



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EFICIENCIA DEL PROCESO
DE RECOLECCION, PROCESAMIENTO Y CRIOPRESERVACION DE
CELULAS PROGENITORAS HEMATOPOYETICAS PROCEDENTES
DE SANGRE DE CORDON UMBILICAL

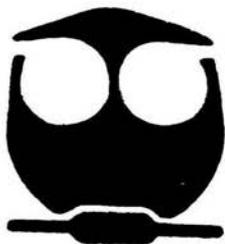
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICA FARMACEUTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A :

MIRIAM MILLAN ROCHA



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Prof. Rodolfo Pastelín Palacios
Vocal	Prof. José Luis Domínguez Torix
Secretario	Prof. Eva Delia Calderón Garcidueñas
1er suplente	Prof Amalia Guadalupe Bravo Lindoro
2do suplente	Prof. Araceli Mendieta Rergis

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea

Asesor del tema:

Eva Delia Calderón Garcidueñas

Sustentante

Miriam Millán Rocha



Gracias SEÑOR

Señor yo quiero que mañana
Mi vida sea bella
Ardiente y generosa
Y toda semejante a la tuya

Aquí me tienes ante ti
Yo pongo en tus manos
Todo lo nuevo de mi vida de hoy
Mis gozos y mis dificultades
Mis anhelos y mis inquietudes
Mi entusiasmo y mi juventud
Mi cansancio y mi trabajo

Tu que eres el amor
Tu que me das la vida
Concede a mis ojos
los misterios de la vida
y las maravillas de tu amor

yo tengo necesidad de Ti
ilumíname ayúdame
a mi y todos los jóvenes del mundo
a llegar a ser personas

Agradecimientos:

En este momento de mi vida en el que parece dar un giro completo quiero agradecer a todos aquellos que han tenido confianza en mi y que me han apoyado, para que mi sueño pueda convertirse en realidad:

Papa y mamá: gracias por que siempre me han enseñado que no existen los imposibles y que luchando se pueden hacer reales todos los sueños, por haberme permitido ser parte de una familia integra y feliz, por creer en mi y darme la oportunidad de llegar hasta aquí, quiero que sepan que ustedes han sido mi aliciente y ejemplo durante toda mi vida y que los admiro y amo mucho.

Mary, Ivancito, Alfredo, Ricardo: a pesar de todos los conflictos que hemos tenido por nuestros caracteres diferentes quiero que sepan que aunque siempre los reprendo es porque los quiero mucho y deseo lo mejor para ustedes gracias por aguantarme.

Angelito: Eres un ángel que el cielo mando para alegrar el iluminar mi vida, te amo chiquito.

A mis abues, tíos y padrinos: Gracias por todos sus consejos y oraciones y porque aunque al principio todo parecía turbio confiaron en mi. Padrinos gracias por ser como son y olvidar conflictos pasados

Primos: ustedes son mi patrón a seguir en la vida, Rosy te admiro mucho, Ale, Paty, Edgar, Erick, gracias por ser un ejemplo a seguir, Martín eres el orgullo de la familia, y a todos mis primos los quiero todos son muy especiales para mi.

Amigos: me han acompañado durante todo este tiempo y juntos recorrimos el mismo camino Ruth, Isa, Cris, Lalo, Rubiel gracias por apoyarme en los momentos mas difíciles de mi vida, Virita recuerda que no siempre estaremos juntas, pero el tiempo que lo estemos será genial, Mony, Sandy, Susy, Javier, Chucho, Mariana, ya nos falta menos echémosle muchas ganas. Amigos del CNTS, gracias por todo

Combo Whopper: Fue toda una suerte conocerte y saber que existe gente como tu en fin..... la vida sigue y todos nosotros con ella rememberTQM

Al Colegio Luz del Tepeyac, por enseñarme todo lo que se y por que gracias a ti soy lo que soy, por ser el mejor lugar que pude haber encontrado para crecer feliz, nunca te olvidaré te llevo en mi corazón, RM. Conchita por la oportunidad, RM. Blanca María, M. Graciela, Miss Maru, gracias por todo.

A todos mis **maestros de la facultad,** por enseñarme que **el mayor orgullo de un maestro es aprender de sus alumnos,** mil gracias. Y particularmente un agradecimiento muy especial a mi Maestra y asesora Eva Calderón, por enseñarme que ya tengo el no y voy por el si, por todos los logros que obtuvimos en conjunto, por la madurez académica y personal que adquirí en estos dos años, por todo gracias.

Factores que influyen en la eficiencia del proceso de recolección, procesamiento y criopreservación de células progenitoras hematopoyéticas procedentes de sangre de cordón umbilical

A pesar del conocimientos que se tiene de las CPH derivados de investigaciones científicas de varios años, solo se tiene conocimiento de una parte del potencial terapéutico de la sangre de cordón umbilical, esto conlleva al continuo desarrollo e investigación de procedimientos clinicamente aplicables para el transplante de CPH en terapia génica y medicina regenerativa, ya que en un futuro los tratamientos para enfermedades ahora incurables, podrían comprender el uso de sangre de cordón umbilical, incrementando así la esperanza y calidad de vida del ser humano.

MMR



INDICE GENERAL

INDICE.....	01
ABREVIATURAS.....	03
INTRODUCCIÓN.....	05
CAPITULO 1 GENERALIDADES.....	09
1.1 MARCO HISTÓRICO.....	10
1.1.2 EL BANCO DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL.....	13
1.2 CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS.....	17
1.3 PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE CPH DE ALTA CALIDAD HEMATOPOYÉTICA.....	24
1.3.1 PREPARACIÓN DEL MATERIAL DE RECOLECCIÓN DE SCU.....	26
1.3.2 EVALUACIÓN DEL DONADOR.....	27
1.3.3 PROMOCIÓN DE LA DONACIÓN DE SCU.....	29
1.3.4 TÉCNICA DE RECOLECCIÓN DE SCU.....	30
1.4 PROCESAMIENTO DE UNIDADES DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL.....	36
1.4.1 ELEMENTOS QUE CONFORMAN EL KIT SEPAX DE SEPARACIÓN.....	40
1.4.2 PRINCIPALES COMPONENTES Y CARACTERÍSTICAS DEL EQUIPO SEPAX.....	41
1.4.3 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PROCESO AUTOMATIZADO...42	
1.4.4 VENTAJAS DEL EQUIPO AUTOMATIZADO SEPAX-BIOSAFE..45	



1.4.5VALIDACIÓN DE UCPH POST-PROCESAMIENTO.....	46
1.5 CRIOPRESERVACIÓN.....	28
1.5.1 CRIOBIOLOGÍA.....	29
1.6 APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LA SCU.....	32
1.61 EL TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS PROCEDENTES DE SANGRE DE CORDÓN..	33
CAPITULO 2 OBJETIVO.....	35
CAPITULO 3 MATERIAL Y MÉTODOS.....	36
3.1 RECOLECCIÓN DE SCU.....	36
3.2 PROCESAMIENTO DE USCU.....	37
3.3 CRIOPRESERVACIÓN DE UCPH.....	38
3.4 ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	
CAPITULO 4 RESULTADOS.....	40
CAPITULO 5 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	44
CAPITULO 6 CONCLUSIONES.....	46
REFERENCIAS.....	48



ABREVIATURAS.

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ABO: Grupo sanguíneo ABO

BSCU: Banco de sangre de cordón umbilical

CD34+: Marcador de células progenitoras hematopoyéticas

CFR: congelador de velocidad controlada

CMN: Células mononucleadas

CPD Citrato fosfato dextrosa

CPH: Células progenitoras hematopoyéticas

CU: Cordón umbilical

CN: Células nucleadas

CNTS Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea

DMSO: Dimetil sulfóxido

EICH: Enfermedad injerto contra huésped

HLA: Antígeno leucocitario humano

HES: Hidroxi-etil almidón

ISHAGE: Sociedad internacional de Hemoterapia e Ingeniería de injertos

MO: Médula ósea

N₂L: Nitrógeno líquido

PNO: Procedimiento normalizado de operación

Rh: Abreviatura del sistema Rhesus de los antígenos eritrocitarios humanos

RPM: Ruptura prematura de membranas



SCU: Sangre de cordón umbilical

UCPH: Unidad de células progenitoras hematopoyéticas

USCU: Unidad de sangre de cordón umbilical



**FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EFICIENCIA DEL PROCESO DE
RECOLECCIÓN, PROCESAMIENTO Y CRIOPRESERVACIÓN DE CÉLULAS
PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS PROCEDENTES DE SANGRE
DE CORDÓN UMBILICAL**

INTRODUCCIÓN.

Todos los años, alrededor del 34.5%²⁶ de la población mexicana en edad escolar desarrolla una enfermedad oncohematológica que compromete su calidad de vida, para ellos, la única vía de curación es un trasplante de médula ósea (MO). La tasa máxima de éxito se produce cuando el donante de médula ósea es compatible con el paciente, pero solo entre el 30-50% de los pacientes tratados con trasplante sobreviven más de un año. Ese donante se busca habitualmente entre los hermanos del paciente, o a partir de una lista de donantes voluntarios; lamentablemente, sólo en un 25% de los casos se encuentra un familiar compatible, y la oportunidad de encontrar a un donador voluntario es menor del 50%.¹⁸

La realización de un trasplante de médula ósea incompatible provoca riesgos muy importantes para el paciente. Sin embargo, se ha demostrado la existencia de Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH) circulantes al momento del nacimiento, en la sangre residual del interior de la placenta y del cordón umbilical,



estas células, dada su inmadurez, tienen la capacidad de dividirse indefinidamente y llegar a producir células especializadas.

Actualmente las CPH constituyen una alternativa en el tratamiento de enfermedades hematológicas e inmunológicas, ya que tras su infusión consiguen regenerar la función medular, repoblando la médula ósea y los tejidos linfohematopoyéticos con menor riesgo para el paciente y con la ventaja adicional de su disposición inmediata, lo que permite que pueda ser trasplantada evitando retrasos innecesarios. Lo anterior facilita que un mayor número de pacientes sean beneficiados con este tipo de terapia.

La recolección, procesamiento, estudio y criopreservación de células progenitoras hematopoyéticas procedentes de Sangre de Cordón Umbilical (SCU) son responsabilidad del Banco de Sangre de Cordón Umbilical (BSCU).⁴

Para la utilización terapéutica de la sangre de cordón umbilical es necesario definir y controlar los diferentes procesos tanto de recolección como dentro del BSCU para que esta sangre sea llevada en las mejores condiciones desde el donador hasta el receptor, por lo que se deben desarrollar controles que verifiquen la calidad funcional del producto y que garanticen la seguridad del donante (calidad hematopoyética) y la seguridad del receptor (calidad transfusional),^{15,23}



El proceso consta de diferentes técnicas de manipulación del producto en las cuales se aplican pruebas analíticas de caracterización y control de calidad, dichas técnicas se dividen en tres fases: la fase de donación del producto (proceso de recolección), la fase de procesamiento de la unidad de sangre de cordón umbilical (reducción de volumen) y la fase de almacenamiento o criopreservación.

