



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MANUAL DE  
CRIOPRESERVACIÓN DE  
CÉLULAS PROGENITORAS  
HEMATOPOYÉTICAS**

**INFORME DE PRÁCTICA PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**J AVIER BAUTISTA JUÁREZ**



**EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA**

**MÉXICO, D.F.**

**2004**





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.

**Jurado asignado:**

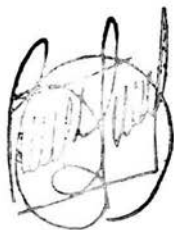
Presidente Profesora María Dolores Lastra Azpillicueta  
Vocal Profesor Ana Esther Aguilar Cárdenas  
Secretario Profesor Carlos Martínez Murillo  
1er suplente Profesora Mónica Berenice Heras Chavarria  
2do suplente Profesora José Ignacio Páramo Ramírez

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio de Criopreservación del Banco Central de Sangre del Centro Médico  
Nacional Siglo XXI, IMSS

Asesor del tema:

Carlos Martínez Murillo



Sustentante:

Javier Bautista Juárez



## INDICE

	Página
Abreviaturas.....	i
Introducción.....	1
Objetivos.....	9
Objetivo general.....	9
Objetivo particular.....	9
I. Procedimiento de criopreservación de células progenitoras hematopoyéticas (CPH's).....	10
1.1 Generalidades.....	10
1.2 Principios del procedimiento.....	12
1.3 Observaciones.....	14
1.4 Procedimiento (primera parte).....	15
1.5 Procedimiento (segunda parte).....	19
1.6 Equipo, material y reactivos.....	22
II. Cosecha de sangre de cordón umbilical.....	25
2.1 Generalidades.....	25
2.2 Método.....	25
2.2.1 Preparación del material.....	25
2.2.2 Captación de donadora en la sala de labor.....	26
2.2.3 Asepsia de la zona de punción.....	26
2.2.4 Captación de donadora en la sala de expulsión.....	27
2.3 Material.....	28
III. Criopreservación de sangre de cordón umbilical (SCU).....	30
3.1 Método.....	30
3.2 Proceso de criopreservación.....	31
IV. Reinfusión de CPH's almacenadas en el BS CMN.....	37
4.1 Procedimiento.....	37
V. Filtración de concentrados eritrocitarios.....	40
5.1 Generalidades.....	40

5.2 Procedimiento .....	41
5.3 Equipo, material y reactivos .....	43
VI. Fraccionamiento de hemocomponentes con el conector estéril .....	44
6.1 Generalidades .....	44
6.2 Procedimiento .....	44
6.3 Material .....	45
VII. Control de calidad de productos leucorreducidos .....	46
7.1 Generalidades .....	46
7.2 Equipo para los procedimientos .....	47
VIII. Cultivo celular hematopoyético .....	50
8.1 Generalidades .....	50
8.2 Procedimiento .....	51
8.3 Equipo, material y reactivos .....	52
IX. Determinación de CD34 por citometría de flujo .....	54
9.1 Generalidades .....	54
9.2 Procedimiento .....	55
Anexo I .....	56
1. Preparación de reactivos y soluciones .....	56
1.1 Azul de tripano al 0.4% .....	56
1.2 Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) .....	58
1.3 Solución criopreservante con dimetilsulfóxido (DMSO) .....	60
1.4 Solución criopreservante con DMSO-Dextran 40 .....	62
1.5 Solución de hidroxietilalmidón (HES) .....	65
1.6 Solución criopreservante control .....	68
2. Preparación del equipo .....	69
2.1 Asepsia de la campana .....	69
3. Preparación del material biológico .....	71
3.1 Viabilidad celular .....	71
Anexo II .....	73
1. Formato de recepción de Células de Cordón Umbilical (CCU) .....	73
2. Hoja de trabajo para el control de calidad de productos	

leucorreducidos.....	74
3. Hoja de uso de la Campana de Flujo Laminar Bio II-A.....	75
4. Formato para la determinación de grupos sanguíneos y factor R <sub>h</sub> O(D) en donadores.....	76
5. Hoja de resultados.....	77
6. Hoja de control de calidad de CPH's.....	78
Bibliografía.....	79

## Abreviaturas

<b>BCS CMN SXXI</b>	Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo Veintiuno
<b>BH</b>	Biometría hemática
<b>CCU</b>	Células de cordón umbilical
<b>CD34</b>	Marcador para HLA 34
<b>CD45</b>	Marcador para HLA 45
<b>CE</b>	Concentrado eritocitario
<b>CEYE</b>	Central de esterilización y equipos
<b>CF</b>	Citometría de flujo
<b>CMN</b>	Células mononucleares
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>CNT</b>	Células nucleares totales
<b>CPD</b>	Anticoagulante Citrato-Fosfato-Dextrosa
<b>CPH's</b>	Células progenitoras hematopoyéticas
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>EDTA</b>	Etilen-diamino tetracético
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunoenzimático
<b>g</b>	Gramos
<b>G</b>	Gravedad
<b>HES</b>	Hidroxietil-almidón
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano
<b>INC</b>	Instituto nacional de cancerología
<b>mL</b>	mililitros
<b>N<sub>2</sub>L</b>	Nitrógeno líquido
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfatos
<b>RN</b>	Recién nacido
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto
<b>SCU</b>	Sangre de cordón umbilical
<b>SSI</b>	Solución salina isotónica
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana

## Introducción

Los trasplantes de médula ósea se iniciaron hace más de tres décadas como una actividad para tratar enfermedades mayormente malignas. Sin embargo, hoy en día se considera tratamiento de elección para una variedad de enfermedades tanto malignas como no malignas.

