenitoras CD34+, CD38+ pueden ser expandidas. Por lo que este estudio tendría una importante repercusión en la aplicación de la sangre de cordón umbilical tanto en el terreno de los trasplantes como en el de la terapia génica.

Los puntos anteriores plantean la necesidad de desarrollar condiciones experimentales a través de protocolos de investigación encaminados a explorar nuevas alternativas en la manipulación genética de células de sangre de cordón umbilical y su posterior aplicación en el tratamiento de enfermedades genéticas.^{4,8,15,35,43,47,61,65,69,70,74}

Todas estas investigaciones y avances con respecto a las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) de cordón umbilical han sido útiles para poder preservar la vida, considerando que anteriormente hubo estudios que llevaron a tales células ser criopreservadas.

III.- BASES DE LA CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación surge como tal en 1949, cuando Polge, Smith y Parkes⁽⁷⁾ demuestran el restablecimiento de los espermatozoides de toro después de ser sometidos a vitrificación y deshidratación a bajas temperaturas en presencia de glicerol; éste último considerado como el primer agente criopreservante.

Para 1955, Barnes y Loutit utilizan la técnica de Polge, Smith y Parkes demostrando que la médula ósea de rata podía ser preservada en congelamiento. Posteriormente Loveck Bishop en 1959⁽⁴¹⁾, emplea el dimetilsulfóxido (DMSO) como agente criopreservante dando un salto a la era moderna de la criobiología con las células tallo hematopoyéticas.^{33,44,59,63,77}

Surgiendo de esta manera la inquietud de saber que pasaba con la sangre de cordón umbilical al ser sometida a este proceso y cuestionándose también sobre la mejor manera de obtenerla, y tener una adecuada criopreservación.

Más adelante tomando en cuenta lo antes establecido, Yao y colaboradores en 1969, estudian la distribución del volumen de la sangre circulante en infantes así como la conexión de la placenta al nacimiento en los primeros minutos en 111 nacimientos.

Por su parte, Hofmeyr, Broxmeyer, Bertoloni en 1988⁽⁴⁶⁾, comparten la idea de Rubinstein, con respecto a la hipótesis de que el trasplante de las células progenitoras de cordón umbilical dependía de la cantidad de células nucleadas y del peso del paciente.⁽¹⁴⁾

Con el afán de entender como estas células podrían ser transplantadas, se dió un avance más a los estudios de criopreservación de sangre de cordón umbilical. Se utilizaron dos agentes criopreservantes, dimetilsulfóxido (DMSO al 50%) y dextrano 40 al 5% a diferentes concentraciones. Las células nucleadas o progenitoras hematopoyéticas fueron sometidas a congelamiento y descongelamiento, tomando en cuenta la existencia de células resistentes y débiles para poder determinar el tiempo y la temperatura de resistencia.^{27,28,47,59,68}

Las células que tienen más tolerancia a la tensión osmótica que se presenta durante el congelamiento son los linfocitos y células progenitoras hematopoyéticas, por otra parte las que sobreviven menos a este proceso son los glóbulos rojos y granulocitos. Esto establece que el proceso de congelamiento sea determinado por la medida celular y la permeabilidad de su pared. Sin embargo, las células pueden sufrir un daño en su membrana, el cual ocurre como consecuencia de la liberación de calor en la fusión durante el cambio de fase de líquido a sólido.^{23,27,37,41,47,66,73}

Cuando el enfriamiento es demasiado lento, la concentración de solutos extracelulares aumenta paulatinamente, aumentando el gradiente osmótico que provoca la salida del agua de la célula, con la consiguiente deshidratación intracelular, lesionando la membrana y provocando la lisis celular, debido a los cambios ácido-base y bioquímicos.⁷³

Si el proceso de enfriamiento se produce a un ritmo excesivamente rápido, esto impide que el agua intracelular se difunda hacia el exterior, por lo que el sistema no llega a un equilibrio, quedando el medio intracelular menos

concentrado que el extracelular, dando lugar a la formación de cristales de hielo en el interior de la célula, lo que originará una lesión mecánica en los organelos celulares. La temperatura en esta fase permite que sobrevivan las células progenitoras hematopoyéticas con una óptima disminución de 1 minuto por 1° C.

Cuando las células congeladas se calientan, los cristales de hielo intracelulares formados durante el proceso de criocongelación aumentan en tamaño, sufriendo una recristalización; por lo que su tamaño es minimizado por este recalentamiento rápido, exponiendo a las células a una temperatura de 37° C a 40° C en baño María, llevando este proceso a una dilución rápida en la concentración de solutos intracelulares que es causada típicamente por el uso clínico a proporciones de congelamientos lentos.^{8,33,41,46,63,76,80,81}

Es claro que las células humanas, particularmente las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) no sobrevivan a procesos de congelamiento sin un agente criopreservante de ahí el surgimiento de su uso.^{63,73,74}

IV.- AGENTES CRIOPRESERVANTES

Los agentes crioprotectores son sustancias que protegen del daño que se pueda producir en las células debido a la congelación. El modo de acción de los crioprotectores es muy complejo; su efecto protector proviene de su habilidad para vincularse al agua lo que evita la formación de cristales de hielo que puedan dañar a los organelos intracitoplasmáticos y de su capacidad para reducir los efectos tóxicos de las altas concentraciones de sales y solutos basándose en la

permeabilidad y el volumen molar criopreservante penetrado, así como las propiedades de la membrana celular.^{41,59,63,84}

Existen dos clases de agentes crioprotectores mencionados desde 1971 por Meryman: crioprotectores intracelulares y crioprotectores extracelulares.