Estos procedimientos deben reunir aspectos que garantizan la obtención de Unidades de Sangre de Cordón Umbilical (USCU) de alta calidad, que cumplan con los estándares internacionales establecidos y seguros para su uso terapéutico.²³

En la fase de donación del producto (proceso de recolección) se deben de cumplir los parámetros del perfil de la donante, el procedimiento de recolección se debe apegar a los criterios establecidos por los estándares internacionales, bajo consentimiento informado, tomando en cuenta el carácter altruista del proceso y además que toda la información relativa a la donante será tratada con la más estricta confidencialidad. El proceso de recolección cuenta con protocolos que permiten minimizar el riesgo de transmisión de enfermedades tanto al donador como al receptor, basadas en la revisión de la historia clínica de la donante y estudios serológicos posteriores al parto.⁵



La **fase de procesamiento de la USCU (reducción de volumen)** debe de funcionar bajo estrictos **controles** de calidad y procedimientos validados, de acuerdo a la normatividad **vigente** que permitan realizar la caracterización del producto, definiendo el **contenido celular**, **viabilidad celular**, **contenido de CPH** y **características transfusionales** como el grupo **ABO/Rh** y el **HLA**; así mismo son importantes los estudios que demuestren la **esterilidad** del producto después del procesamiento de la unidad.⁵

La **fase de almacenamiento o criopreservación** de las USCU debe ser realizada utilizando un procedimiento **validado** que regule la velocidad de congelamiento para mantener la **viabilidad celular**, manteniendo las USCU aisladas entre sí, lo que nos asegura que dichas **unidades** se encuentran en condiciones óptimas y a disposición inmediata para su **uso posterior**.⁵

El presente estudio tiene por **objeto**, identificar y determinar la influencia de los factores que intervienen en los procesos de recolección, procesamiento, y criopreservación de unidades de sangre de cordón umbilical, con el fin de establecer **métodos funcionales** que nos permitan garantizar unidades de sangre de cordón umbilical de **alta calidad** y seguras para su uso posterior en trasplantes.



CAPÍTULO 1.

1. Generalidades

En los últimos años los avances científicos y tecnológicos han abierto un panorama distinto para la vida del ser humano. Los alcances obtenidos en el área de la salud han permitido no solo mejorar la calidad de vida de las personas, sino también prometen nuevas expectativas en cuanto a la cura de enfermedades consideradas hasta hace algún tiempo como incurables.

Estos logros han sido producto de varios años de investigación y experimentación en laboratorios de la comunidad científica de todo el mundo, actualmente se continúa con dichas investigaciones obteniendo día a día nuevos conocimientos y resultados aplicables a la mejora de las técnicas ya establecidas.



En el área de la hematología hace algunos años, los científicos se percataron en sistemas vivos de experimentación, que la sangre de los animales recién nacidos contenían altas concentraciones de células que al ser transplantadas eran capaces de salvar a animales que habían recibido irradiación mortal. Este trabajo fue extrapolado a la sangre humana del cordón umbilical (CU), observándose que las células del cordón tenían un alto potencial para reconstituir la función medular.⁹

Han pasado 35 años después de estos descubrimientos, y lo que para esos científicos era un sueño, actualmente para nosotros es una esperanza de vida para las miles de personas que padecen de alguna enfermedad hematológica e inmunológica.

1.1 Marco histórico.

En el año de 1974 en una publicación realizada por Knudtson, se demostró por primera vez la presencia de células progenitoras hematopoyéticas en la sangre del cordón umbilical. A partir de este descubrimiento, se realizaron una serie de estudios biológicos entre los años 1985 y 1992, que demostraron que la porción de células progenitoras hematopoyéticas presentes en la sangre de cordón umbilical, era similar a las de la médula ósea (MO) del adulto.^{4,12}



El trasplante de sangre de cordón umbilical tuvo un inicio clínico que pasó desapercibido, ya que a principios de los años 70's, Ende publicó la realización de un injerto hematológico tras un trasplante de sangre de cordón umbilical, con finalidad transfusional, este hecho no conllevó al nacimiento de esta estrategia alternativa, por el contrario, quedó archivado en las revistas como una curiosidad. No fue sino hasta finales de los 70's y principios de los 80's que se consolidaron los ensayos *in-vitro* que definieron la hematopoyesis, demostrándose la presencia de actividad hematopoyética circulante en la sangre de cordón umbilical.

Fueron Edward A. Boyse, del "Memorial Sloan-Kettering Cancer Center", de la ciudad de Nueva York y Hal E. Broxmeyer, de la "Escuela de Medicina de la Universidad de Indiana" quienes a principios de los años 80 revivieron el interés en la técnica, retomando la propuesta de utilizar la sangre de cordón umbilical con fines de trasplante hematopoyético.^{1,14,30}

Sin embargo fue hasta 1988 cuando se describió ampliamente la presencia de células progenitoras hematopoyéticas circulantes en la sangre de cordón umbilical, que desaparecían a los pocos días del nacimiento. Estos datos de laboratorio permitieron modificar el proceso antes realizado, y en octubre de ese mismo año en París, Gluckman realizó el primer trasplante de CPH procedentes de cordón umbilical entre hermanos HLA idénticos, para tratar a uno de ellos diagnosticado con anemia de Fanconi. Este paciente en la actualidad se encuentra en perfecto estado de salud, con reconstitución completa del sistema linfohematopoyético.¹¹



A finales del año 1998 y después de intensos trabajos de experimentación, un grupo de investigadores de la Universidad de Wisconsin EUA, consiguió el primer cultivo de células progenitoras humanas. A partir de ese momento, las células progenitoras hematopoyéticas han sido presentadas como la gran esperanza terapéutica del nuevo siglo.³²

Ese mismo año Rubinstein y sus colaboradores publicaron los resultados de 562 trasplantes de SCU no emparentado. El seguimiento clínico mostró prendimiento mieloide en el día 42 para el 81% de los pacientes y prendimiento plaquetario en el día 180 para el 69%.¹²

Hasta mayo de 2004 la organización internacional NETCORD contaba con un inventario de 83,091 USCU validadas para trasplante, de las cuales se han utilizado 2,772 para trasplante alrededor del mundo realizándose 1730 trasplantes en niños y el resto en adultos.⁷

El 18 de febrero de 2004, investigadores estadounidenses de la "Universidad de Duke" de Carolina del Norte anunciaron el uso exitoso de células progenitoras hematopoyéticas procedentes de SCU las cuales fueron dirigidas a tejido cardíaco, y transplantadas para regenerar el daño cardíaco de un menor de tres meses de edad.²⁰



En México el 16 de marzo del 2004 se realizó el primer trasplante de CPH procedentes de sangre de cordón umbilical de donador mexicano, recolectadas y procesadas por personal del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea (CNTS) en un niño de 10 años de edad con diagnóstico de leucemia aguda linfoblástica de células T con resultados exitosos hasta el momento.

1.1.2 El banco de sangre de cordón umbilical.

Los procedimientos de recolección, procesamiento, análisis, almacenamiento, clasificación, selección y envío de células procedentes de sangre de cordón umbilical para trasplante emparentado o no emparentado, son responsabilidad del banco de sangre de cordón umbilical.

El primer BSCU de donadores voluntarios no emparentados fue fundado en New York en 1993 por Pablo Rubinstein en el "New York Blood Center" ese mismo año suministró la primera USCU no emparentada para la realización del primer trasplante de este tipo en la "Universidad de Duke" de Durham. En la actualidad este banco es el más grande de EUA y el mundo.^{3,6,30}

En 1995 se fundó EUROCORD con el fin de crear un registro Europeo de pacientes tratados con trasplantes de SCU y seguimiento post-trasplante, esta asociación coordina y evalúa la investigación clínica en trasplante de SCU diseñando protocolos y controlando la calidad de las USCU liberadas por NETCORD y BSCU europeos.^{3,6,7,30}



Para 1995 no solo se habían establecido bancos de sangre de cordón umbilical en Europa y EUA, sino que Japón empezaba a incursionar en el área, actualmente cuentan con 11 BSCU los cuales recolectan y procesan SCU aprobados por el "Japanese Cord Blood Bank Network" el cual está autorizado por el gobierno de dicho país para validar a los BSCU.¹⁸

En 1998 en Milán Italia fue creado el grupo NETCORD que es una organización internacional formada por BSCU de larga experiencia de EUA, Europa, Japón y Australia, surgió con el propósito de estandarización de los BSCU lo que contribuye a mejorar la calidad de las unidades almacenadas. Este grupo ha elaborado estándares que contemplan regulaciones nacionales e internacionales y que han sido aceptados por los diferentes organismos relacionados con la acreditación (FACHT, JACIE e ISHAGE), ha establecido estatutos con el fin de mejorar los estudios e investigaciones en los procedimientos del BSCU, además es capaz de buscar en un inventario virtual mundial la unidad de SCU requerida.
3,7,12,30

Actualmente el programa de acreditación de los BSCU está basado en los estándares internacionales de NETCORD-FAHCT, de acuerdo a esto 33 BSCU en EUA, Europa y Asia han solicitado su acreditación. Cuatro bancos han sido auditados y uno de los cuatro ha sido acreditado mientras que los otros tres están en proceso de acreditación. Los BSCU miembros de NETCORD son:



Auscord (Australia), Düsseldorf, Barcelona, Leiden, Leuven, Liege, Milán, Londres, France-cord, Helsinki, Jerusalem, New York, Praga, Tel Hashomer y Tokio.⁷

En México han surgido varios bancos de sangre de cordón umbilical a partir del 2001, tanto en el ámbito privado como a nivel gubernamental esto debido a la necesidad de contar con un donador compatible en caso de requerir de un trasplante de CPH; se cuenta con 6 BSCU privados y 3 BSCU dependientes de instituciones gubernamentales.⁴

A partir de junio de 2003 el CNTS inició actividades de criopreservación de CPH procedentes de cordón umbilical, siguiendo los criterios establecidos por los estándares internacionales de NETCORD-FAHCT, permitiendo de esta forma la validación del proceso de forma global.⁴

El banco de sangre de cordón debe tener una estructura definida, bajo un único director con un personal adecuado, protocolos y políticas escritas para todos los procedimientos desempeñados por el BSCU incluyendo el desempeño del personal.⁵

Las responsabilidades primordiales del BSCU son cerciorarse de la disponibilidad de las unidades de sangre de cordón, de la seguridad tanto del donante como del receptor y asegurar la calidad del producto.



Los objetivos del BSCU son:

- Servir a los centro de trasplante suministrando unidades de calidad
- Mantenerse operativo alcanzando el equilibrio costo/beneficio
- Promover la donación
- Desarrollar nuevas opciones terapéuticas aplicadas a terapia génica y medicina regenerativa.



1.2 CÉLULAS PROGENITORAS

HEMATOPOYÉTICAS.

El sistema hematopoyético en mamíferos está compuesto por una población heterogénea de células que comprende desde células maduras con una limitada capacidad proliferativa y una vida media corta hasta células pluripotenciales con una extensa capacidad proliferativa, de diferenciación y de autorenovación, estas son las denominadas **células progenitoras hematopoyéticas**.



Las células progenitoras hematopoyéticas pluripotenciales o células madre (figura 1), son las precursoras de los constituyentes de la sangre, ya que tienen la capacidad de diferenciarse dando origen a las células sanguíneas. Son definidas en un sentido operacional como células capaces de reconstituir el sistema hematopoyético de un receptor individual de forma completa, es decir línea roja, blanca, plaquetaria y linfoide y a su vez tienen capacidad de auto renovación, a fin de asegurar la hematopoyesis a lo largo de la vida del individuo.^{1,13}

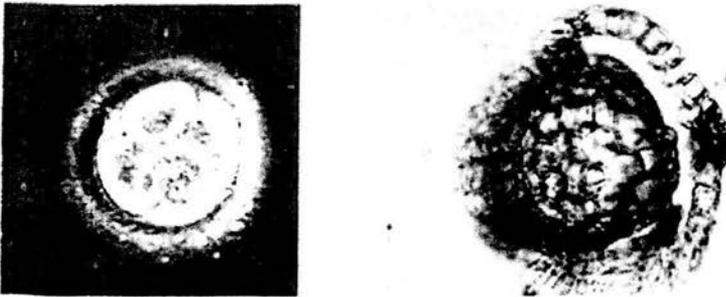


Figura 1 Célula Progenitora Hematopoyética

Las células progenitoras hematopoyéticas, tienen la capacidad de balancear su auto renovación a través de la diferenciación celular, son multipotenciales, son muy escasas, ya que tienen una frecuencia de 1 en 10 000 a 100 000 de las células totales de la sangre y una sola célula puede producir al menos de ocho a diez distintos linajes de células maduras.