La complejidad de establecer un programa de trasplante de médula ósea y de células hematopoyéticas totipotenciales en sangre periférica (CHTSP), depende de los objetivos del programa médico y de las facilidades existentes en cada institución.<sup>3,9</sup>

Los costos de la medicina moderna conllevan a nuevos desafíos en el campo de la hematología y requiere la evaluación objetiva de los parámetros clínicos vigentes así como la investigación de nuevas fronteras prácticas en la ética transfusional. En la práctica, los programas de control de calidad deben articular y demostrar en forma efectiva el cometido institucional con respecto al acatamiento de leyes y normas internas, nacionales e internacionales. En otras palabras; "el afán de hacer las cosas bien, en forma ética y correcta".<sup>4</sup>

La gran cantidad de centros hospitalarios donde se realiza la extracción y reinfusión de CHTSP y de médula ósea, se verá ahora controlada por las leyes de la Secretaría de Salud (Norma Oficial Mexicana) que autorizará realizar estos procedimientos únicamente a bancos de sangre que reúnan los puntos necesarios en cuanto equipo y personal que aseguren la calidad de estos. Estos procedimientos de recolección de suficientes células germinales para efectuar un trasplante se puede realizar mediante el método original de Thomas, consistente en la aspiración de médula ósea a través de punciones seriadas en las crestas ilíacas del donante o mediante aféresis repetidas de sangre periférica.<sup>9</sup>



El sistema de Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA) y el conocimiento de sus moléculas de clase I y II ha permitido el actual desarrollo del injerto alógeno.<sup>4</sup> Se ha reconocido desde hace tiempo que la disparidad dentro del sistema HLA representa una importante barrera para el éxito del trasplante, por lo que es necesario la similitud HLA y la compatibilidad entre el donante y el receptor del injerto para prevenir la Enfermedad Injerto Contra Hospedero (GvH). Sin embargo cierto grado de rechazo sigue siendo un problema común para los receptores de estos injertos a pesar del acondicionamiento inmunosupresor.

En cuanto la inmunohematología de la serie roja, es importante la tipificación para el sistema ABO para disminuir reacciones provocadas por la incompatibilidad mayor y menor post-infusión, ya que si se detectara alguna diferencia, se tendrían que realizar los títulos de aglutininas y de hemolisinas tanto en el donador como en el receptor para saber así, el momento de la realización de plasmaféresis del receptor o del donador para disminuir el grado de las reacciones por este sistema sanguíneo, así como la tipificación de otros sistemas inmunogénicos tanto del donador como del receptor para evitar la aloinmunización de antígenos como: CDEce, P1, Lewis, Kell, Duffy y Kidd. Realizando también una detallada investigación de anticuerpos tanto en donador como en receptor para recomendar plasmaféresis en caso de ser necesario.<sup>5, 43, 48</sup>

La obtención de precursores hematopoyéticos a partir de la médula ósea (MO) es un procedimiento estandarizado por Thomas y colaboradores en 1970. El número de células a recoger dependerá del tipo de procesamiento posterior de la MO. En general, se trabaja con cifras de  $2.5 \times 10^8$  CT/Kg para trasplante autólogo en que no haya tratamientos *in vitro* posteriores, y de  $4.5 \times 10^8$  en el caso de que sí los haya. Los volúmenes obtenidos suelen oscilar entre 10-20 mL/Kg del receptor/paciente. Las complicaciones de una recolección de MO son muy raras y, en general, están asociadas a la anestesia general. Complicaciones graves con riesgo de vida se han visto en el 0.27% de 3,290 extracciones.<sup>26, 64, 65</sup>

Obviamente en todos los casos habrá dolor local durante unos días. A consecuencia del procedimiento puede producirse anemia cuando es necesario recoger grandes cantidades de MO. Lo cual puede corregirse transfundiéndose concentrados eritrocitarios, autólogos si fuera posible. Una alternativa al trasplante de MO es el trasplante de células madre o totipotenciales hematopoyéticas de sangre periférica (CTHSP). En este caso la obtención se hace por hemaféresis. Los separadores celulares pueden ser de flujo continuo o de flujo discontinuo. La cantidad de progenitores mieloides (CFU-GM) en sangre periférica es de 10 a 100 veces inferior a la de la MO, pero es posible recogerlos en cantidades suficientes usando separadores celulares. El número de CFU-GM necesario para garantizar un injerto es incierto, y variable por las distintas técnicas utilizadas para su detección. Así, las cifras oscilan entre  $0.6 \times 10^4$  CFU-GM/Kg (Kessinger),  $19.7 \times 10^4$  CFU-GM/kg (Reiffers) y  $25 \times 10^4$  CFU-GM/Kg (To y Juttner). Ciertos equipos consideran aconsejable infundir un mínimo de  $7-8 \times 10^8$  CMN/Kg aunque el número de progenitores puede ser muy variable en esa muestra.<sup>1, 5, 43</sup>

Para el éxito de buenas cosechas durante el procedimiento de aféresis, la capacidad de los factores estimulantes de colonias permite la recolección de células totipotenciales de sangre periférica sin las complicaciones derivadas de la toxicidad por quimioterapia aumentando hasta 100 veces los valores basales de las CTHSP. La combinación de quimioterapia y factores estimulantes de colonias aumenta las CTHSP entre 60 y 200 veces su valor basal.<sup>65</sup>

La determinación de las CTHSP en el donador y en el producto a administrar, asegura un trasplante con mayor posibilidad de éxito, para lo cual existen varios métodos, el más sencillo y utilizado es la cuantificación de las células mononucleares (CMN) totales, donde se incluye a las células progenitoras. El número blanco de células CD34 puede variar, para todos los trasplantes alogénicos es usual extraer por lo menos  $2 \times 10^6$  células CD34 /Kg de peso corporal del receptor; para la infusión autóloga por lo menos  $1 \times 10^6$  células CD34 /Kg.<sup>65</sup>

Si la médula requiere depuración de células tumorales o linfocitos T, se necesitan  $4-6 \times 10^8$  células nucleadas/Kg. Por ejemplo, si un procedimiento de aféresis recolecta  $4 \times 10^8$  CMN/Kg,  $4.4 \times 10^5$  serán UFC-GM/Kg; y para el caso de  $4 \times 10^6$  serán CD34+/Kg.