1. - Crioprotectores intracelulares

Estos se difunden rápidamente hacia el interior de la célula atravesando la pared celular, incrementando así la osmolaridad intracelular durante el proceso de la congelación lo cual minimiza el daño causado por el lento o rápido enfriamiento. Los agentes intracelulares mas ampliamente utilizados en medicina son glicerol (Polge y colaboradores, 1949) y dimetilsulfóxido (DMSO, Loveck Bishop, 1959) que son pequeñas moléculas de bajo peso molecular y tienen la capacidad de atravesar la membrana celular.⁽⁵⁹⁾

En un estudio realizado por Goldman y colaboradores, establecieron, que la pérdida de células tallo en el descongelamiento, se reducía mediante la adición en un solo paso de dimetilsulfóxido al 10% como solución criopreservadora.⁽⁴¹⁾

Bajo éste fundamento, Rubinstein y colaboradores, utilizaron esta técnica para criopreservar células mononucleares de cordón umbilical, de las cuales más del 90% de ellas se requiere que permanezcan viables; para ello es necesario que la solución criopreservadora contenga una fuente como aporte de proteínas, tales como albúmina, suero o plasma autólogo u homólogo, en una concentración final de 10%, diluido en un medio de cultivo del tipo TC199. El medio criopreservante de elección es el DMSO a una concentración final del 10%.^{10,11,14,33,59,66,75,84}

El dimetilsulfóxido posee alta polaridad debido al sulfuro; considerado como un agente crioprotector intracelular (DMSO), tiene la propiedad de disolver muchas sustancias solubles en agua y lípidos; su capacidad de penetración es elevada a temperaturas superiores de 0° C, pero a 0° C ó temperaturas inferiores penetra lentamente, aunque esto dependa de la especie celular, ocasionando un incremento de viscosidad en la solución, lo que permite aumentar su concentración, siendo esto un mecanismo de acción que hace decrecer la velocidad de formación de hielo. Otra característica importante es que actúa como sustancia coligativas es decir, incorporan moléculas de agua y hacen lento el crecimiento de los cristales de hielo, lo que evita un aumento brusco en la concentración de solutos extracelulares. A concentraciones de 5% (0.7M) y 10 % (1.4M) la toxicidad puede ser un problema específicamente si las cantidades son grandes e infusionadas a pacientes pequeños.^{23,33,41,76}

El DMSO tiene una toxicidad tolerable aunque produce fiebre, cefaleas, vasoespasmos locales, náuseas y vómitos.

Otro de los agentes criopreservantes intracelulares más utilizado es el glicerol, útil a concentraciones de 4.5 mol/L (aproximadamente 40% peso/vol) para congelamiento lento para prevenir una hemólisis (Huges-Jones en 1957). Si el congelamiento es rápido, la concentración del glicerol necesita ser del 20% peso/vol (Pert en 1963). Todo ello referido si el glicerol tiene altas concentraciones, su baja temperatura será de -80° C y si estas son a bajas concentraciones de glicerol la baja temperatura será de -20° C.

El efecto del glicerol es probablemente debido al hecho de que la formación de cristales es limitado y provee una fase líquida en la cual las sales son distribuidas como prioridad en el enfriamiento así que la hipertonidad excesiva es evitada (Lovelock 1953).^{3,7,17,23,62,63}

También existen otros agentes criopreservantes intracelulares tales como el etilenglicol, etanol, metanol, acetato de amonio y trimetilaminoacetato, acetamida, 2,3-butanodiol, 1,2-propanodiol.^{41,59,75,77}

Y además de los agentes criopreservantes intracelulares existen otros tipos de agentes extracelulares cuyas características son mencionadas a continuación.

2.- Crioprotectores extracelulares

Estas son moléculas de gran peso molecular, no tienen la capacidad de atravesar la membrana celular, por lo que ayudan formando una barrera alrededor de la célula disminuyendo la cantidad de deshidratación celular vista en la congelación lenta. Son más efectivos cuando se utilizan velocidades altas de congelación. No son crioprotectores propiamente dichos, ya que suelen usarse asociados a los agentes crioprotectores intracelulares.

Entre estos agentes tenemos compuestos de macromoléculas como el hidroxietilalmidón (HES), polivinilpirrolidona (PVP), polietilenglicol, azúcares como fructosa, sacarosa, dextrano, lactosa, y glucosa, y alcoholes de azúcar como manitol, sorbitol y polímeros de almidón.^{17,28,33,37,41,44,59,63,77}

Estos agentes tienen propiedades coloidales por lo que permanecen en el espacio intravascular produciendo una expansión de volumen más efectiva que los

cristaloides isotónicos. Mejoran el transporte de oxígeno, y estos coloides pueden ser naturales o proteicos (plasma y albúmina) o artificiales (dextrano y almidones). El coloide ideal debe estar libre de antígenos o propiedades alergénicas, ejercer una presión coloide-osmótica intra vascular sostenida, libre de riesgo infeccioso, poseer una larga vida sin necesidad de almacenamiento especial y tener bajo costo. Para una concentración dada de coloide, las soluciones con partículas pequeñas ejercen un efecto coloide-osmótico (oncótico) mayor siendo más rápidamente filtradas, de igual manera, para una concentración dada de coloide con un peso molecular alto, habrá relativamente menos partículas, así que el efecto oncótico es menor pero su duración es mas sostenida.