Tienen una extensiva capacidad de proliferación que conlleva a un largo número de progenies maduras con lo cual, a partir de la diferenciación, se tienen células de diferentes tipos (Figura 2A) el resultado de estos eventos, es la continua producción, pero no excesiva, de células de todos los linajes las cuales tienen un tiempo limitado de vida y son constantemente remplazadas por la proliferación y diferenciación de las CPH ^{2,13,24}

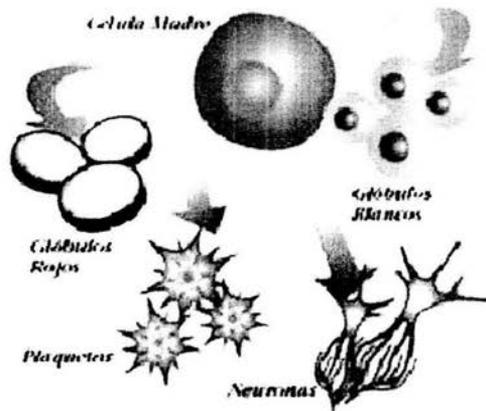


Figura 2A Capacidad de diferenciación de las CPH

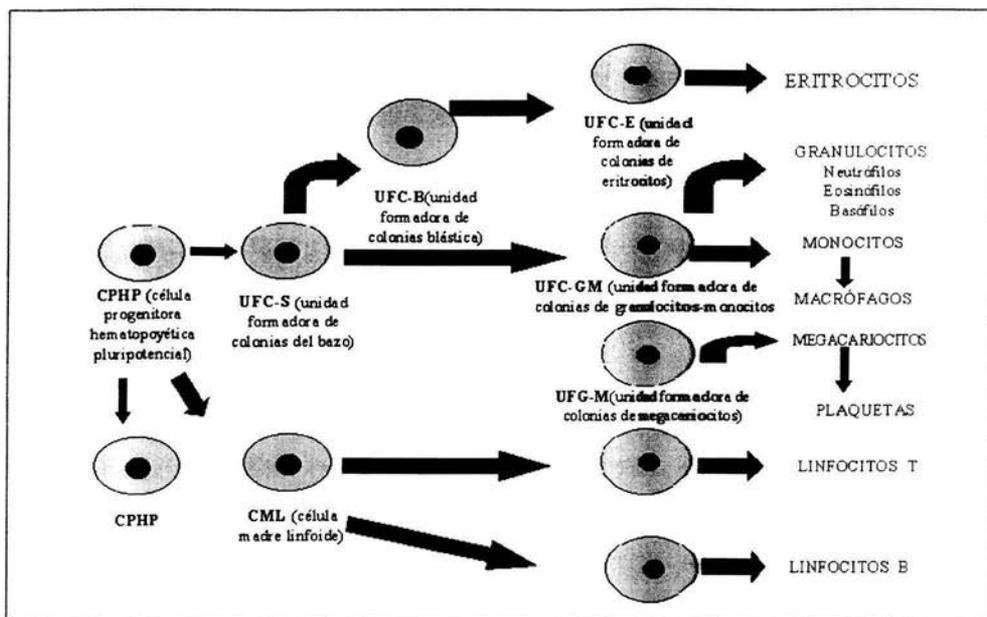


Figura 2B formación de las múltiples células sanguíneas periféricas a partir de la CPH

En la figura 2B se muestran las divisiones sucesivas que las CPH pluripotenciales llevan a cabo para formar las diferentes células sanguíneas periféricas. A medida que estas células se reproducen, lo que continúa a lo largo de toda la vida de una persona, una porción de ellas permanece exactamente igual a las CPH originales y se retiene en la médula ósea para mantener un aporte de ellas, aunque su número disminuye con la edad. La porción mayor de las CPH, se diferencia para formar las demás células sanguíneas.



A la primera descendencia se les denomina células madre comprometidas ya que se encuentran comprometidas en una línea celular particular por ejemplo una célula madre comprometida que produce eritrocitos se llama unidad formadora de colonia de eritrocitos (CFU-E).⁸

A partir de análisis sistemáticos, se ha encontrado que las células progenitoras hematopoyéticas expresan en su superficie, un antígeno en particular que permite su identificación, de poblaciones escasas altamente enriquecidas de células madre. De acuerdo a lo anterior el antígeno CD34 es el marcador universal de las CPH por lo que su identificación, purificación y caracterización ha sido posible mediante estudios inmunofenotípicos.²

El antígeno CD34 es una glicoproteína única transmembranal de 105-120kd, está asociado con células progenitoras hematopoyéticas humanas y es un antígeno leucocitario específico para diferenciación celular. Se encuentra presente en células progenitoras hematopoyéticas inmaduras y en todas las unidades formadoras de colonias de células hematopoyéticas en médula ósea, y está ausente en casi todas las células hematopoyéticas diferenciadas²



El antígeno CD34 fue descubierto a mitad de los años 80's originalmente como resultado de una estrategia para desarrollar anticuerpos que reconocieran pequeñas regiones de las células de la médula ósea humana, pero no de las células maduras de la sangre y células linfoides.²

Recientes estudios han demostrado que las CPH pueden o no expresar el antígeno CD34, teniendo células CD34+ y CD34-.

Las células CD34+ tienen la actividad de CPH, es decir tienen una alta capacidad clonogénica en presencia de factores de crecimiento. La frecuencia de las células CD34+ varía entre la médula ósea, la sangre periférica del adulto y del niño, y la sangre de cordón umbilical; la frecuencia en médula ósea, es de 1-4% de las células mononucleadas y menos del 0.1% en sangre periférica. La proporción de las células CD34+ en SCU presenta valores intermedios entre los hallados en médula ósea y sangre periférica, oscilando alrededor del 0.4% de las CMN, proporción que decrece durante las primeras horas de vida. Las células CD34+, tanto en médula ósea como en SCU constituyen una población muy heterogénea en la que se incluyen también células progenitoras hematopoyéticas comprometidas. La metodología convencional de obtención de CPH es a través de su movilización desde la médula ósea hacia la sangre por la exposición a terapia citoreductiva o por administración de citocinas, aunque en la actualidad el uso de la sangre de cordón umbilical se empieza a utilizar con mayor frecuencia.^{12,24}



Las células CD34⁻ son capaces de repoblar y diferenciarse en múltiples linajes *in vivo* pero son incapaces de proliferar o incrementar su capacidad clonogénica. Algunos datos sugieren que las células CD34⁻ pueden generar células CD34⁺ *in vivo*, y que también tienen la capacidad de diferenciación no hematopoyética. Esto sustenta la idea de que las células CD34⁻ puede generar el desarrollo de precursores de las células CD34⁺ y de las células stem no hematopoyéticas ^{2,24}

En la actualidad el método de elección para la cuantificación del marcador CD34⁺ es por citometría de flujo, el procedimiento puede realizarse en menos de 1 hora, lo que lo convierte en una metodología rápida, objetiva y cuantitativa.

De esta forma la expresión en la superficie del antígeno CD34⁺ ha llegado a ser rápidamente el mecanismo de identificación usado como base para el conteo, aislamiento y manipulación de CPH humanas, y ha tenido especial importancia en la evaluación de la capacidad hematopoyética de un injerto, ya que la expresión de ésta molécula corresponde con los estadios más precoces de diferenciación hematopoyética. ²



1.3 PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE CPH DE ALTA CALIDAD HEMATOPOYÉTICA.

La primera evidencia de la formación de la placenta se da al décimo día posterior a la fecundación. La principal función de esta placenta durante el embarazo es proporcionar la difusión de los elementos nutritivos desde la sangre de la madre hasta la sangre del feto y la difusión de los productos de excreción desde el feto a la madre. Una vez que el neonato ha sido separado de la madre, la placenta ya no tiene ninguna utilidad, por lo que el volumen sanguíneo que queda atrapado dentro de ella pasa a ser un producto de desecho.^{3, 8}



Se ha calculado que los vasos placentarios contienen un volumen entre 75-125mL de sangre, lo que equivale a una tercera parte del volumen sanguíneo fetal; después del nacimiento, las arterias umbilicales se colapsan rápidamente, evitando el flujo desde el feto hacia la madre; sin embargo la vena umbilical permanece dilatada, permitiendo que la sangre placentaria circule en la dirección marcada por la gravedad.¹⁶

Aprovechando estas condiciones fisiológicas y sabiendo que la SCU es fuente de CPH, se han diseñado técnicas que nos permitan recolectar la SCU obteniendo de esta forma células progenitoras hematopoyéticas que pueden ser utilizadas para regenerar la función medular.

Las técnicas obstétricas de cada unidad matema pueden determinar variaciones en los volúmenes obtenidos de SCU, por lo que la técnica de recolección en las maternidades participantes dentro del programa de recolección de sangre de cordón umbilical, debe ser estandarizada, y bajo ningún concepto se podrán cambiar las practicas obstétricas rutinarias al obtener una muestra de sangre de cordón umbilical.



1.3.1 Preparación del material de recolección de SCU.

Para la recolección se requiere un kit especial que contiene el material necesario para obtener una unidad de SCU con todos los elementos que se requieren para su recolección.

Descripción del kit de recolección

- **Dispositivo de recolección:** es una bolsa de recolección con capacidad de 150mL con 25mL de anticoagulante citrato fosfato dextrosa incluidos (B.S. CORD CPD Grifols), esta bolsa se caracteriza por ser un sistema cerrado, estéril y esta compuesta de dos mangueras que por un extremo tienen una aguja de calibre 14 unidas por el otro extremo por un tubo conector en forma de Y, que se dirige a la bolsa de recolección. La bolsa tiene 3 clamps que permiten interrumpir el flujo sanguíneo una vez que se ha tomado la muestra evitando derrames y además cada aguja tiene un capuchón de seguridad que evita posibles accidentes.
- **Tubos de recolección para sangre materna:** uno con anticoagulante (obtención de ADN teca materna y obtención de seroteca materna) y otro sin anticoagulante (obtención de suero para serología materna)
- **Tubo de plástico:** para recolección de fragmento de cordón umbilical.
- **Documentos:** Documento de consentimiento informado, hoja de sala de partos e instrucciones para la recolección.
- **Etiquetas:** para identificación del material anterior.