En condiciones normales, el número de células progenitoras circulantes es menor del 0.5%.<sup>42</sup> Sin embargo en donadores estimulados la forma de cuantificar las CMN es en un contador celular, en el cual se deberá realizar una prueba directa y una prueba con la muestra diluida 1:10 para corroborar resultados. Tanto de una muestra directa del donador, recolectada en un tubo con EDTA o con heparina, así como del producto colectado por aféresis debe de tener un hematocrito de 25 a 35%.<sup>1,5</sup>

*Concentración y purificación de productos.* Cuando se habla de concentración y purificación de células madre hematopoyéticas, generalmente nos referimos a un enriquecimiento de células nucleares (CN) o de la fracción de células mononucleares (CMN), donde se encuentran las células progenitoras hematopoyéticas. Los diferentes métodos tienen como objeto la eliminación de células indeseables o inútiles, para conseguir que en un volumen menor, aumente la proporción de dichas células mononucleares.<sup>26, 64</sup>

*Reducción de volumen.* Repercute directamente en el consumo de reactivos y material a utilizar, el DMSO a inyectar finalmente al paciente y la cantidad de espacio destinado a almacenamiento.<sup>26</sup>

*Reducción de hematíes.* Habitualmente en el trasplante es conveniente reducir la masa eritrocitaria, fundamentalmente para disminuir la difusión al paciente de grandes cantidades de hemoglobina libre y el riesgo de reacciones transfusionales y de aloinmunización.

La eliminación completa de hematíes no es siempre preceptiva, pero es imprescindible en el caso de trasplante alogénico con incompatibilidad mayor donante-receptor ABO, donde puede producirse una hemólisis intravascular.

En el caso de que el producto vaya a recibir un tratamiento *ex vivo* los hematíes pueden interferir en la acción específica de la droga, por lo que suele estar indicado un hematocrito previo a tratamiento que oscila entre un 1 a 5%.

*Eliminación de polimorfonucleares.* Estas células que se lisan durante el proceso de congelación, pueden producir fenómenos de agregación por liberación enzimática en el proceso de la descongelación, con pérdida secundaria de células o interferir igualmente en el tratamiento *ex vivo*.<sup>26, 42, 43</sup>

*Purificación de CMN.* La elección de este método es preceptiva en el tratamiento *ex vivo* y puede ser aconsejable en caso de receptores pediátricos o si existen problemas en la disponibilidad de almacenamiento. Existen diferentes métodos de separación de células nucleares, y que pueden ser de tipo manual o automático.

*Concentración de células nucleares.* Se efectúa una extracción parcial de glóbulos rojos y plasma sobrenadante con el fin de aumentar la concentración de CN y disminuir el volumen inicial del producto, que facilitará su posterior tratamiento, congelación y administración.

*Purificación de células mononucleares.* La purificación de estas CMN, tiene como objeto eliminar glóbulos rojos (Hto menor de 1%), polimorfonucleares contaminantes y lograr una reducción máxima de volumen.<sup>26</sup>

### *Técnicas de remoción y expansión celular*

*Depleción de células T.* El rechazo injerto contra hospedero, y el uso de donantes no relacionados HLA han renovado el interés por la depleción de las células T. Todo método de depleción de células T debe ser capaz de alcanzar el nivel deseado de depleción, por lo general menor de  $1 \times 10^5$  células T/Kg. Desde una carga inicial máxima anticipada de células T. <sup>10, 13</sup>

Los métodos para eliminar las células T comprenden protocolos basados en, anticuerpos mononucleares (CD3, CD5, CD2, CD8) los cuales pueden ser inmovilizados en fase sólida que comprenden placas de poliestireno; partículas de sefarosa y microesferas, partículas o coloides paramagnéticos. Con aglutinación por lectina de soja (SBA, soybean lectin agglutination), o sin ella. La depleción de glóbulos rojos se alcanza primero con ficoll-hypaque o sedimentación gravitacional con hidroxietilalmidón o gelatina. Y otras como: depleción de rosetas E y decantación por contraflujo. <sup>13, 15</sup>

*Depleción de células tumorales.* Las técnicas de depuración, que dependen de la discriminación entre las células malignas y precursoras normales que se desarrollaron primariamente para la MO, pero se están usando en forma creciente para la sangre periférica. En algunas afecciones, la separación aprovecha los antígenos de superficie celular presentes en las células tumorales y no en las "stem cells". <sup>64</sup>

*Requerimientos clínicos.* Un agente depurador, inmunológico o farmacológico, debe tener las siguientes propiedades: 1) El agente debe exceptuar las células hematopoyéticas necesarias para la recuperación hematológica luego del tratamiento con altas dosis; 2) El agente debe ser capaz de matar células tumorales durante la breve exposición usualmente disponible antes de la criopreservación, y 3) El agente no debe ser tóxico en infusión cuando las células medulares se reinfunden o se debe poder eliminar. <sup>18, 40</sup>