El agente coloide extracelular usado en la clínica es hidroxietil-almidón (HES), el cual es una molécula de alto peso molecular que actúa en la superficie de las células, su efecto es la de imitar a las proteínas plasmáticas, por lo que la solución al 6% genera una presión coloide-osmótica de 28 mmHg en la sangre, considerado similar a la de albúmina y provoca un incremento de volumen intra vascular similar a la cantidad de volumen administrado. Si se utiliza una muestra obtenida de la bolsa con HES se puede dificultar la interpretación del grupo sanguíneo y de anticuerpos, también puede causar defectos de coagulación, decrece la cantidad de hemoglobina liberada desde la célula individual sin apreciar el decrecimiento de número de células dañadas; tiene la particularidad de aumentar la viscosidad de la suspensión por lo que la transfusión debe realizarse lentamente.

Otro coloide que actúa como criopreservador extracelular es la polivinilpirrolidona (PVP), descubierto por Farrant y Woolgar en el 1970. Actúa en dos pasos: 1º reduce la concentración de electrolitos que se encuentran a una concentración relativamente alta, debido al peso molecular bajo que tiene; 2º reduce el hinchamiento osmótico coloide durante el descongelamiento.^{23,41,62,63,66,67,73} . Un tipo más de criopreservante útil es el coloide dextrano, que disminuye la cantidad de hemoglobina liberada desde la célula individual sin apreciar la disminución de número de células dañadas; y así el dextrano disminuye la lisis de las células rojas durante el congelamiento y descongelamiento, quedando exenta del daño (Zade-Oppen en 1968).⁽⁵³⁾

El dextrano 40 (Rheomacrodex) se presenta con una solución al 10 % en suero salino normal, su uso se limita a la expansión del volumen intravascular (por su poder oncótico), también ocasiona disminución en la viscosidad debido a su propiedad de reducir la agregación eritrocitaria, la adhesividad-agregación plaquetaria y la concentración de glóbulos rojos por hemodilución. Un gramo de dextrano retiene de 20mL a 25 mL de agua comparado con 13 mL que retienen proteínas.¹⁹

Estas sustancias pueden interferir con las pruebas de tipificación sanguínea y con las pruebas cruzadas especialmente con dextrano 70, debido a la pseudoaglutinación formada. Su administración esta ligada a la coagulopatía por dilución así como a la disminución de formación del trombo de fibrina y en la reducción de la actividad del factor VIII. ^{1,21,44,48,59,63}

Otros coloides que actúan como criopreservantes extracelulares, que se adicionan a la sangre y decrecen la hemólisis después del congelamiento y descongelamiento incluyen la dextrosa, lactosa, sacarosa, albúmina. Sin embargo, quizás las sustancias de bajo peso molecular disminuyen el número de células las cuales lisan, y las sustancias de peso molecular alto (albúmina, PVP y dextrano) decrece la cantidad de hemoglobina liberada desde células individuales, sin apreciable decrecimiento en el número de células dañadas.^{7,6,23,48}

Desde 1968, se han realizado estudios con respecto a las ventajas de emplear la combinación de dos criopreservantes, sin embargo hasta 1983 fue aceptada la combinación de soluciones criopreservadoras. La mezcla de hidroxietil-almidón al 6% y dimetilsulfóxido al 5%, ha sido útil para la criopreservación de granulocitos. Esta mezcla evita la formación de microagregados que forman la lisis de granulocitos, mediante la liberación de núcleo-proteínas y enzimas lisosomales. Cabe mencionar que el dimetilsulfóxido presenta ciertas desventajas ya que a concentraciones altas pueden desarrollar efectos tóxicos, dependientes de la temperatura-tiempo.^{33,41,73}

Las características importantes que deben tener los agentes criopreservantes son: baja toxicidad, facilidad de penetración a las membranas celulares, y además tener una solubilidad mayor con el agua para formar enlaces con ella.^{39,41}

La oportunidad de usar estos criopreservantes o crioprotectores solos, como el DMSO o combinados DMSO-HES sugieren la realización de técnicas para criopreservar las células progenitoras ya sea de cordón umbilical, médula ósea y de sangre periférica.^{75,76}

Criopreservación de Células Progenitoras Hematopoyéticas de Cordón Umbilical

La criopreservación se debe realizar dentro de las primeras 48 horas después de la recolección. La reducción de volumen es realizada por un método automatizado llamado SEPAX utilizando una solución de hidroxietil-almidón al 6% la cual es mezclada con sangre de cordón en una proporción de 1:5 (a una concentración final de 12% de HES). El sistema SEPAX permite separar las células progenitoras del paquete eritrocitario y del plasma, dejándolas en un volumen final de 20ml. La criopreservación de la sangre de cordón es realizada por la adición del dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración del 50% con dextrano-40 al 5% en un lapso de 15 minutos para alcanzar una concentración final del 10%, la unidad de células progenitoras hematopoyéticas con el criopreservante se congela en un sistema automatizado llamado Bioarchivo que permite la congelación gradual de la unidad, llevándola a una temperatura final de -196°C inmersa en nitrógeno líquido.

Este procedimiento automatizado permite obtener unidades de células progenitoras de una alta calidad y reproducibilidad ^{14,17,33,47,62,66,75,78}

V.- VALIDACIÓN DEL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN

Estas técnicas que validación la sangre de cordón umbilical permiten garantizar y dar seguridad y éxito al trasplante. La importancia de estas técnicas radica desde el momento en que surge la recolección de las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) que se encuentran en el territorio vascular de la placenta y que después del nacimiento son obtenidas en un número suficiente para reconstituir la médula ósea.