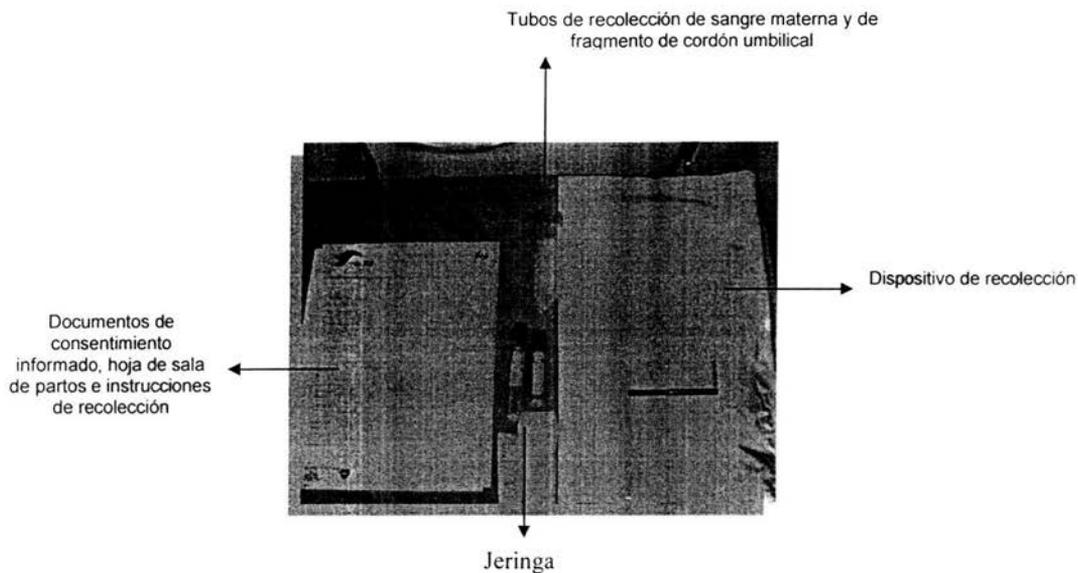


Figura 3 Elementos que conforman el kit de recolección

1.3.2 Evaluación del donador.

Los procedimientos de evaluación del donador son realizados por un equipo altamente capacitado del BSCU, con el fin de proteger al futuro receptor contra cualquier enfermedad que pudiera ser transmitida y también protegiendo la seguridad y confidencialidad del donador de sangre de cordón (recién nacido) y de la madre.



El personal del BSCU realiza un monitoreo en la sala de labor en el cual determina el número total de pacientes ingresadas, se registran los nombres de las pacientes en una bitácora, edad, semanas de gestación, dilatación del cuello uterino y porcentaje de borramiento, así como dirección y teléfono.

Se realiza un monitoreo de todas las pacientes presentes anotadas en la bitácora con el fin de hacer una selección de las mejores donadoras con ayuda del ginecólogo. Se hace un estudio exhaustivo de la historia clínica de la madre y se le cuestiona su estado de salud y las enfermedades que haya sufrido a lo largo de su vida, así como sus hábitos, tomando en cuenta los criterios de exclusión e inclusión para la donación de sangre de cordón umbilical y que esta investigación pueda llevar a la detección de posibles criterios que excluyan a la madre como posible donadora.

Debe de ser evaluada la posibilidad de transmisión de una enfermedad infecciosa desde el donador hasta el receptor; en el caso de que exista algún desorden genético en la historia familiar de la donadora (parientes en línea directa) que pueda afectar al receptor la sangre de cordón no debe ser aceptada para donación.



1.3.3 Promoción de la donación de SCU

Una vez terminado el monitoreo de las pacientes de la sala de labor se prosigue a dar una amplia información del programa a las posibles donadoras, la información incluye los beneficios de la donación y los prejuicios, así como las características de la toma de muestra, y una breve explicación de la misma, se utiliza como material de apoyo, trípticos diseñados especialmente para las madres y se les permite que formulen todas las dudas que puedan surgir, y **solo si** la paciente se encuentra plenamente convencida del programa de donación de SCU se obtiene su consentimiento (figura 4) para la recolección firmando el documento de consentimiento informado, el cual también es firmado por el informador y dos testigos.



Figura 4: Evaluación del donador y obtención del consentimiento



Es importante que los datos anotados en la bitácora sean escritos también en la hoja de consentimiento informado, para tener toda la información posible de la paciente así como datos personales (dirección y teléfono)

Los dos tubos de sangre materna, el tubo del fragmento de cordón y la bolsa de recolección de SCU son identificados con el nombre de la madre incluyendo el nombre, número de expediente fecha y nombre de la unidad materna.

1.3.4 Técnica de recolección de SCU.

Se han descrito diversas técnicas de recolección encaminadas a obtener el mayor volumen posible de SCU sin asumir riesgos innecesarios tanto para la madre o para el recién nacido, actualmente la técnica de recolección que ha dado mayores beneficios es la técnica descrita por Broxmayer, se caracteriza por ser una técnica simple y rápida la cual no interfiere con las prácticas obstétricas rutinarias al momento del nacimiento.



Dicha técnica consta de los siguientes puntos:

1. Preparación del campo operatorio en condiciones de máxima asepsia.
2. Asistencia normal del recién nacido por parte del equipo de la unidad de ginecología.
3. Doble pinzaje del cordón antes de 30 segundos (pinzaje precoz)
4. Sección de cordón
5. Aseptización
6. Identificación de la zona de punción
7. Venopunción
8. Recolección por gravedad con agitación.

Una vez que la donadora se encuentra en la última fase de trabajo de parto esta es trasladada a la sala de expulsión o al quirófano, en donde el equipo del BSCU debe cerciorarse de tener todo el material de recolección listo para ser utilizado.

Antes de realizar la recolección de la unidad de sangre de cordón umbilical, se debe de evaluar el riesgo que pueda presentar el donador (recién nacido) y la madre en el procedimiento de recolección, por lo que los procedimientos que presenten complicaciones de último momento son descartados para la recolección evitando de esta forma riesgos para la madre o para el producto.



La recolección de SCU, ya sea en parto eutócico o cesárea, se realiza cuando la placenta se encuentra aún dentro del útero, se realiza un doble pinzaje (venoclusión) a 10cm del ombligo del recién nacido lo más rápido posible (pinzaje precoz), y se corta el vínculo del recién nacido con la placenta.

Se localiza la zona en donde se va a realizar la punción de la vena (lugar más cercano a la pinza) y se aseptiza dicha zona con solución iodada de povidona (isodine), se punciona la vena umbilical (figura 5) con la aguja de la bolsa estéril de recolección.



Figura 5 Recolección de CPH de Cordón Umbilical



La SCU es recolectada por gravedad agitando la bolsa de recolección en forma circular para evitar la formación de coágulos y favorecer el flujo hacia la bolsa de recolección, se tiene la opción de realizar una segunda punción previa asepsia de la zona con el fin de recolectar el mayor volumen posible de sangre; el volumen aproximado de la recolección se encuentra entre 80-180 ml.

Una vez terminado el procedimiento, las mangueras de la bolsa de recolección son ocluidas por medio de los clamps integrados en el dispositivo de recolección, y se procede al alumbramiento de la placenta (figura 6), la cual es inspeccionada minuciosamente para encontrar posibles daños.

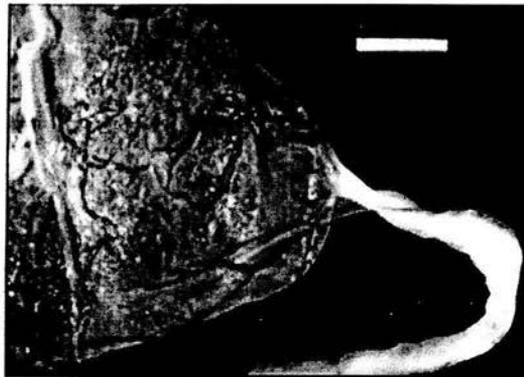


Figura 6 apariencia normal de la placenta después del nacimiento



Se debe de recolectar también un fragmento de cordón umbilical de aproximadamente 3cm de longitud como fuente de ADN para estudios posteriores, y se realiza una toma de muestra de sangre materna para estudios serológicos y grupo ABO/Rh.

De las muestras recolectadas se debe capturar una serie de parámetros obstétricos como edad de la paciente, número de gestas, medicamentos utilizados durante el parto, tipo de parto; y del recién nacido se obtiene la hora exacta de la recolección (hora del nacimiento), así como el peso, APGAR, y semanas de gestación o capurro. De esta forma todos los resultados de la evaluación de la madre y del donador y todos los datos generados del nacimiento son documentados en la hoja de sala de partos, la cual es firmada por el médico responsable del procedimiento.

Todo el material recolectado junto con los documentos referentes a la donación deben de ser colocados dentro de la bolsa hermética (figura 7) y depositados en un contenedor especial a temperatura ambiente y enviada al laboratorio de procesamiento y almacenamiento del BSCU dentro de las 24 horas siguientes a su recolección.



Figura 7 Bolsa hermética con todo el material recolectado



1.4 Procesamiento de unidades de sangre de cordón umbilical.

Numerosos procesos y técnicas han sido utilizados para procesar CPH en el laboratorio, esto incluye técnicas de tipo manual y automatizados.⁹

Las técnicas manuales involucran sistemas abiertos y se trabajan en campanas de bioseguridad, mientras los sistemas semicerrados que utilizan tecnología estandarizada desarrollada para la recolección y separación de SCU usan bolsas para transferencia.⁹

Los métodos automatizados usan equipo y dispositivos sofisticados; por lo anterior sería ideal que en el laboratorio se manejaran ambas metodologías ya que de esta forma se puede tener flexibilidad al trabajar de manera óptima con volúmenes variables, contenido diferente de células totales nucleadas o contenido variado de células rojas.⁹



El procesamiento de la unidad de sangre de cordón se basa en la reducción de volumen por agotamiento de plasma y eritrocitos (por sedimentación), sin pérdida significativa de las células nucleadas. Este procesamiento de las unidades de sangre de cordón debe ser llevado a cabo de acuerdo a Procedimientos Normalizados de Operación (PNO) validados. Muchos estudios han sido realizados con el fin de establecer técnicas de reducción de volumen de USCU, en varios de esos estudios, el procedimiento se desempeña a partir de centrifugaciones en presencia de aditivos, tales como HES, dextran, percoll o poligelina.^{5,25}

El **procedimiento manual**, también utilizado como método de emergencia se basa en la reducción de volumen y separación a partir de centrifugaciones, una desventaja de este procedimiento es que corre el riesgo de contaminación bacteriana debido a que es un sistema abierto, además de que el tiempo de procesamiento es de aproximadamente 6 horas por cada unidad procesada.²⁵

Es importante mencionar que aunque el BSCU tenga establecido el procedimiento automatizado, es indispensable que el personal este capacitado para realizar el procedimiento manual, ya que en situaciones de emergencia o inclusive si llega a fallar el equipo automatizado, se tiene como opción el método manual.



El **procedimiento automatizado** se realiza recientemente a partir de un sistema de centrifugación y concentración celular "SEPAX Biosafe" (figura 8), que trabaja como un pequeño separador de células sanguíneas con un sistema cerrado de aféresis, capaz de procesar bajos volúmenes de sangre de forma automatizada y en un ambiente estéril. Este sistema está basado en la separación por centrifugación de acuerdo a la densidad y tamaño de las partículas sanguíneas lo que permite que las células progenitoras hematopoyéticas puedan ser separadas de la sangre de cordón, reduciendo el volumen inicial colectado (80-180ml) hasta 20ml^{19,25,27}

Los componentes sanguíneos son recolectados en bolsas individuales en un volumen estandarizado, listas para un posterior proceso por ejemplo criopreservación, crecimiento in vitro o transfusión al paciente¹⁹



Figura 8 equipo Sepax-Biosafe

Este sistema puede ser configurado por el operador, de tal forma que se obtengan productos estandarizados con respecto al volumen final. El equipo, realiza la separación de las CPH (Buffy coat), el plasma y las células rojas a partir de un sensor integrado, produce una concentración de las CPH en un volumen final de 26.3 ± 11.6 mL, el producto final es recolectado directamente en la bolsa de congelación y se encuentra listo para la adición del DMSO (crioprotector) sin ninguna manipulación ²⁵



1.4.1 Elementos que conforman el kit SEPAX de separación.

Para realizar la separación celular en un ambiente cerrado y estéril el equipo SEPAX-Biosafe cuenta con un kit de separación, el cual es un dispositivo cerrado, estéril y desechable compuesto por una cámara de separación, tubos conectores, válvulas y bolsas de recolección (bolsa para células rojas, bolsa para plasma y bolsa de congelación)

La bolsa de congelación es la bolsa en la cual se va a obtener el producto final del procesamiento, es decir contiene los elementos que serán congelados (células progenitoras hematopoyéticas), está conformada por un compartimiento menor y un compartimiento mayor, el compartimiento mayor va a contener el 80% del volumen total (20mL) mientras el compartimiento menor contiene el 20% remanente (5mL).