*Selección de células CD 34+*. Las células T no deseadas o las células malignas se pueden disminuir en forma efectiva en los preparados de "stem cells" mediante la selección positiva de células CD 34+. Diversas técnicas inmunofísicas pueden efectuar una disminución de 100 veces en el número total de células y una disminución de 1000 veces (3 logs) en las células T o en las malignas.<sup>18</sup>

*Técnicas de expansión "ex vivo"*. Se han desarrollado sistemas de cultivo que permiten a las células hematopoyéticas tempranas proliferar y diferenciarse en un ambiente *ex vivo*. Estos sistemas se pueden clasificar en dos categorías: 1) cultivos de MO, en los cuales una mezcla de células accesorias soporta el crecimiento de las poblaciones precursoras y, 2) cultivos en los cuales un medio enriquecido con citocina soporta la multiplicación de los progenitores.<sup>10, 26, 43</sup>

La utilización de "stem cells" para restablecer las funciones hematopoyéticas en pacientes sometidos a altas dosis de quimio y radioterapia, tiene como requisito fundamental la conservación de los precursores hematopoyéticos en condiciones óptimas que garanticen su almacenamiento durante el tiempo que sea necesario, sin la pérdida de sus capacidades de autorregulación y diferenciación, cuyo método más idóneo es la criopreservación.

El DMSO (10%) ha mostrado ser un crioprotector valioso para muchas células y tejidos. La rápida penetración del DMSO minimiza las tensiones osmóticas asociadas con su introducción y remoción, y las concentraciones de 1.5 M o menos parecen ser relativamente no tóxicas. La temperatura de almacenamiento debe ser suficientemente baja (-196° C) como para limitar el hielo extracelular, que puede ocasionar lesión por deshidratación.<sup>27</sup>

La concentración de células nucleares suele ajustarse antes de la criopreservación a  $3-4 \times 10^7$  por mL, pero se han congelado concentraciones de  $3 \times 10^8$  sin efectos adversos.<sup>26, 43</sup>

Los trasplantes de células tallo, hoy en día, se consideran el tratamiento de elección para una variedad de enfermedades tanto malignas como no malignas. En una era en que los recursos económicos son limitados y los programas de calidad son una necesidad en todos los laboratorios; los administradores de programas enfrentan enormes retos, los cuales incluyen la apropiada selección de los proyectos, los programas y el personal idóneo, para satisfacer las necesidades de atención a los pacientes.<sup>35, 64</sup>

Por todo lo anterior, los bancos de sangre que son responsables de coleccionar y procesar las células tallo, deberán contar con manuales de procedimientos actuales para mantener un sistema de calidad, y así asegurar que los procedimientos, almacenamiento y distribución de los productos se ajusten a los requerimientos de los programas de presupuesto de la institución.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Se espera que este manual sirva como guía y punto de consulta para médicos, químicos, técnicos, estudiantes, enfermeras, etc. para resolver dudas y comparar con los procedimientos realizados en otros laboratorios lo cual produzca técnicas de mejor calidad.

### **Objetivo particular**

Este trabajo es un informe de la práctica profesional y tiene como objetivo el de realizar un manual de procedimiento de consulta y guía diaria para la criopreservación de células progenitoras hematopoyéticas la cual, deberá de actualizarse periódicamente para que se ajuste a los avances científicos, a los requerimientos del paciente y al programa de presupuesto de la institución.



## I. Procedimiento de criopreservación de células progenitoras hematopoyéticas (CPH's)

<b>Procedimiento:</b> Criopreservación de CPH's	<b>Responsables:</b> Javier Bautista Juárez Carlos Martínez-Murillo	<b>Elaboró:</b> Javier Bautista Juárez
	<b>Edición Número:</b> 4	<b>Revisó:</b> Dolores Uribe
<b>Primera edición:</b> Dic-2000	<b>Edición previa:</b> Dic-2002	<b>Última edición:</b> Marzo-2004

### 1.1 Generalidades

La utilización de la médula ósea o de las células progenitoras autólogas para restablecer las funciones hematopoyéticas en pacientes sometidos a altas dosis de quimioterapia, radioterapia o ambas, tiene como objetivo fundamental la conservación de los precursores hematopoyéticos en condiciones óptimas que garanticen su almacenamiento durante el tiempo que sea necesario, con la mínima pérdida de sus capacidades de autorregeneración y diferenciación.<sup>17, 26, 38, 53</sup>

*Daño por congelación.* La congelación de una suspensión celular tal como la médula ósea o las "células tallo" de sangre periférica, implica esencialmente un cambio de fase. Durante este proceso tienen lugar dos fenómenos que pueden ocasionar un daño celular irreversible; la deshidratación osmótica y la formación de cristales de hielo intracelular.<sup>46, 47</sup>

*Crioprotectores coligativos.* El agente crioprotector más ampliamente utilizado en la criopreservación es el dimetilsulfóxido (DMSO), aunque se han empleado otros como el glicerol, el hidroximetilalmidón y la polivinilpirrolidona. Entre las propiedades más conocidas de estos agentes están la de actuar como sustancias coligativas, ya que incorporan moléculas de agua y disminuyen el crecimiento de los cristales de hielo, lo que evita un aumento brusco en la concentración de solutos extracelulares.

Por otra parte, la capacidad del crioprotector para penetrar en la célula aumenta la concentración del medio intracelular lo que previene la formación de cristales intracelulares y evita así la posible pérdida de la viabilidad.<sup>11, 47, 49</sup>

De este modo, la adición de una sustancia crioprotectora permite emplear un ritmo de enfriamiento tal, que no se pierda líquido intracelular como para causar una deshidratación, y que al mismo tiempo mantenga una concentración de solutos intracelulares suficientes para minimizar la aparición de cristales de hielo en el interior de la célula.