La utilización terapéutica de la sangre de cordón define y controla el proceso desde el donante hasta el receptor.

Este proceso consta de tres fases: donación del producto, su manipulación desde el Banco de Sangre de Cordón Umbilical al centro de trasplante y por último el trasplante y seguimiento clínico. Y de forma complementaria, se toman controles que verifiquen la calidad funcional del producto (calidad hematopoyética), y la seguridad del receptor (calidad transfusional). Por lo anterior, el proceso se divide en diferentes técnicas de manipulación del proceso, en el cual se aplican pruebas analíticas de caracterización y controles de calidad.^{22,39,46,64,81}

Técnicas de manipulación

Estas técnicas incluyen la recolección de sangre de cordón umbilical, almacenamiento y transporte en fresco, su manipulación del producto, incluyendo la reducción de volumen, criopreservación y almacenamiento en frío, el envío, entrega y trasplante de la unidad.^{60,61}

Fase del proceso: En la fase de donación se actúa respetando los derechos individuales, donde la donadora es la gestante quien deberá ser mayor de 18 años y recibirá información previa al parto sobre el programa, los beneficios de la donación y prejuicios; posteriormente firmada, dando su consentimiento que autoriza la manipulación de su producto para uso terapéutico.

Otro criterio es la seguridad del donador: estudios publicados comprueban que el pinzaje precóz del cordón puede provocar a una reducción media de 1g/dl de hemoglobina sobre la media del recién nacido, originando problemas aquellos productos que tienen menos de 34 semanas de gestación, siendo excluidos del programa como donantes.^{60,61}

La seguridad es de gran importancia también para el receptor ya que el trasplante de células madre puede transmitir una enfermedad del donante al receptor. Las enfermedades transmisibles son genéticas, como lo es la enfermedad linfhematopoyética del recién nacido, inmunodeficiencias y hemoglobinopatías, así como infecciones de la madre (como SIDA; hepatitis o sépsis). Para minimizar este riesgo, se realiza una historia clínica y estudios serológicos previos al parto.^{60,61}

La fase de manipulación comprende desde la recolección de la sangre hasta la entrega al centro del trasplante.

La caracterización del producto define el contenido celular, contenido de células progenitoras hematopoyéticas y sus características transfusionales, así como el grupo sanguíneo y el HLA.

- Estudios de esterilidad después de la realización de las manipulaciones
- Seguimiento de las células diana durante el proceso
- Registro de almacenamiento
- Registro del transporte desde la maternidad al banco y desde el banco al centro de trasplante.

La fase de envío y trasplante dependerá del centro de trasplante y responsabilidad del equipo médico, quien atiende al receptor. Además, el banco debe seguir el resultado de la infusión y del trasplante para detectar posibles anomalías como son: incidencias en la recepción del producto, resultado de la descongelación caracterizando a las células y su viabilidad, seguimiento clínico de la enfermedad injerto contra el huésped y de la supervivencia.

Para poder justificar las técnicas de manipulación del producto existen los controles de calidad que son los transfusionales y hematopoyéticos. ^{1,8,12,22,24,40,46,56,67,76}

Controles de calidad transfusionales

Los controles de calidad transfusionales incluyen los criterios de inclusión que corresponde a la información, anamnesis, revisión de la historia clínica y estudios previos al parto; los procesos de caracterización que corresponden a identificación de grupo sanguíneo, HLA, y esterilidad.

La verificación de la seguridad transfusional forma parte de este control de calidad que corresponde al estado serológico de la madre al momento de la donación donde se hacen el estudio de los marcadores de infectividad utilizados en medicina transfusional, y vigentes en el país del donante y del receptor. La confirmación del HLA del producto, en muestras nuevas del donante (idealmente una alícuota ligada a la bolsa de trasplante); y el haplotipo HLA materno.^{60,72,79,84}

Controles de Calidad Hematopoyéticos

Los controles de calidad hematopoyéticos incluyen el conteo de células nucleadas, el contenido de CD34+, el uso de productos certificados para uso humano, el tiempo llevado en el proceso, control del transporte del producto, validación y revalidación técnica, pérdida de células diana durante la manipulación.^{4,12,32,42,60}

Los criterios cuantitativos para la validación de una muestra de sangre de cordón son:

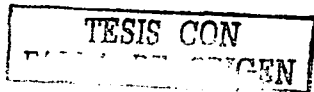
*Criterios establecidos por BSCU de Barcelona España. Querol S, y colaboradores.⁸²

Criterios cuantitativos para validación de una muestra de sangre de cordón

CRITERIOS CUANTITATIVOS	VALOR
Edad mínima del donante	18 años
Semana de gestación	34 semanas
Tiempo de manipulación	48 horas
Volumen de sangre neta	60 mL
Células nucleadas (CN) por ML	$7-20 \times 10^6$
Células nucleadas totales al inicio	$>8 \times 10^8$
Recuperación de CN postmanipulación	$>60\%$
CFU/CD34+ postdescongelación	$>10\%$

VI. Perspectivas en México

Las necesidades actuales y futuras de nuestra población obligan a llevar a cabo programas coordinados y confiables de criopreservación celular que incluyan: células hematopoyéticas (obtenidas de médula ósea, de sangre periférica y del cordón umbilical) con fines de trasplante o terapia génica; así como de eritrocitos (rejuvenecidos o no) de fenotipo poco común para uso transfusional en los pacientes que así lo requieran, además de los programas de expansión celular u otros que, por el avance de las ciencias médicas y transfusionales, vayan surgiendo y que demuestren científicamente su utilidad para el bienestar de nuestra salud.⁽³¹⁾