Al momento de realizar un trasplante se tiene como opción utilizar el volumen comprendido en ambos compartimientos, y si es necesario del compartimiento menor obtener el volumen suficiente para hacer estudios de expansión celular, esto es posible debido a que, el compartimiento menor y el mayor pueden ser separados sin comprometer la esterilidad del producto.²¹



La bolsa de congelación también está diseñada para contener un fragmento segmentado en tres alícuotas, que pueden ser removidas sin comprometer la esterilidad del producto total, esas tres alícuotas pueden ser utilizadas para realizar estudios serológicos, recuentos celulares, cultivos celulares o para obtener información genética.²¹

1.4.2 Principales componentes y características del equipo SEPAX.

La cámara de separación es el corazón del sistema SEPAX-Biosafe y está basado en un embolo que puede girar sobre su propio eje, la cámara realiza tanto la centrifugación del producto y la transferencia a la bolsa de recolección adjunta de forma directa en un ambiente cerrado. Los principales componentes del equipo SEPAX son:

- Motor centrífugo y gabinete adaptado para recibir una cámara **desechable** (Kit de separación), centrífuga con un rango de velocidad de 1700 a 8000 rpm.
- Sistema neumático de bombeo con capacidad de vacío y presión para llenar y vaciar la cámara de separación, el flujo puede ser **ajustado entre** 10-180 ml/min



- Dispositivo detector integrado (CCD) para medición del volumen en la cámara de separación (detección de acuerdo a la absorbancia de los componentes)
- Espigas giratorias para la selección de la llave de paso para controlar la dirección del flujo en el kit de separación.
- Detector óptico de la línea para supervisar los diferentes componentes que atraviesan por el sistema ¹⁸

1.4.3 Descripción general del proceso automatizado.

El protocolo utilizado de acuerdo a los estándares internacionales establecidos por NETCORD-FAHCT (Protocolo de Sangre de Cordón Umbilical-HES) está diseñado como un proceso de rutina de SCU, para aislar la fracción de glóbulos blancos enriquecida con CPH. ¹⁹

Se utiliza hidroxí-etil almidón (HES) el cual es un coloide artificial derivado del almidón y compuesto principalmente por amilopectina que permite una rápida sedimentación de los eritrocitos debido a su capacidad para inducir su aglutinación, permite mejorar la eficiencia en la separación de células nucleadas mediante centrifugación además de que contribuye a mantener la viabilidad celular posterior a la criopreservación. La gran reducción de eritrocitos y plaquetas contribuye importantemente para la viabilidad post-descongelación. El proceso permite una reducción de volumen de SCU en un volumen fijo predeterminado ¹⁹



Para el procedimiento de separación automatizado se utiliza el sistema Sepax S-100 con el kit de separación CS-510. El procesamiento de la sangre se inicia por el llenado de la cámara de separación. La sangre de la bolsa de origen (bolsa de recolección) es aspirada dentro de la cámara por un movimiento descendente del pistón, la fase de llenado termina cuando el sensor óptico detecta que el tubo de abastecimiento está vacío o cuando la cámara está llena, en este momento todas las válvulas del kit de separación son cerradas.^{19,25}

La centrifugación dura algunos minutos dando como resultado una óptima separación de los componentes sanguíneos. Al inicio del periodo de centrifugación (sedimentación) la cámara empieza a girar a lo largo de su eje, dándose un aumento de la velocidad de centrifugación de 3500rpm hasta 6500rpm, esta velocidad de centrifugación es mantenida por 4 minutos disminuyendo a 4500rpm velocidad a la cual, se da el inicio de la fase de extracción y recolección, iniciando por el plasma, esto es cambiando la posición de las válvulas y la dirección del flujo a través de los tubos del Kit de separación.^{19,25}

En esta fase de extracción y recolección, los componentes sanguíneos separados son distribuidos dentro de sus respectivas bolsas de recolección.



La SCU ahora separada en plasma, buffy coat y células rojas (figura 9), es empujada fuera de la cámara de separación por un desplazamiento ascendente del pistón, los primeros 4mL de plasma son recolectados en la bolsa para células blancas (criobolsa) esto para recuperar el remanente de SCU que se encuentra en el sistema y otros 8mL de plasma son dirigidos a la bolsa de recolección de células rojas para limpiar el conducto, el plasma sobrante es recolectado en la bolsa correspondiente por un movimiento de las válvulas hasta que el sensor óptico detecta la primera célula. Esta detección de la primera célula inicia el cambio automático de las válvulas y la recolección del buffy coat en la bolsa de recolección de células blancas, por un movimiento ascendente del pistón, una vez que se ha recolectado el volumen establecido de buffy coat la posición de las válvulas cambia automáticamente para recolectar las células rojas en la bolsa correspondiente; el procedimiento termina cuando el pistón llega al tope de la cámara de separación.^{19,25}

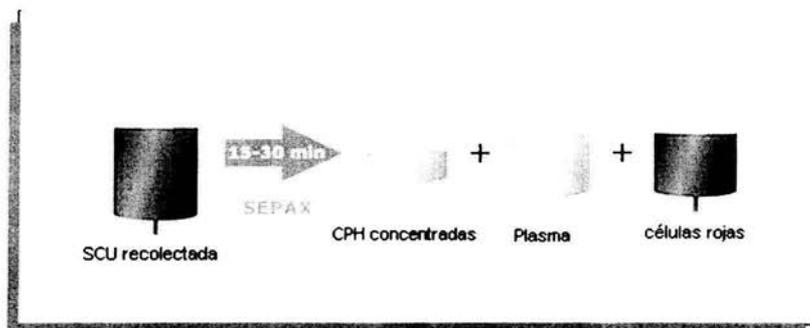


Figura 9 proceso de separación del equipo SEPAX-BIOSAFE

El producto que se encuentra en la criobolsa ahora está listo para el procedimiento de criopreservación.^{19,25}

1.4.4 Ventajas del equipo automatizado SEPAX-BIOSAFE.

- Separación de los componentes sanguíneos de forma automatizada
- Unidades de sangre de cordón umbilical constantes con una reproducibilidad del 100%
- Reducción del tiempo de procesamiento
- Ausencia de contaminación por ser un sistema cerrado



1.4.5 Validación de las UCPH post-procesamiento

Una vez que se ha logrado obtener el concentrado de CPH, con el fin de realizar la validación final de la unidad se procede al conteo celular para conocer la cantidad de CPH que contiene la UCPH.

El conteo celular se basa en la cuantificación del marcador CD34+ y se realiza por citometría de flujo (figura 10) este procedimiento es el procedimiento recomendado por la Sociedad Internacional de Hemoterapia e Ingeniería de Injertos (ISHAGE) para la validación de CPH de cordón umbilical y es el procedimiento de elección, ya que nos permite obtener el contenido de CD34+ por unidad de volumen y puede realizarse en menos de 1 hora, lo que lo convierte en una metodología rápida, objetiva y cuantitativa.

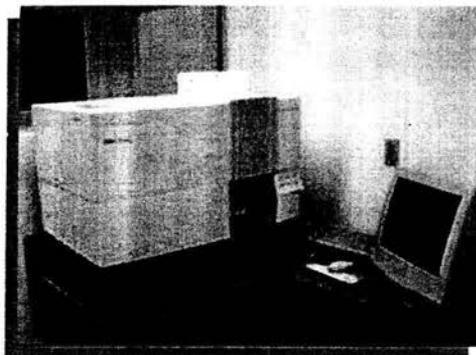


Figura 10 Citómetro de flujo



1.5 CRIOPRESERVACIÓN.

Los métodos de congelación de células rojas, blancas y plaquetas fueron desarrollados en 1960. La metodología más utilizada desde hace varias décadas para la criopreservación de tejidos biológicos termolábiles se ha realizado por medio de la congelación en nitrógeno líquido. Los equipos convencionales de congelación utilizados hasta hace algunos años, no permitían realizar un control cuidadoso de la temperatura de congelación, situación que actualmente es controlada debido a la utilización de sistemas de congelación cerrados y manejados a partir de sistemas robotizados.²¹



1.5.1 Criobiología.

La criobiología es la ciencia que estudia el comportamiento de los seres vivos, o de sus constituyentes, a muy bajas temperaturas. La preservación del material biológico tiene por objeto mantenerlo en estado viable suspendiendo sus procesos metabólicos, preservándolos por periodos de tiempo prolongados, para que pueda ser utilizado en trasplantes y permita llevar a cabo su función fisiológica después del trasplante. Esta conservación a temperaturas criogénicas consigue detener completamente las reacciones biológicas.²²

La ventaja de la criopreservación es que por debajo de los -130°C no se producen reacciones químicas de significado biológico y, debido a ello, es posible conseguir un almacenamiento indefinido. El problema es la repercusión que los procedimientos de congelación-descongelación tienen sobre los grupos celulares. Estudios actuales del equipo de Hal E. Broxmeyer, de la "Universidad de Indiana" han descubierto que las CPH procedentes de cordón umbilical que se han criopreservado en condiciones controladas durante un periodo de 15 años pueden ser igual de viables que las que no se han congelado.³¹

Los equipos convencionales de congelación utilizados hasta hace algunos años, no permitían realizar un control cuidadoso de la temperatura de congelación, ya que las partículas eran enfriadas en una cámara de congelación, para después ser transferidas a otro lugar de almacenamiento ocurriendo un calentamiento de las partículas congeladas, el calentamiento no sólo ocurría por la transferencia de calor por radiación del aire, sino porque también el vapor de agua con el aire se condensa y calienta la superficie de las partículas congeladas.²¹



Debido a lo anterior los procesos de criopreservación deben controlarse de forma tal que el daño que sufran las células sea el mínimo y, por lo tanto, la recuperación sea máxima. La congelación incontrolada de células puede producir daños osmóticos y la formación de cristales de hielo intracelular; esto ocurre cerca del punto de congelación.^{21,22}

Existen diversas formas para evitar estos daños, la más eficiente es la congelación controlada mediante congeladores programables alimentados por nitrógeno líquido, así como el uso de agentes crioprotectores.²²

Los crioprotectores son sustancias que protegen del daño que se pueda producir en las células debido a la congelación, su efecto protector proviene de su capacidad para vincularse al agua, haciendo el medio viscoso, lo que evita la formación de cristales de hielo que puedan dañar a la célula y reducen los efectos tóxicos de las altas concentraciones de sales y sólidos presentes. Los crioprotectores más utilizados son el dimetilsulfóxido (DMSO), el glicerol, el 1,2-propanodiol.²²



El DMSO es un bioproducto de la destilación del petróleo que tiene una capacidad de penetración en las células elevada a temperaturas superiores a 0°C pero a temperaturas inferiores penetra lentamente. Es un crioprotector altamente utilizado, tiene la capacidad de aumentar la viscosidad de la solución. Las concentraciones a las que se emplea habitualmente son 5% (0.7M) a 10% (1.4M) y por encima de ellas puede producir toxicidad celular perturbando las propiedades de algunas enzimas.

La criopreservación y almacenamiento de SCU en el BSCU del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea se realiza mediante el sistema de congelación controlada y automatizada Bioarchive (termogenesis TG3626) (figura 11), en el cual el almacenamiento es de forma individual en nitrógeno líquido a -196°C. La capacidad de almacenamiento es de hasta 3,626 unidades de 25 ml. de sangre de cordón, registrándose todo el proceso de congelación informáticamente por código de barras.