*Dinámica de la criopreservación.* Uno de los momentos críticos de la criopreservación de cualquier espécimen biológico es la denominada "fase de transición". En ese momento, el agua de la solución libera el calor latente de fusión para transformarse en un medio sólido. Si el programa de congelación no reacciona a tiempo, el ritmo de enfriamiento disminuye y la curva de descenso de temperatura se hace más lenta, lo que expone a las células a los efectos del elevado gradiente de presión osmótica. Clásicamente se ha admitido que el daño celular, así originado, es directamente proporcional a la duración de la fase de transición.<sup>11</sup>

Una vez iniciado el cambio de estado, el ritmo de enfriamiento debe mantenerse constante entre 1-2° C por minuto, para evitar un posible sobreenfriamiento de la célula.

*Congeladores programables.* Existen en el mercado diversos aparatos de criopreservación que permiten establecer un programa en el que se definen distintos segmentos o rampas de descenso de temperatura. Todos ellos constan de los siguientes elementos:

- Una cámara de congelación, debidamente aislada, en la que se colocan las muestras que van a ser sometidas a criopreservación.
- Un sistema de aporte de nitrógeno líquido, consistente de un recipiente presurizado, adaptado a una válvula electromecánica, que introduce gas nitrógeno en la cámara de congelación.
- Uno o varios termopares destinados a la medición constante de la temperatura real, tanto en la cámara como en la propia muestra u otro espécimen usado como testigo.
- Un módulo de programación y control que permite establecer los programas, dirigir su ejecución y analizar los datos provenientes de la cámara.
- Un sistema de registro gráfico o alfanumérico que refleja la curva de congelación.<sup>26, 49, 55</sup>

## 1.2 Principios del procedimiento

Los principales factores que se deben tener en cuenta en el procedimiento de criopreservación son: la suspensión celular, el medio de congelación, el programa a seguir y el sistema de almacenamiento.<sup>30, 49, 56</sup>

- La suspensión celular de la que se parte es una muestra de "células tallo" de sangre periférica, sometida previamente a uno de los métodos de fraccionamiento por aféresis. Por lo tanto se tiene una suspensión de células hematopoyéticas nucleares con un número variable de hematíes contaminantes. Es importante que la concentración final de células no exceda de  $2-3 \times 10^7$  células por mililitro.
- El medio de congelación o solución criopreservadora puede variar, pero es recomendable que contenga una fuente de poder de proteínas, que puede ser albúmina humana, suero o plasma autólogos u homólogos, en una concentración final de al menos 10%, diluido en un medio de cultivo TC-199 (SIGMA, Medium 199, Hepes Modification, 10L; #Lote 30L83021; Sigma-Chemical CO, PO Box 14508 St Louis MO 63178 USA). Algunos grupos emplean plasma compatible como único medio, constituyendo éste el 90% del volumen final de la muestra.

El agente crioprotector de elección es el dimetilsulfóxido (DMSO), debiendo ajustarse a una concentración final del 10%. La adición del crioprotector debe hacerse lentamente y con la muestra a una temperatura de 4° C. Para ello, se procede a preparar un volumen de células más el medio, sobre el cual se añade lentamente otro volumen de medio más el DMSO al 20%, de tal forma que la concentración final del crioprotector sea del 10%.

Una vez terminada la mezcla, se transfiere a una bolsa de congelación que debe estar constituida por un material plástico no lipofílico (poliolefin o teflón-capton) para evitar el daño a las membranas celulares, y además debe ser lo suficientemente resistente a bajas temperaturas (-196°C). La bolsa se introduce en una carcasa de aluminio que mantenga comprimidas ambas superficies, proporcionando así un espesor homogéneo a la muestra que facilite un correcto intercambio de calor.

- El programa de congelación puede variar, pero en líneas generales debe incluir primero una fase de estabilización a una temperatura de 4°C, seguida de un descenso constante en la misma a un ritmo de 1°-2°C/min. En el momento previsto de cambio de fase, se debe inducir un descenso acusado de la temperatura de la cámara para compensar la liberación del calor de fusión e inducir el proceso de nucleación. Una vez superada la fase de transición, el ritmo de enfriamiento debe permanecer constante, entre 1-2°C/min.
- Las células congeladas deben almacenarse en un contenedor de nitrógeno líquido, perfectamente en la fase líquida, donde la temperatura se mantiene constante a -196°C. Si la muestra se coloca en la fase gaseosa, la temperatura puede experimentar oscilaciones entre -100°C y -140°C, debido a las repetidas aperturas del contenedor (lo que no es recomendable). El tiempo máximo que puede mantenerse un producto criopreservado en nitrógeno líquido se desconoce con exactitud, pero se han llegado a reinfundir productos almacenados durante 10 años, con resultados satisfactorios.<sup>11, 17, 32</sup>

### 1.3 Observaciones

- Absolutamente en todo el procedimiento, tanto en la preparación de los reactivos, como en la preparación de las muestras biológicas se debe trabajar a una temperatura de 4°C y con asepsia cuando se trabaje afuera de la campana.
- Previo a la recepción del producto, se deben de preparar los reactivos, la campana y los materiales que se vayan a utilizar de acuerdo a la hoja de trabajo y al manual de procedimiento, además del material esterilizado por vapor (autoclave).
- Los productos y los reactivos se deben de mantener siempre sobre un recipiente que contenga hielo "frappé" con una capa intermedia de papel aluminio o refrigerantes a los cuales se les realiza la asepsia antes de introducirlos a la campana.
- Durante el procedimiento de aféresis se revisa constantemente los tiempos y la calidad de la cosecha, con el fin de notificar cualquier acontecimiento en el informe de control de calidad. Los tiempos son importantes para iniciar la asepsia de la campana, para la instalación y arranque del equipo CRYOMED.
- En el transcurso del día anterior del procedimiento, se solicitan los frascos de hemocultivo para el control bacteriológico, los cuales se necesitan en los siguientes pasos:

Primer día; 2 frascos para el control del catéter (lumen azul y lumen rojo), 2 frascos para el control de campana (pre-DMSO y post-DMSO).