II.- Conclusiones

- La criopreservación de la sangre de cordón umbilical ha sido exitosa utilizando hidroxietil-almidón al 6%, dimetilsulfóxido al 50% y dextranso-40 al 5% ya que la viabilidad celular se mantiene en buenas condiciones de post-congelación con este tipo de crioprotectores.
- La cultura de la donación de células de sangre de cordón umbilical debe fortalecerse en nuestro país, para contar con un inventario que permita tener una diversidad de HLA para su utilización en enfermedades con diferentes diagnósticos
- La importancia y la aplicación de la sangre de cordón umbilical ha impulsado que el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea sea el primer banco de sangre de cordón umbilical en México, permitiendo que se tenga la tecnología de vanguardia utilizada para este campo, así como el desarrollo tecnológico e investigación en nuestro país.
- Es fundamental que los bancos de sangre de cordón umbilical que surjan en nuestro país, se rijan bajos estándares internacionales como NETCORD. Llevando acabo estrictos controles de calidad tanto transfusionales como hematopoyéticos.

VII.- REFERENCIAS

- 1.- AABB Technical Manual; Edition 13; Chapter 8. pp. 178-182, pp. 357- 374; Chapter 25. pp.536-561,(1998)
- 2.- AABB. Technical Manual, Edition 11; Chapter 5; pp.113-121 (1995)
- 3.- Ademokum J. A., Chapman C., Dunn J., Lander, Mair K; Umbilical Cord Blood Collection and Separation for Hematopoietic Progenitor Cell Banking; Bone Marrow Transplantation Vol. 19, 1023 – 1028 (1997)
- 4.- Almici C., Carlo-Stella C., Wagner J. E., Mangoni L., Garau D., Re A., R., Giachetti C. Cesana and Rizzoli V; Clonogenic Capacity and ex vivo Expansion Potential of Umbilical Cord Blood Progenitor Cells are not Impaired by Cryopreservation; Bone Marrow Transplantation Vol. 19, 1079 – 1084 (1997).
- 5.-Ambriz Fernández Raúl; Innovaciones de la Medicina Transfusional, Gaceta Médica Vol.138 Suplemento No.1, Año 2002
- 6.- A. Raúl, M. Carlos, Q. Sandra, Bautista Javier; Manual de procedimientos, Laboratorio de área clínica; Banco Central de Sangre, IMSS (2001)
- 7.- Areman Ellen M., S.B.B. (ASCP), Deeg H. Joachim, M.D., Sacher Ronald A., MB Bch, DTM&H, FRCP (C); Bone Marrow and Stem Cell Processing, A Manual of Current Techniques; 10 – 12; Cap. 9 Cryopreservation and Storage of Stem Cells, pp.292 – 305.(1998)
- 8.- Ballen Karen, Broxmeyer Hal E., McCullough Feffrey, Piaciabello Wanda, Rebullá Paolo, Catberine, Verfallie M., Wagner John E; Current Status of Cord Blood Banking and Transplantation in the United States and Europe; Biology of Blood Marrow; American Society for Blood and Marrow Transplantation **ASBMT**; 7: 635–645 (2001)

- 9.- Ballen K.K., Wilson M., Wu J., Ceredona A. M., Hsieh C., Stewart F. M., Propovsky M. A.; Bigger is Better: Maternal and Neonatal Predictors of Hematopoietic Potential of Umbilical Cord Blood Units; Bone Marrow Transplantation Vol. 27, 7 – 14 (2001).
- 10.- Bautista Javier, Martínez Carlos, Quintana Sandra, Ambriz Raúl F; El Banco de Sangre en la Obtención y Acondicionamiento de Células Progenitoras Hematopoyéticas; Banco Central de Sangre del CMN, Siglo XXI; Revista de Hematología Vol. 2 No. 2, Año 2001, 59 – 62.
- 11.- Bautista Juárez Javier; Criopreservación de Células Progenitoras Hematopoyéticas Estándares de Calidad; Manual del Banco Central de Sangre del CMN, Siglo XXI Cap. 27 195–200 (2001)
- 12.-Bowman C. A., Yu M. and Cottler ; Evaluation of Methods for Preparing and Thawing Cryopreserved CD34+ and CD34- Cell Lines for use as Reagents in flow Cytometry of Hematopoietic Progenitor Cells; Transfusion, Vol. 36, 985 - 988 (1996).
- 13.-Brocklebank Anne M. and Sparrow Rosemary L.; Enumeration of CD34+ Cells in Cord Blood: A Variation on a Single – Platform Flow Cytometric Method Based on the ISHAGE Gating Strategy; Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 46:254 – 261 (2001).
- 14.- Broxmeyer Hal E., Gordon W. Douglas, Hangoc Giau, Cooper Scott, Bard Judith, English Denis, Arny Margaret, Lewis Thomas, and Edwart A. Boyse; Human Umbilical Cord Blood as a Potencial Source of transplantable Hematopoietic Stem/ Progenitor Cells; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Medical Acienes, Vol. 86, 3828 – 3832 (May 1989)