Este sistema congela de manera controlada hasta dos USCU cada 20 minutos y las almacena de forma automática, minimizando los problemas de congelación, Debido a que es un sistema cerrado, el proceso de enfriamiento se realiza de forma gradual, iniciando el enfriamiento en la fase de vapor de nitrógeno para que después la unidad sea llevada a su lugar de almacenamiento en la fase líquida del nitrógeno sin abrir el sistema, protegiendo a las células congeladas de variaciones comunes de temperatura que se presentan en los tanques convencionales que precisan ser abiertos para insertar o retirar manualmente las USCU.²¹



Una vez adicionado el DMSO se coloca la criobolsa en la bolsa de cuarentena (bolsa de seguridad resistente al N_2L) sellándola y posteriormente la UCPH se introduce en un casett o canister el cual tiene por objeto proteger a la bolsa de congelación antes de la congelación, durante el almacenamiento y en la transferencia entre un congelador y otro; el canister se identifica con una etiqueta metálica resistente al N_2L y la UCPH está lista ahora para su almacenamiento.

El procedimiento después de la adición del DMSO hasta que la unidad es llevada al tanque de N_2L no debe ser muy tardado ya que las células pueden sufrir daños bioquímicos y el traslado del canister con la UCPH hasta la unidad de criopreservación debe de ser en un acumulador congelado para mantener la temperatura a $4^{\circ}C$.

La unidad ya lista para ser criopreservada es dada de alta con el lector óptico de código de barras, el canister que contiene la UCPH se introduce en el congelador de velocidad controlada (CFR), el CFR se introduce en el puerto 1 ó 2 según sea el caso (figura 11), y se inicia el proceso de congelación de forma controlada disminuyendo la temperatura $1^{\circ}C/min$ en la fase posteriormente el brazo robótico removerá lentamente el canister del CFR introduciéndolo lentamente al interior del N_2L y lo transferirá a su lugar de almacenaje (figura 12)



Figura 11: izquierda tanque de criopreservación y almacenamiento de SCU Bioarchive.
Derecha detalle de la introducción de una UCPH en el Bioarchive

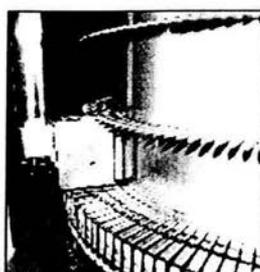


Figura 12: Lugar de almacenamiento de la USCU en el interior del Bioarchive



1.6 APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LA SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL.

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas se ha utilizado en estas tres últimas décadas para reconstituir la hematopoyesis tras tratamientos mieloablativos. Actualmente el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas se utiliza para tratar una extensa variedad de enfermedades hematológicas y no hematológicas, la demostración de su capacidad de implante ha permitido establecerlo como terapia para muchas patologías congénitas o adquiridas del sistema hematopoyético y para las enfermedades quimio o radio sensibles.¹²

La fuente de CPH se ha ido ampliando en estos últimos años, obteniéndose no solo de médula ósea o de sangre periférica movilizada, sino que la fuente más reciente es la sangre de cordón umbilical. El primer trasplante de sangre de cordón umbilical se llevó a cabo en el año 1988 y hasta la fecha se han realizado más de 2 000 trasplantes, habiéndose convertido la SCU en una fuente de células progenitoras hematopoyéticas, alternativa a la tradicional de médula ósea.¹²



1.6.1 El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas procedentes de sangre de cordón.

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas procedentes de cordón umbilical tiene por objeto establecer a largo plazo la reconstitución total del sistema hematopoyético en receptores mieloablativos; constituye una invariable oportunidad para aquellos pacientes, que sufren diversas enfermedades hematológicas y genéticas, principalmente es realizado en niños con peso inferior a 50 kilos, aunque también es posible realizarlo en adultos, si la USCU contiene un número apropiado de células de acuerdo al peso del paciente.^{17,18,24}

Este tipo de terapia alternativa permite conservar la vida del paciente con un nivel aceptable de salud reincorporándolo a sus actividades cotidianas y disminuyendo los gastos que le generan los tratamientos convencionales.

Entre las ventajas de los trasplantes de SCU figuran las siguientes:

- Suficiente cantidad y facilidad de obtención de las células progenitoras hematopoyéticas de la SCU sin riesgo para el donante.
- Mayor seguridad con respecto al trasplante de médula ósea ya que permite la posibilidad de utilizar unidades de SCU no idénticas en el sistema HLA.
- Posibilidad de obtención de las minorías étnicas y raciales.



- Baja prevalencia de ciertas enfermedades transmisibles.
- Disponibilidad casi inmediata de las unidades de SCU ya almacenadas, lo que permite la realización del trasplante evitando retrasos innecesarios .
- Menor capacidad de inducir enfermedad injerto contra huésped (EICH) y por otro lado,.
- Menor costo económico que las búsquedas de médula ósea.
- Evitar someter a un donante (niño/ adulto) sano a una anestesia general para realizar la aspiración de MO.
- Elevado potencial hematopoyético ^{18,27}

Así mismo investigadores del “Duke Comprehensive Cancer Center” han comprobado científicamente por primera vez que las células progenitoras hematopoyéticas provenientes de SCU sometidas a un tratamiento específico son diferenciadas a células cardíacas y estas pueden infiltrarse en tejido cardíaco dañado y reparar el deterioro, este no es el único caso, ya que al ser sometidas a determinados factores de crecimiento, hormonas y otros compuestos, las CPH pueden diferenciarse a células de tejidos específicos tales como cerebro, hígado y hueso. ²⁹



En estos últimos años, ha habido un gran interés en expandir y manipular las células progenitoras hematopoyéticas con el fin de aumentar su potencial terapéutico. Por lo que se espera que en un futuro no muy lejano, las CPH puedan ser usadas como alternativa para enfermedades que en la actualidad son consideradas como incurables.¹²

No cabe duda de que éstos nuevos descubrimientos, marcarán una línea primordial en el campo de las nuevas terapias en medicina. La medicina regenerativa, basada en el uso terapéutico de las células progenitoras hematopoyéticas, podrá controlar y porque no curar enfermedades de tipo degenerativo lo que conlleva al incremento de la esperanza de vida mundial.



CAPÍTULO 2

OBJETIVO.

Establecer cuales son los factores que influyen en la obtención de unidades de células progenitoras hematopoyéticas de cordón umbilical de alta calidad hematopoyética.

Objetivo secundario

Describir los factores que influyen en la eficiencia del proceso de recolección, procesamiento y criopreservación de CPH de cordón umbilical.



CAPÍTULO 3

MATERIAL Y MÉTODOS.

El estudio se realizó en el BSCU del CNTS siguiendo el protocolo recomendado por los estándares internacionales de NETCORD-FAHCT. Se estudiaron un total de 100 unidades que fueron validadas en los procedimientos de recolección, procesamiento y criopreservación de células progenitoras hematopoyéticas,

3.1 Recolección de SCU.

La recolección se realizó en 3 hospitales de la Secretaria de Salud **Hospital de la Mujer, Hospital General de México y Hospital Juárez de México**. El total de las donadoras fue de origen mexicano de diferentes estados de la República Mexicana, teniendo así un registro de unidades con características poblacionales homogéneas.

La metodología empleada para la recolección, de CPH procedentes de sangre de cordón umbilical que se utilizó para este estudio es un método estandarizado de acuerdo al protocolo establecido por NETCORD-FAHCT, la recolección fue realizada por los médicos ginecólogos de las unidades maternas, bajo supervisión de personal capacitado del BSCU-CNTS.



La sangre de cordón umbilical se obtuvo inmediatamente después del nacimiento con la placenta in útero, en pacientes con embarazo a término (entre 34 y 41 SDG) y que cumplían con los criterios de inclusión indicados en la siguientes tabla:

Criterio	Valor de aceptación
Edad	>18años
Semanas de gestación	>34SDG
Tensión arterial	Rangos normales (120/80)

Tabla 1 Criterios de aceptación para donación de SCU

Las donantes fueron pacientes en perfecto estado de salud, sin transfusiones previas en el último año, ni presencia de tatuajes, ruptura prematura de membranas (RPM) no controlada mayor de 4 horas, o temperatura mayor a los 38°C.

3.2 Procesamiento de USCU.

El procesamiento se realizó de forma automatizada siguiendo el protocolo UCB-HES y siguiendo las normas establecidas por los estándares internacionales de NETCORD-FAHCT.



Una vez ingresadas las USCU al BSCU fueron sometidas a las 3 validaciones internas antes de la criopreservación.

- **Validación materna:**

Para poder ser procesadas las unidades recibidas del centro de recolección deben de cumplir la validación materna esto es cumplir con todos los elementos que debe de contener cada kit de recolección y no sobrepasar el tiempo límite que es de 40 horas post recolección:

Material Biológico	Documentos
Sangre de cordón umbilical volumen inicial mayor de 80mL libre de coágulos	consentimiento informado firmado por la donante, el informador y por 2 testigos
fragmento tisular de cordón umbilical	Hoja de sala de parto firmada por el médico responsable
tubo de sangre materna con anticoagulante	
tubo de sangre materna sin anticoagulante	

Tabla 2: Criterios para la validación materna



El volumen inicial de SCU debe ser mayor de 80mL es decir el peso mínimo de la bolsa de recolección con SCU y anticoagulante debe ser mayor o igual a 106g.

Todos los elementos recibidos del centro de recolección, deben de estar perfectamente identificados con el nombre de la donante y numero de historia clínica para evitar posibles errores en la manipulación de las muestras.

- **Validación del procesamiento de la unidad:**

Las medidas utilizadas para controlar la calidad de las USCU procesadas se basan en la caracterización del producto definiendo el contenido celular, el contenido total y viabilidad de las CPH y % de recuperación, así como HLA, grupo sanguíneo ABO/Rh y esterilidad del producto final. Los criterios a los que nos apegamos son:

Parámetro	Valor
Cuenta inicial de CN	$7-20 \times 10^6 / \text{mL}$
Volumen recolectado	>80mL
CN totales iniciales	$>8 \times 10^8$
CD34+ totales y viabiles	0.1-0.30%
% de recuperación	>60%

Tabla 3 Criterios cuantitativos para la validación de USCU



Así mismo realizamos estudios en donde comprobamos la esterilidad del producto final, realizando cultivos aerobios y anaerobios como control microbiológico, comprobando que la USCU se encuentra libre de contaminación.

- **Validación de la inocuidad de la USCU por Serología:**

Las actividades de un banco de sangre se encaminan a asegurar la liberación de unidades de sangre segura para su utilización terapéutica, el BSCU no es la excepción a esta regla, por lo que a todas nuestras USCU procesadas, se les realizaron los estudios serológicos que por norma se realizan a la sangre y sus derivados (NOM-003-SSA2-1993) realizando estudios de: Hepatitis B, Hepatitis C, Virus VIH, Sífilis, y toxoplasmosis. Por lo que aseguramos que la sangre que congelamos esta en condiciones óptimas para su utilización.

3.3 Criopreservación de UCPH.

Una vez que las UCPH fueron validadas son sometidas al procedimiento de congelación controlada en nitrógeno líquido a -196°C por el sistema Bioarchive (Thermogenesis TG3626) controlando de esta forma el tiempo de congelación y utilizando un crioprotector (DMSO) para mantener la integridad de las CPH.

El contenido final de las UCPH ya congeladas es de 10% de DMSO, 1% de Dextran 40 y 0.8% de Hespan.