Segundo día; 2 frascos para el control de campana (pre-DMSO y post-DMSO). Además por acuerdo del Comité de Trasplante, se realiza un control adicional (post-DMSO), para el protocolo de microbiología que se realiza en el BCS CMN SXXI, cuyo frasco será proporcionado en la Central de esterilización y equipo (CEYE) de esta unidad.

En caso de no tener hemocultivos en la unidad que le corresponde al donador, se toma la muestra en tubos crioviales identificándolos con una etiqueta.

#### **1.4 Procedimiento (primera parte)**

1. Media hora antes de que se termine la cosecha de las células tallo por aféresis, se realiza la asepsia de la campana, después se introduce todo el material al interior de la campana, se enciende la luz UV durante 10 minutos como mínimo para esterilizar el área de trabajo y el material (aunque ya se encuentre esterilizado por vapor), se anota la hora en que se inicia el trabajo en la "hoja de uso de la campana". Se deja la campana encendida con luz UV y con el motor del flujo para garantizar la esterilidad, hasta que esté el producto listo para su procesamiento.
2. Se recoge el producto obtenido por aféresis en el área clínica revisando los datos de las etiquetas y el peso del paciente. Se recogen las etiquetas restantes para su uso en criviales y hemocultivos.
3. Con mucho cuidado se toma el producto cosechado evitando que sea manipulado bruscamente por cualquier persona del equipo de trabajo. Se recibe además el plasma del donador que en promedio debe ser de 100 mL si la cosecha de células tallo fue de 60 mL aproximadamente. Se introducen los productos en el termo-transportador el cual debe contener refrigerantes cubiertos para evitar el contacto directo con las células progenitoras hematopoyéticas.
4. En el Laboratorio de Criopreservación, se enciende el equipo CRYOMED (verificar su funcionamiento), se calibra la impresora, y se permite que el equipo caliente el sistema y los circuitos durante 30 minutos. No se debe olvidar conectar el tanque de nitrógeno líquido.
5. Antes de trabajar en la campana de flujo laminar, se apaga la luz UV y se anota en la hoja de uso de la campana el tiempo de uso de la misma.

6. La persona que va a procesar las Células Progenitoras Hematopoyéticas debe de colocarse la gorra, el cubrebocas y los guantes y se limpian las manos con alcohol al 70 % antes de introducirlas al interior de la campana, en la cual se tiene el material acomodado de acuerdo a la comodidad de la persona que realizará el proceso, sin olvidar tener dos bolsas de aluminio perfectamente limpias en el interior para el desecho del material usado.
  
7. Se prepara la solución "criopreservante control", si es necesario, y la "solución criopreservante" del paciente, la cual debe ser específica y exclusiva para cada producto, por tal motivo se usará el plasma del donador. Si la cosecha es de aproximadamente 60 mL, en probetas de 100 mL o en un matraz aforado de 100 mL se agrega, ya sea decantando de la bolsa o con la jeringa, 80 mL del plasma del donador (que debe estar frío), y después se agrega lentamente 20 mL de la solución de DMSO (la cual provocara una reacción exotérmica) con la jeringa y la aguja; se mezcla la solución y se trasvasa a un frasco marcado con el nombre del paciente. Inmediatamente después se coloca sobre los refrigerantes para bajar la temperatura a 4°C, hasta su uso. Si se toma la muestra de la bolsa no se debe olvidar de realizar la asepsia en la zona donde se realizará el corte del tubo colector.<sup>11</sup>
  
8. Una vez preparado el reactivo criopreservante en cantidades adecuadas, se procede a medir el volumen exacto de la cosecha de la siguiente forma: se adapta a la bolsa que contiene la cosecha, un "coupler fenwal" con el fin de aplicar o tomar muestra de ésta. Por medio de este acoplador, si fuera necesario, se agrega 1 mL de heparina estéril sin dejar de hacer la asepsia en la zona de punción y se mezcla homogéneamente durante un minuto, y existieran, se disgregan cuidadosamente los grumos o acumulos de células pasando varias veces los dedos sobre estos, sin hacer presión, hasta disgregarlos, se hacen las anotaciones necesarias si se encuentra algún coagulo o fragmentos de fibrina dentro de la bolsa.

Después, con una jeringa de 20 mL estéril y con aguja, se realiza la asepsia en la zona de punción y se perfora la bolsa por el acoplador, llenando la jeringa sin dejar de mezclar la bolsa sobre un refrigerante; se saca la jeringa de la bolsa y se quita la aguja de ésta, para adicionar su contenido en una bolsa de poliolefina la cual es especial para la criopreservación y que debe de estar previamente etiquetada. Se repite este procedimiento hasta vaciar la bolsa de la cosecha sin dejar de anotar sobre ésta, con marcador indeleble, el volumen contenido finalmente en cada una (recordando que existen bolsas de 60 y 100 mL). Después se colocan las bolsas con las CPH's sobre los refrigerantes hasta que se vuelvan a utilizar.