- 15.- Broxmeyer Hal E ,PhD; Introduction: The Past Present, and Future of Cord Blood Transplantation Cellular Characteristic of Cord Blood and Cord Blood Transplantation Bethesda, MD:AABB Press, pp.1-11 (1998)
- 16.- Broxmeyer Hal E., PhD, David J. Cirarella, Cellular Characteristics of Cord Blood and Cord Blood Transplantation; pp. 1-27. (1998).
- 17.-Broxmeyer, H. E., Cooper, S.; High-efficiency recovery of immature hematopoietic progenitor cells with extensive proliferative capacity from human cord blood cryopreserved for 10 years; Clinical and experimental immunology; Vol. 107(1), 45 – 53 (January 1997).
- 18.-Carrillo-Maravilla Eduardo; Estandarización de dos métodos para la recolección de sangre de cordón placentario para trasplante de células totipotenciales Hematopoyéticas; Gaceta Médica Mexicana, Vol. 136, No.2. S3-S4.(2000).
- 19.- Coulter Beckman Monoclonal Antibody CD³⁴⁺CD⁴⁵, pp.1-3 (2001)
- 19.- Córdova Caballero María de la Soledad; Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas; Gaceta Médica Mexicana, Vol.138 Suplemento No.1 (2002)
- 21.- VII Congreso de la Asociación Española de Bancos de Tejidos, Ingeniería Tisular Terapia Celular (Fundamentos de Criobiología, pp.1-17); El Puerto de Santa María, 2, 3, 4, y 5 de Abril de 2002.
- 22.- Corsini C., Lecchi L., Lazzari L., Tibaldi S., Curioni C., Raffi I., Scarabelli M. L., Rebullia P., Sirchia G; Cost of Collection, Characterization and Cryopreservation of Cord Blood Units; Scientific Section, Abstract Supplement, Transfusion, Vol. 36; S176 (1996).

- 23.- Cruz Rico Graciela, Cruz Rico Jorge Criopreservación de células progenitoras hematopoyéticas; *Gaceta Médica Mexicana*, Vol. 136., No. 136, S13-S15 (2000).
- 24.- Elias M; Effect of Technique and Time on the Quality of Thawed Umbilical Cord Stem Cell Graft (UCSC); *Scientific Section, Transfusion Vol. 40; SP63* (2000).
- 25.-. Elias M, Cord Blood (UCB) Processing Using Plasma Expanders; *Scientific Section, Transfusion Vol. 40; SP72* (2000).
- 26.- Elias M; Factors Influencing Cord Blood Yields in Starting Hands; *Scientific Section, Transfusion Vol. 40; SP87* (2000)
- 27.- Elchalal Uriel, MD, Fasouliotis Sozos J, MD, Shtockheim David, MD, Chaim Brautbar, PhD, Joseph G. Schenker, MD, Daniel Weinstein, MD, PhD, and Arnon Nagler, MD, MSc ; Postpartum umbilical cord blood collection for transplantation: A comparison of three methods; *Am J. Obstest Gynecol*, Vol. 182 Num. 1, Pat. 1, 227 – 232, (January 2000).
- 28.- Fernandez, N Manuel, Millan, Isabel, Gluckman Eliane; Cord - Blood Transplants, *The New England Journal of Medicine*, Vol.340 (16), 1287–1288 (April 1999).
- 29.- Fountain D. M., Schulz M. C., Higgins N., R. J. Benjamin, *Microbial Contamination of Liquid Nitrogen Storage Tanks; Scientific Section, Abstract Supplement, Transfusion, Vol. 36; S175* (1996).
- 30.- Fountain D., Ralston M., Higgins N., Gorlin J. B., Wheeler C., Antin J. H., W. Churchill H., and R. J. Benjamin; *Liquid Nitrogen Freezers: a Potential Source of Microbial Contamination of Hematopoietic Stem Cell Components; Blood Components, Transfusion, Vol. 37, 585 – 591* (1997).

- 31.- Frenk Mora Julio; Programa de Acción Transfusión Sanguínea, pp.21-27, Año 2002
- 32.- Fritsch G., Printz D., Stimpfl M., Dworzak M. N, V. Witt, U. Potschger, and Buchinger P.; Quantification of CD34+ Cells: Comparison of Methods Transplantation, Transfusion, Vol. 37, 775 – 784 (1997).
- 33.- Galmes A., Besalduch J., Bargay J., Matamoros N., Duran M. A., M. Morey, Alvarez F, and Mascaro M.; Cryopreservation of Hematopoietic Progenitor Cells With 5-Percent Dimethyl Sulfoxide at –80° C Without rate-Controlled Freezing; Mechanical Freezing of HPCs With DMSO, Transfusion, Vol. 36, No. 9, 794 - 797 (1996).
- 34.- Gómez Morales Enrique, Quintana González Sandra, Alcaraz José Luis, Bautista Juárez Javier, Ambriz Fernández Raúl, Sánchez Valle E, Trasplante de Células Hematopoyéticas, logros de un Equipo Multidisciplinario; tópicos de medicina transfusional, Cap. 25 179–187 (2000)
- 35.-Goodwin H. S., Bicknese A. R., Chien S–N, B. D. Dogueki, Oliver D.A., Quinn C. O., Wall D. A; Multilineage Differentiation Activity by Cells Isolated from Umbilical Cord Blood: Expression of Bone, Fat, and Neural Markers; Biology of Blood Marrow, American Society for Blood and Marrow Transplantation ASBMT; 7: 581–588 (2001).
- 36.- Gluckman E., Rocha V., Chastang Cl., Cord Blood Hematopoietic Stem Cells Biology and Transplantation, American Society of Hematology, Lecture; 1 – 13; (1998)
- 37.-Harvey L. Bank, Ph.D., and Kelvin G.M. Brockbank; Basic Principles of cryobiology Supplement, 1987, Vol. 1, No.3 137-143