En la figura 13 se muestra el diagrama compacto del procesamiento general de CPH

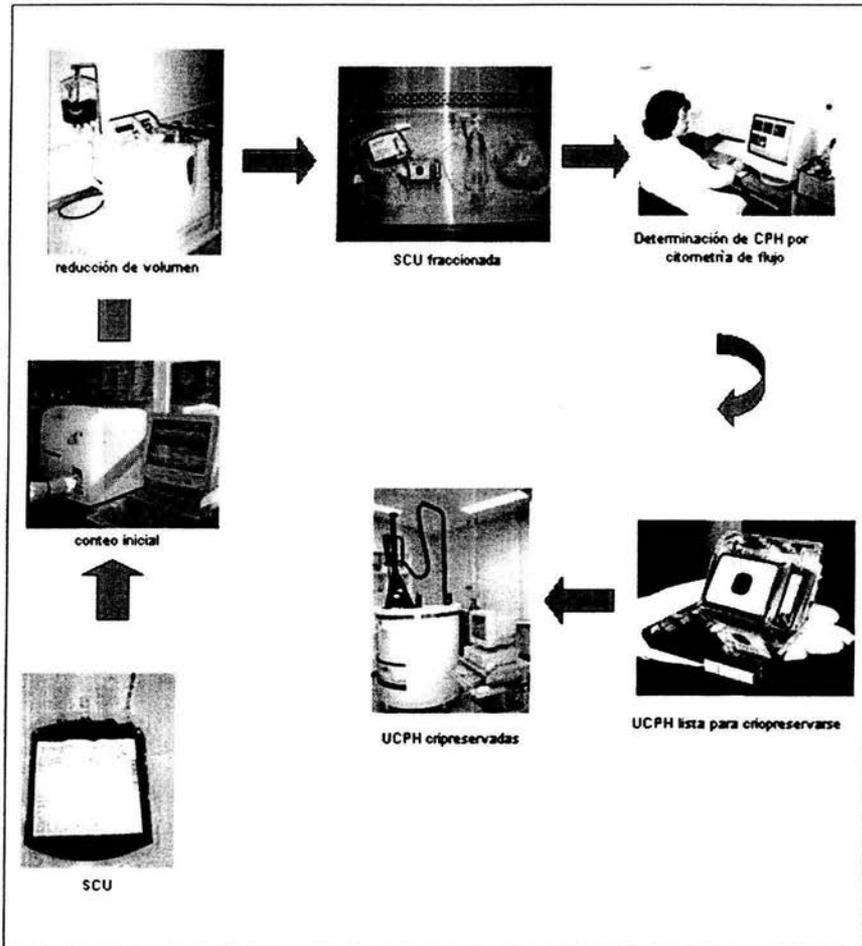


Figura 13 Procesamiento y criopreservación de CPH



3.4 Estudio estadístico

Los factores que se consideraron críticos para este estudio y que fueron los incluidos en el análisis estadístico son:

Factores neonatales	Características de la USCU	Otros
Peso del recién nacido	mL de SCU	Unidad materna
Sexo del recién nacido	% CD34+ Totales	Tiempo del procesamiento
	%CD34+ viables	
	CD34+ Totales	
	CD34+ viables	
	Glóbulos blancos totales iniciales	
	Glóbulos blancos totales finales	

Tabla 4: factores de estudio

Se realizó el análisis a partir de redes bayesianas, las cuales consisten en una representación gráfica acíclica de dependencias probabilísticas, las cuales están formadas por nodos y flechas (figura 14), en la cual cada nodo representa una variable y cada flecha una dependencia probabilística la cual determina la probabilidad condicional de cada variable dadas las variables antecesoras.

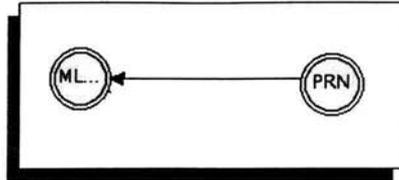


Figura 14: Red Bayesiana

En donde: PRN (peso del recién nacido) = variable independiente

ML (mililitros)= Variable dependiente

La variable hacia la que apunta la flecha es dependiente, de la que se encuentra en el origen de la flecha, por lo que la estructura global de la red nos da la información de dependencia e independencia condicional del conjunto de variables.

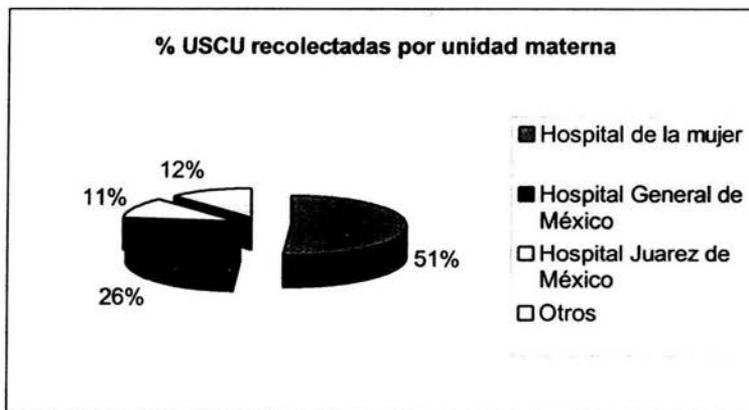
En este contexto, las redes Bayesianas nos permitieron conocer las relaciones de causa y efecto entre factores en estudio a partir del cálculo de probabilidades, y por lo tanto definir la influencia que ejerce un factor sobre otro en la red global.



CAPÍTULO 4

RESULTADOS.

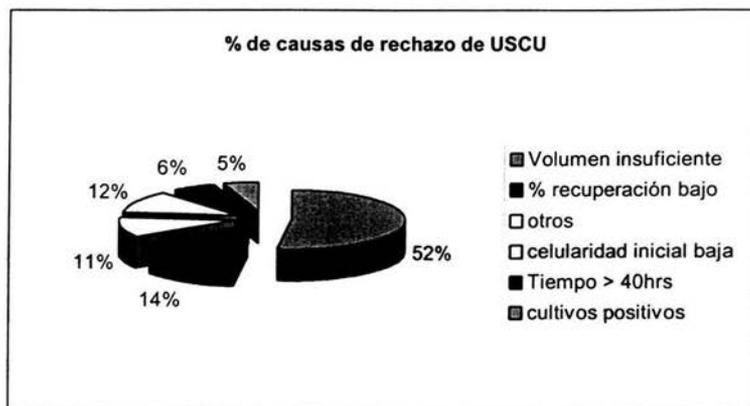
Desde su creación hasta el 31 de Enero del 2004 el BSCU del CNTS recibió 273 USCU de las cuales el 88% provenían de 3 hospitales de la secretaría de salud (gráfica 1), de estas solo 100 unidades reunieron los requisitos técnicos para ser procesadas. y fueron validadas para trasplante.



Gráfica 1. % USCU recolectadas por unidad materna



Las causas de exclusión de las 173 unidades fueron:



Gráfica 2: % de causas de rechazo USCU

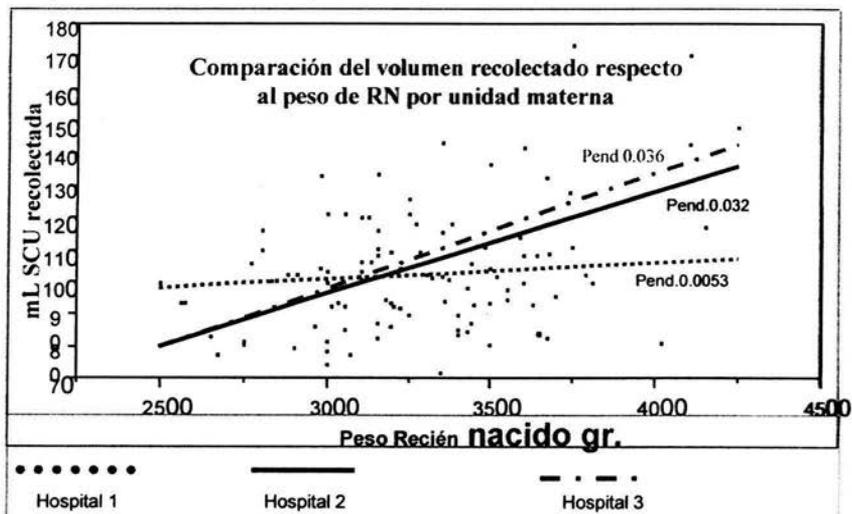
La validación de las 100 UCPH se realizó conforme a los parámetros establecidos por NETCORD-FAHCT, de acuerdo a los estudios realizados se encontraron los siguientes valores promedio de las 100 muestras validadas para trasplante con respecto a los criterios de aceptación establecidos:

	Valor promedio	Criterio de aceptación
Células nucleadas iniciales/mL	11.X10 ⁵	7-20X10 ⁵
Volumen recolectado (mL)	104.0	80
Células nucleadas totales iniciales	10.26X10 ⁸	>8X10 ⁸
%CD34+ Totales	0.31%	0.1-0.3%
%CD34 Viables	0.30%	0.1-0.3%
%Recuperación	80.63%	>60%

Tabla 5: valores promedio obtenidos por UCPH



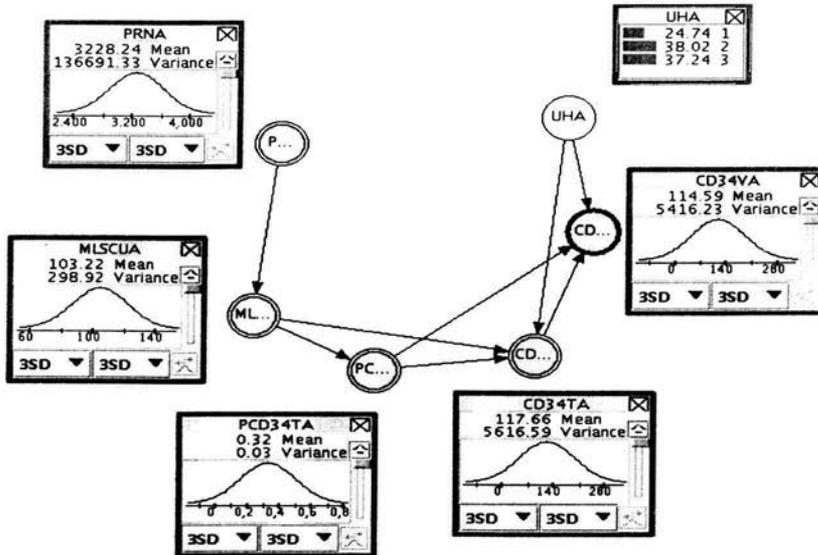
El desempeño que ha tenido el BSCU-CNTS desde su inicio, fue comprobado no solo con la comparación con los valores establecidos por la normatividad, sino con respecto al procedimiento efectuado por las unidades maternas participantes (gráfica 3), esta comparación fue respaldada por un análisis Bayesiano a partir de la correlación de una variable discreta (unidad materna), con las variables continuas: mL recolectados, peso del recién nacido, y contenido celular obtenidos por cada unidad materna (gráfica 4) esto con el fin de encontrar factores del procedimiento de recolección, procesamiento y criopreservación que influyeran en la obtención de unidades de calidad hematopoyética; de estos estudios se encontró una relación directa entre las diferentes unidades maternas y los criterios de validación (gráfica 4) que nos permitieron evaluar los procesos ejecutados por el BSCU.