9. De los residuos de CPH's se tomarán muestras pilotos de la siguiente forma: se corta una de las esquinas de la bolsa y se deja que la sangre se acumule en la esquina opuesta, después con una jeringa de 5mL y con jeringa se toma la muestra, la cual puede ser de aproximadamente de 2.0-2.5 mL e inmediatamente después se trasvasa la muestra a dos tubos estériles y a un frasco de hemocultivo (criovial) para su posterior estudio. No se debe olvidar hacer la asepsia en las zonas de aplicación de las CPH's.
10. Dentro de la campana de flujo laminar se tienen bolsas para los desechos, con la finalidad de no sacar las manos de ésta, y poder así eliminar los productos que salgan en cada paso del procedimiento. En caso de sacar las manos fuera de la campana hay que limpiarlas con alcohol nuevamente.
11. Antes de iniciar el siguiente paso (mezcla de las CPH's con la solución criopreservante), una de las dos personas que participan en el proceso, debe dirigirse al Laboratorio de Criopreservación e iniciar el programa en el equipo CRYOMED para la congelación.



Para ello, se presiona la tecla "RUN", para que al terminar de trabajar en la campana, el equipo se encuentre a 4°C, y así no se rompa con la cadena de temperatura de conservación. Además se debe de activar la impresora del mismo equipo y verificar que la llave de salida de nitrógeno líquido este abierta hacia el equipo de criocongelación.

12. La mezcla de las CPH's con el reactivo criopreservante, se debe de hacer en forma rápida y siempre a una temperatura de 4°C, ya que el DMSO actúa sobre las células destruyéndolas una vez que se administra. Para evitar la acción negativa del DMSO se trabaja en la siguiente forma: se toma del frasco la solución criopreservante (previamente refrigerada) en un volumen semejante al de las bolsas de poliolefina que contienen las CPH's y se trasvasa ésta solución lentamente y sin dejar de mezclar y sin dejar de tener como base un refrigerante. No se debe de olvidar realizar la asepsia en la zona de punción.
  
13. Se trata de eliminar la mayor cantidad de aire en la bolsa con la jeringa (sin aguja). Sin dejar de mezclar, se toma una muestra representativa (aproximadamente 2.5 mL) de la solución de CPH's más la solución criopreservante con la base de refrigerante, y se coloca en dos tubos crioviales y en los hemocultivos correspondientes (uno del hospital de procedencia y otro para el protocolo del Banco Central de Sangre), en caso de no existir hemocultivo se toma la muestra en otro criovial que se etiqueta como "post-DMSO". Una vez obtenidas las muestras, con una "grapa" metálica, se pinza el tubo colector de la bolsa de poliolefina por la parte más cercana a la bolsa para evitar que la grapa estorbe la manipulación de la bolsa, ya sea al momento de congelar, al descongelar o al reinfundir el producto posteriormente se corta el resto del tubo colector y se desecha.

14. Al finalizar el procedimiento de mezcla en todas las bolsas, una de las dos personas que esta trabajando se lleva los productos y los crioviales al laboratorio para su criocongelación. Mientras que la segunda persona apaga el motor del aire y la luz de la campana, también recoge el material, los desechos; realiza la limpieza y la asepsia de la campana y anota en la hoja de uso de la campana, la lectura final de las partículas, y la hora final de uso tanto de la luz blanca, la luz ultravioleta como de los motores de filtración. Al finalizar se integrará de nuevo al procedimiento de criocongelación.

**Tabla 1. Programas sugeridos para la criopreservación**

Paso	Programa de IL Diagnostics		Programa del I.N.C.	
1	Wait @	20°C Cool+	Wait @	+4°
2	1°C min	-6°C	1°C min	-8°C
3	25°C min	-56°C	25°C min	-55°C
4	15°C min	-14°C	15°C min	-30°C
5	1°C min	-45°C	1°C min	-45°C
6	10°C min	-90°C	10°C min	-90°C
7	End	-	End	-

### 1.5 Procedimiento (segunda parte)

1. En el Laboratorio de Criopreservación, la primera persona que transporte los productos, los tubos y los crioviales, inicia el procedimiento de la criocongelación de la siguiente forma: se sacan los "racks" del refrigerador y se introducen en ellos los productos de las CPH's con el reactivo criopreservante. Después se introducen los "racks" en el congelador del equipo CRYOMED y se colocan encima de estos los dos tubos crioviales que se tomaron después de que se agregó el DMSO.

Inmediatamente después, si la temperatura del equipo es de 4°C, se marca por segunda ocasión el "RUN", para que el aparato pase al segundo paso y así el procedimiento se lleve a cabo de forma automática, y en cuyo proceso se debe de verificar que la impresora esté en la forma "SCAN" para que el registro de paso del nitrógeno líquido sea correcto y el equipo no marque algún error; en resumen que el proceso se lleve sin ningún obstáculo.<sup>30, 37, 39</sup>

2. La misma persona del paso anterior, debe realizar una dilución 1:10 con solución salina isotónica (SSI) al 0.9% con las muestras que se encuentran en los tubos para la biometría hemática (B.H.) y las llevan al contador celular automatizado (Cell-Dyn 3700 Abbott Diagnostics Division Mod. CD 3700SL, Serie 20710AK, lista No. 02H31-01) para su procesamiento. Las muestras se deben introducir por duplicado. Se prepara la muestra para la viabilidad y para ello se mezcla volumen a volumen, colorante azul de tripano con CPH's de la muestra de la B.H., y se deja incubar durante 5-10 minutos antes de leer la viabilidad en el microscopio y se anota el porcentaje de células vivas.<sup>19, 38</sup>
3. A los resultados impresos de las biometrías hemáticas se les anexa la siguiente información: nombre del paciente y del donador, peso del paciente, número de leucocitos y volumen de la cosecha congelada. A una de estas hojas se le anexan las biometrías hemáticas de las muestras (pura y diluida) y se entregan a la persona encargada de trabajar con el citómetro de flujo o a la Jefatura de Laboratorio.
4. Una vez finalizado el proceso, se escucha un sonido de la alarma en la computadora del equipo y en la pantalla de la misma se observa que el proceso se encuentra en el paso número 7; para detener el sonido se presiona el botón de alarma y se presionan los botones que se encuentran en la parte trasera del equipo para apagar el equipo, se procede a introducir los "racks" en los "porta-racks" anotando en éste último el número seleccionado.