- 38.- Heschel I, Speetzen R., Gross Th., Rindler V. and Rau; *Fundamental Aspect and Clinical of Cryobiological; Biomedical Engineer University of technology; pp.1-9 (1990)*
- 39.- Hirsch Isabelle, Claisse Jean Pierre, and Gluckman Eliane; *Collection, Freezing, and Storage of Umbilical and placental Cord Blood; Journal of Hematotherapy; Vol 2:229 – 230 (1993).*
- 40.- Hogan Christopher J., Shpall Elizabeth J., and Keller Gordon; *Differential Long Term and Multilineage Egraftment Potential from Subfractions of Human CD34 Cord Blood Cells Trasplanted Into NOD / SCID Mice; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Medical Aciences, Vol. 99, No. 1, 413 – 418 (January 2002).*
- 41.- Hubel A.; *Parameters of Cell Freezing: Implications for the Cryopreservation of Stem Cells; Transfusion Medicine Reviews, Vol. 11, No. 3, 224 – 233 (1997).*
- 42.- Hubel Wolfgang, Iturraspe Jose; *Measurement of absolute concentration and viability of CD34+ cell in cord blood and cord blood products using fluorescent beads and cyanine nucleic acid dyes; Cytometry (Communications in Clinical Cytometry), Vol. 34, 121-127 (1998).*
- 43.- Indrikovs Alexander J.; *Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical; Gaceta Médica Mexicana, Vol.138.No.1, S130- S132.(2002)*
- 44.- Jacie (Joint Accreditation Committee of ISHAGE – Europe and EBMT); *Manual de acreditación para la extracción, procesado y trasplante de células progenitoras hematopoyéticas; pp.164-167 (1999).*
- 45.- Katayama Y., Yano T., Bessho A., Desguchi S., Sunami K., Mahmut N., Shinagawa K., Omoto E; *The Effects of a Simplified Method for Cryopreservation*

- and Thawing Procedures on Peripheral Blood Stem Cells; Bone Marrow Transplantation Vol. 19, 283 – 287 (1997).
- 46.- Killan Donna, RT (CSLT), MD Wright Patricia, MT (ASCP); Bentley Stuart A., MD; A Cost-Effective and Food and Drug Administration Approved Alternative to Tissue Culture Media in Cryopreservation; Transfusion, Vol. 36, No. 5, pp.476 (1996).
- 47.- Lazzari L., Lucchi S., Montemurro T., Porretti L., Lopa R., Rebullia P. and Sirchia G.; Cryopreservation, Evaluation of the Effect of Cryopreservation on ex Expansion of Hematopoietic Progenitors from Cord Blood; Bone Marrow Transplantation Vol. 28, 693 – 698 (2001)
- 48.-Linares Jesús; uso clínico de la sangre (Fluidos de reemplazo); Edit: Organización Mundial de la Salud Ginebra,(1998)
- 49.- López Antonio Marín; Del Banco de Sangre a la Medicina Transfusional; Gaceta Médica, Vol.138 Suplemento No.1, Año. 2002
- 50.- Mayani Viveros Héctor, Caracterización y Expansión In Vitro de las Células Hematopoyéticas Humanas Presentes en la Sangre de Cordón Umbilical: Medicina Transfusional, Cap.2, Edit: IMSS (2002)
- 51.- Mayani Hector, Lansdorp PM Biology of human umbilical cord blood derived hematopoietic stem/progenitor cells. Stem Cell Vol.16:153-165 (1998)
- 52.-Miranda Arrojo Isidro, Miranda Blanca, Informe de Trasplante de Sangre de Cordón Umbilical, pp. 417-439. AEBT, España (1997)
- 53.- Mollison P.L.; Blood Transfusion in Clinical Medicine; Edit. Blackwell Science, pp. 67- 72, 300-308 (1987)

- 54.- Morales R., Manuel Polanco; *Controversia en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas*; *Gaceta Médica Mexicana*, Vol.136 Suplemento No.2.(2000).
- 55.- Padley D, Koontz F., Trigg M. E., Gingrich R., and Strauss R. G.; *Bacterial Contamination rates Following Processing of Bone Marrow and Peripheral Blood Progenitor Cell preparations*; *Transfusion*, Vol 36; 53 - 56 (1996).
- 56.- Pahwa Rajendra N., Fleischer Adiel, Thans Soe, and Robert A. Good; *Successful Hematopoietic Reconstitution with Transplantation of Erythrocyte-Depleted Allogeneic Human Umbilical Cord Blood Cells in a Child with Leukemia*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Medical Sciences*, Vol. 91, 4485 – 4488 (May 1994).
- 57.- Pegg David E.. *Cryobiology tutorial II. Effect of temperature below 0°C*; *Biology Department, University of York, York, UK; EAT*,pp.1-8 (1997)
- 58.- Peter Robert, MD., Ph.D. *Transplantation of Cord Blood Cells The New England Journal of Medicine*, Vol. 333 (1), 67 – 69 (Jul. 1995).
- 59.- Pérez de Oteyza J., Bornstein R.; *Obtención y Manipulación de Precursores Hematopoyéticos (manual de técnicas)*; *Grupo de Criobiología y Biología del TMO, Sociedad española de Transfusión Sanguínea*, 83 – 95 (1998).
- 60.- Querol S , M. Gabano, L. Amat, González S, Gómez MD, de la calle O , García J; *The placental blood program of the Barcelona Cord Blood Bank; Bone Marrow Transplant*; jul 22; Suppl.1 S3-5 (1998)
- 61.- Querol S, Capmany G, Cancelas JA, García J. *Expansion of cord blood cells. Bone Marrow Transplant Jun*; 21; Suppl.3:S77-80.
- 62.- Quillen K and Berkma E.M; *Methods of Isolation and Cryopreservation of Stem Cells from Cord Blood; Journal of Hematotherapy*; Vol.5:153-155 (1996)