Gráfica 3: Comparación del volumen recolectado respecto al peso de RN por unidad materna

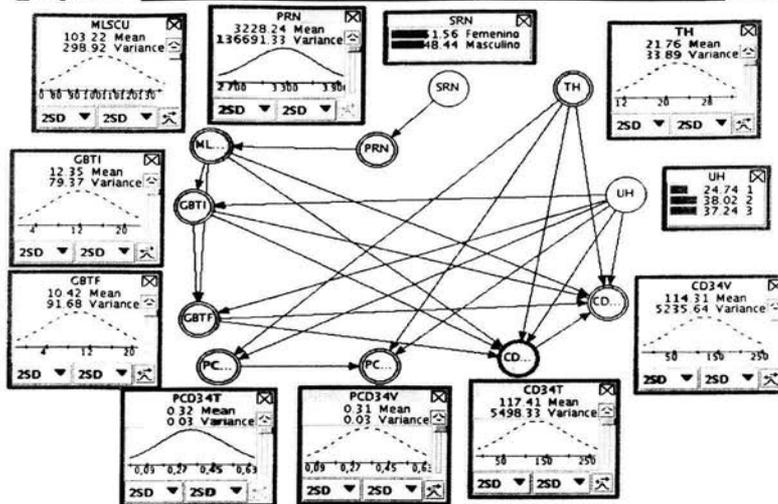


Se incluyeron dentro de otra red Bayesiana global (gráfica 5) una serie de factores generados del nacimiento y del procesamiento, con el fin de intentar establecer sus posibles relaciones de causalidad, el calculo de la red se realizó a partir de probabilidades a priori de los factores y de las probabilidades conjuntas entre los mismos. El calculo involucra probabilidades condicionales de todos los factores con relación a los factores que los definen en la red global, estableciendo las mejores y mas probables relaciones que son las que se muestran.



Gráfica 4 Análisis Bayesiano de correlación de las unidades maternas y cuentas celulares

Peso del recién nacido (P), mL de SCU recolectada (mL), Porcentaje de CD34+ totales (PCD34TA), CD34+ Totales (CD34T), CD34+ viables (CD34VA), Unidad materna (UHA)



Gráfica 5 Análisis Bayesiano global de la correlación de los factores neonatales y los factores generados del procesamiento
Peso del recién nacido (PRN), Sexo del recién nacido (SRN), mL de SCU recolectada (mL), glóbulos blancos totales iniciales (GBTI), glóbulos blancos totales finales (GBTF), Porcentaje de CD34+ totales (PCD34TA), Porcentaje de CD34+ viables (PCD34V) CD34+ Totales (CD34T), CD34+viables (CD34V), Unidad materna (UH), Tiempo en horas (TH)



CAPÍTULO 5

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los valores promedio obtenidos para cada uno de los criterios evaluados demuestran que los procedimientos de recolección, procesamiento y criopreservación, de las unidades recolectadas por el BSCU-CNTS son realizados de la forma establecida ya que estos se encuentran dentro de los límites que establece NETCORD-FAHCT, por lo que aseguramos que las unidades congeladas son de alta calidad y que se encuentran en condiciones aptas para ser trasplantadas cuando se requieran.

De acuerdo a lo anterior es importante puntualizar que no todas las unidades que son transferidas al BSCU-CNTS, son congeladas, ya que un gran porcentaje de muestras es excluido del protocolo, esto es debido a que las unidades congeladas deben de cumplir con los criterios establecidos.



La mayor causa de exclusión con una incidencia del 52% se refiere a un volumen recolectado insuficiente (gráfica 2), situación que nos llevó a analizar los datos generados, realizando una grafica que relacionará los valores de volumen y peso del recién nacido (variables directamente proporcionales) con respecto a las unidades maternas por lo que al analizar la gráfica 3 se encuentra una tendencia que solo siguen la unidad materna 2 y la unidad materna 3; al presentarse una desviación en la unidad materna 1, se demuestra que la unidad materna es un factor que influye directamente en variaciones en los volúmenes recolectados de SCU lo que genera diversidad en la cantidad de CPH obtenidas y por lo tanto en la calidad hematopoyética de las unidades recolectadas.

Lo anterior fue demostrado a través de una Red Bayesiana constituida por 6 nodos (gráfica 4), en torno al volumen recolectado por unidad materna respecto a los valores celulares obtenidos, encontrándose que el factor unidad materna sigue un patrón sistemático de la recolección de USCU el cual influye de forma directa en la cuenta total de CD34+ Totales y CD34+ Viabiles obtenidas y que varia dependiendo de la unidad de recolección encontrando mejores resultados para la unidad materna 2.

De igual forma, se realizó una red Bayesiana global que incluyó no solo factores neonatales y derivados de la unidad materna, sino todos los elementos generados del procesamiento celular, de esta forma localizamos la influencia directa tanto del volumen recolectado en la unidad materna, como de la misma unidad materna, y del tiempo que transcurre entre la recolección y el procesamiento sobre los valores de



conteo celular es decir sobre glóbulos blancos totales iniciales y finales, porcentaje de CD34+ totales y viables y valores de CD34+ totales y viables.

El tiempo promedio entre la recolección y el procesamiento de las muestras es de 22 horas, y es importante mencionar que existe una relación franca entre el tiempo y la recuperación celular por lo que encontramos que entre mayor tiempo pasa en realizarse el procesamiento, menor cantidad de células podrán recuperarse.



CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

Los resultados generados; del procesamiento de las 100 unidades validadas para trasplante no solo mostraron concordancias con los criterios preestablecidos a nivel internacional, sino que mostraron un nivel mayor a lo especificado, señalándonos que las unidades recolectadas son de excelente calidad hematopoyética.

Es importante enfatizar que el volumen obtenido es un punto crítico que influye de forma muy específica en las cuentas celulares, por lo que es recomendable estandarizar el volumen recolectado en todas las unidades maternas, a un volumen en el cual se tenga el conteo celular deseado proponiendo como estándar 104mL, de esta forma podremos evitar la variabilidad y por lo tanto disminuir la influencia de un factor que es posible controlar al tomar la muestra, así mismo al encontrar que el peso del recién nacido es directamente proporcional al volumen recolectado, es recomendable recolectar USCU de neonatos de peso alto.



De acuerdo al análisis Bayesiano, encontramos que el tiempo promedio que transcurre entre recolección y procesamiento, es de vital importancia para obtener unidades de sangre de cordón umbilical con cuentas altas de células CD34+, de esta forma se pretende reducir el tiempo a menos de 22 horas para mejorar la recuperación celular.

Así mismo el análisis Bayesiano también nos permitió establecer que la **unidad materna** es un factor decisivo en la obtención de **USCU de alta calidad** hematopoyética, situación que pone a la cabeza a la unidad materna 2 al demostrar con la homogeneidad de sus **USCU** recolectadas que el optimizar la recolección de **SCU** es el punto clave para fortalecer los procedimientos del **BSCU**.

Podemos concluir que en base a estos análisis estadísticos, se pudo establecer la evidencia del impacto real de los factores generados de la unidad materna sobre los factores generados del procesamiento, estableciendo que la variable más alterable es la cuenta de **CD34+** influida de forma directa por los factores: peso del recién nacido, volumen recolectado, unidad materna y tiempo entre la recolección y el procesamiento. Por lo que la propuesta final corresponde a una estandarización más estricta de las características del donante en cuanto a peso y volumen de sangre obtenida; reducir el tiempo entre recolección y procesamiento, y optimizar las metodologías empleadas en la unidad materna 1 y 3 con el fin de llevarlas al nivel establecido en la unidad materna 2 para disminuir el efecto de variación por **unidad materna**.



De acuerdo a lo anterior el BSCU-CNTS en conjunto con sus unidades maternas participantes están comprometidos en manipular USCU que solo cumplan con los parámetros establecidos con el fin de congelar únicamente unidades de alta calidad para su utilización en trasplante no emparentado.



REFERENCIAS

1. AMAT LI. **“La Sangre de cordón umbilical una nueva fuente de progenitores hemopoyéticos para trasplante. Análisis de nuestra experiencia en la recolección y procesamiento”**; prog obst Gin 1996;39;pags 571-579
2. BONNET; **“Haematopoietic steam cells”**; J Pathol 2002; 197; 430-440
3. BERKOW R.; **“El Manual Merck de diagnóstico y terapéutica”**; Ed. Doyma; 8º Edición; España; 1989; págs 367,368 y 1923-1927
4. CALDERON E.; **“Los bancos de sangre de cordón Umbilical, la normativa internacional y su situación actual en la República Mexicana”** Gac Med Mex Vol 139 suplemento N 3, 2003 Págs. s101-s103
5. **Estándares internacionales NETCORD-FAHCT para la recolección, procesamiento, pruebas, almacenamiento, selección y exclusión de Sangre de Cordón umbilical**
6. GARCIA J, QUEROL S; **“Los bancos de sangre de cordón umbilical: una nueva contribución al tratamiento de las enfermedades hematológicas”**; Acta científica y tecnológica; vol 3; 2001; Págs. 10-13
7. GARCIA J; **“News NETCORD letter”**; Vol 1; 2003; págs 1-4
8. GUYTON A.; HALL E.; **“Tratado de fisiología Médica”**; Ed Mc Graw Hill; Novena edición; Mex; 1997; págs 467-469
9. INDRIKOV S A.; **“Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical”**; Gac Med Mex Vol 138 suplemento N 1, 2002 Págs. s130-s132
10. LARRY C, LASKY; **“Marrow and steam cell processing for transplantation”**; American Association of blood banks; Bethesda Maryland; 1995; págs 51-64
11. MARTÍNEZ C.; **“El Banco de células madre hematopoyéticas de cordón umbilical para trasplante”**; Gac Med Mex Vol 139 suplemento N 3, 2003 Págs. s93-s98
12. MIÑANA M; CARBONELL F **“Sangre de cordón Umbilical como fuente de células madre hematopoyéticas para trasplante”**; Clonación y trasplantes; Págs. 74-89



13. ORKIN S; **"Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages"**; Nature Reviews; vol 1; 2000; págs 57-64
14. QUEROL S; **"El trasplante de cordón: Desde el laboratorio a la clínica"**; Gac Med Mex Vol 139 suplemento N 3, 2003 Págs. s107-s109
15. QUEROL S; **"Indicadores de calidad en el Banco de Cordón"**; Gac Med Mex Vol 139 suplemento N 3, 2003 pags s98-s100
16. QUEROL S.; **"Expansión ex-vivo de progenitores hematopoyéticos de sangre de cordón umbilical para trasplante"** ; Tesis Doctoral; universidad autónoma de Barcelona; pags 25-32
17. RANDAL K; **"Cord blood units collected at a remote site: collaborative endeavor to collect umbilical cord blood through the Hawaii Cord blood bank and store the units at the Puget Sound Blood Center"**; Transfusion; vol 44; 2004; págs 111-118
18. RYUJI N, TSUTOMU W; **"Analysis of maternal and neonatal Factors that influence the nucleated and CD34+ cell yield for cord blood banking"**; Transfusion; vol 44; 2004; págs 262-267
19. SEPAX **"Sistema de procesamiento celular Manual de operación"**
20. **"Salvan a un niño con el primer injerto de células madre"**; ciencias crónica; 2004
21. Thermogenesis **"Bioarchive system operator's manual"**
22. TORRADADELLA M; **"Criopreservación Celular"**; Gac Med Mex Vol 138 suplemento N 1, 2002 Págs. s128-s129
23. TORRICO C.; **"El proceso del banco de sangre de cordón umbilical"**; Gac Med Mex Vol 139 suplemento N 3, 2003 pags s96-s98
24. WOGNUM; **"Hematopoietic stem cells"**
25. ZINGSEM J; **"Cord Blood processing with an automated and functionally closed system"**; Transfusion; vol 43; 2003; págs 806-813
26. <http://www.facmed.unam.mx/amp/eventos.html>
27. <http://www.biosafe.ch/cms/includes/pbsct.pdf>
28. <http://www.donantesmalaga.org/cursos/c02p03.htm>



29. <http://www.dukemednews.org> "Cord Blood Cells proven to differentiate into heart muscle and brain cells"
30. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0367-47622002000200002&lng=es&nrm=iso
31. <http://www.diariomedico.com/edicion/noticia/0,2458,222845,00.html>
32. http://www.embrios.org/celulasmadre/medicina_reparadora.htm