- 63.- *Rodríguez Pérez A.* ; *Emergencias y Catástrofes, Coloides; Vol.1; No.4;*
pp. 211-214 (2000)
- 64.- *Rossi F., Lecchi L., Scalamogna R., Scarabelli M. L..C., Curioni C. , Lazzari L., Ratti I., Rebullia P, Sirchia G.,* Centro Transfusionale e di Immunologia dei Trapianti, IRCCS Ospedale Maggiore, Milano, Italy; *Mother and Infant Check six Months After Cord Blood (CB) Collection; Scientific Section, Abstract Supplement, Transfusion, Vol 36; S104 (1996).*
- 65.- *Roy Jones, Chair; Mary Hovowits, Donna Wall, John R. Wingard, Steven Wolff;* *Documenting the Case for Stem Cell Transplantation: The Role of Evidence Based Reviews and Implications for future Research; Biology of Blood Marrow; American Society for Blood and Marrow Transplantation ASBMT; 7: 306 – 307 (2001).*
- 66.-*Rubinstein Pablo, Dobrila Ludy, Rosenfield Richard E., Adamson John W., Migliaccio Giovanni, Migliaccio Anna Rita, Patricia E. and Stevens Clad E.;* *Processing and Cryopreservation of Placental / Umbilical Cord Blood for Unrelated Bone Marrow Reconstitution; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Medical Aciences, Vol. 92, 10119 – 10122 (October 1995).*
- 67.- *Rubinstein P, Rosenfield Richard E, Adamson John W. and Stevens Clad E.* *Store Placental Blood for Unrelated Bone Marrow Reconstitution; Blood, Vol. 81. No.7; pp.1679-1690. (April-1993).*
- 68.- *Sirchia Girolamo, MD, Rebullia Paolo, MD, Lecchi Lucia ScD, More on the Safety of Cord Blood Collection; Transfusion, Vol. 36, No. 10, 937 - 938 (1996).*

- 69.-Shpall Elizabeth F. Quiñónez Ralph, Giller Roger, Zeng Chan, Barón E Anna, Jones B Roy; Transplantation of Ex Vivo Expanded Cord Blood; *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, Vol.8:368-376 (2002)
- 70.- Solves P., Larrea L., Mirabet V, Soler M; Bancos de Sangre de Cordón: Estado Actual y Perspectivas de Futuro. No.7 Mayo, AEBT, España (2003)
- 71.- Solves P., E, Perales A., Soler MA, Larrea L, Mirabet V; Comparison between two strategies for umbilical cord blood collection; *Bone Marrow Transplantation* Vol.31, 269-273 (2003)
- 72.- Sousa T., De Sousa M. E., Godinho M. I., Mendes C., Carvalhais A. and I. Barbosa L; Umbilical Cord Blood Processing: volume reduction and Recovery of CD34 Cells; *Bone Marrow Transplantation* Vol. 19, 311 – 313 (1997).
- 73.-Stiff Patrick J.; Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells; Chapter 23, pp. 299 – 308.
- 74.- Stiff Patrick J. MD. Marrow and Stem Cell. Processing for Transplantation (Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells) Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, pp.69-81 (1995)
- 75- Torradadella Marta, Criopreservación Celular, *Gaceta Médica Mexicana*, Vol.138, (1) S126–S129, (2002)
- 76.- The ESMT Handbook 2000 Revised Edition, Blood and Marrow Transplantation, Chapter 6, Source of Hematopoietic Stem Cells, pp.72 – 89
- 77.-Theriot L. Betty , M.H.S., MT(ASCP) SBB; CLS(NCA) Clinical Instruction in Blood Banking;. Creative Educators PO Box 1135, Shreveport, LA Chapter:1-12.

- 78.- Valeri C. R. and Pivacek L. E.; Effects of the Temperature the Duration of Frozen Storage, and the Freezing Container on in vitro Measurements in human Peripheral Blood Mononuclear Cells; *Transfusion*, Vol 36; 303 - 308 (1996)
- 79.-Vettenranta K. V. and Sarinen U. M.; Cord Blood Stem Cell Transplantation for Diamond – Blackfan Anemia; *Bone Marrow Transplantation* Vol. 19, 507 – 508
- 80.- Wadlow Raymond C., Porter David L., Umbilical Cord Blood Transplantation: Where Do We Stand? *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, Vol.8:637-647 (2002)
- 81.- Webb Iain J.; Umbilical Cord Blood As A Source Of Progenitor Cells to Reconstitute Hematopoiesis; *Transfusion Medicine Reviews*, Vol. 11; No.4 265-273 (October 1997)
- 82.- P. Wernet; Carreras Jose, P. Rubinstein; The International NETCORD Organization; Año.2003.
- 83.-Wong, Yuen P. M. P., Li K., A. L. M. Yu and Tosoi W. C.; Cord Blood Collection Before and After Placental Delivery: Levels of Nucleated Cells, Haematopoietic Progenitor Cells, Leukocyte Subpopulations and Macroscopic Clots; *Bone Marrow Transplantation* Vol. 27, 133 – 138 (2001)
- 84.- Zamudio Godínez Lucia; Recolección de células progenitoras hematopoyéticas (CPHs); *Medicina Transfusional* Edit. IMSS Cap:19 135–145 (2002).