Se introducen estas en el interior de la cámara de almacenamiento marcando la zona de su localización en la libreta asignada para ello. Además se guardan los dos tubos crioviales dentro del recipiente asignado para ello, y se introducen igualmente a la cámara de almacenamiento. El material de vidrio se envía ese mismo día a lavado de material para que este preparado para el procedimiento del siguiente día.<sup>11</sup>

5. La segunda persona tiene que realizar el procedimiento de cultivo de líneas precursoras además de llevar los frascos de hemocultivos o crioviales al servicios de microbiología. También tiene como responsabilidad desconectar la manguera de la cámara de congelación, conectar la cámara de almacenamiento y verificar que la llave del N<sub>2</sub>L este abierta para su salida. Por último esta misma persona deberá sacar los desechos biológicos de las bolsas y colocarlas en las bolsas o recipientes correspondientes.<sup>30, 31</sup>
6. Los puntos que se deben de cuidar al día siguiente para la criopreservación de las CPH's son los siguientes: se verifica que el material termine su proceso de lavado, se prepara el material para su posterior esterilización, se anotan los resultados de los controles realizados el día anterior en las hojas elaboradas para ello, y se entregan los resultados al Dr. Martínez-Murillo y a la Dra. Sandra Quintana o al médico asignado para el programa como coordinador médico del proceso. Además se archivan todas las hojas de trabajo y se introducen los resultados del procedimiento en el archivo de la computadora (cosechas de CPH's).
7. Finalmente como enlace, se empieza de nuevo el procedimiento de revisión y preparación de material.<sup>19, 33, 39</sup>

## **1.6 Equipo, material y reactivos**

- Equipo CRYOMED para la criopreservación:

- Cámara de congelación (CRYOMED, Freezing chamber, Mod. 8022; Forma Scientific, Inc.; PO Box 649 Marietta, Ohio 45750 USA)
- Módulo de programación (CRYOMED, Programmable Freezing System, Mod. 1010; Forma Scientific, Inc.; PO Box 649 Marietta, Ohio 45750 USA)
- Cámara de almacenamiento (CRYOMED, CMS Series 328 Liter LN<sub>2</sub>, Capacity 400; Forma Scientific, Inc.; PO Box 649 Marietta, Ohio 45750 USA)
- Accesorios: Racks y portaracks
- Cámara de transporte (MVE Chart, Vapor shippers -150°C specimen transport, Mod. Mini Moover)
- Tanque de nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>L) (CRYOMED, Cryogenic liquid cylinder, Mod. PLC-230LP; Forma Scientific, Inc.; PO Box 649 Marietta, Ohio 45750 USA)
- Prensa CRYOMED para la congelación
- Campana de flujo laminar para Bioseguridad Clase II (TELSTAR; cabina de seguridad microbiiológica; Mod. BIO-IIA; Telstar Industrial, S.L. José Tapiolas 120, 08226 Terrassa, España)
- Báscula electrónica (Chyo Balance; Corp Japan; Capacity 180g Readability 0.1 mg; Serial No. 80088 Chyo JL-200)
- Sellador dieléctrico (BAXTER, Fenwal Hematron II dielectric sealer)
- Refrigerador
- Pipetas desechables estériles de 5, 10 y 20 mL
- Compresora para pipetas desechables (propipeta automática)
- Jeringas de 5, 10 y 20 mL (PLASTIPAK, jeringa de plástico estéril y desechable, sin aguja, Cat. No 302584; Becton Dickinson de México S.A. de C.V. Km37.5 Aut Mex-Qro)
- Agujas para las jeringas (Precision Glide, aguja estéril y desechable, 20G 1¼, Cat. No 301730, # Lote 2L056; Becton Dickinson de México S.A. de C.V. Cuautitlán Izcalli, México)
- Contenedores para los desechos biológicos
- Adaptadores para bolsas de aferesis (BAXTER, Fenwal Division, sampling site coupler, Lot. GD768101, Deerfield IL 60015 USA)
- Criotubos de 2 mL (CRYOVIAL, sterile PK-100; Simport plastics, 176 Rue du Parc, Belueil, Quebec, Canada J3G455)
- Bolsas de poliolefina para criopreservación (BAXTER, Cryocyte, freezing container 250 mL with label pocket PL269 plastic; Lot HO3E06078, Nexell Therapeutics Inc, Irvine, CA 92618 USA)

- Guantes para la criopreservación para temperaturas de hasta  $-196^{\circ}\text{C}$
  - Broches metálicos (BAXTER, Fenwal Division, grapas para tubo colector)
  - Contador celular automatizado (CELLDYN, Abbott Diagnostics Division Mod. CD3700SL; Serie 20710AK; List NO 02H31-01)
  - Tubos de 12 x 75
  - Pipetas de 1 mL graduadas no estériles
  - Pipetas de 10 mL graduadas no estériles
  - Pipetas automáticas de volúmenes variables (MERCK, Transferpette)
  - Puntas para pipetas automáticas
  - Gasa cortada no estéril
  - Gasa cortada estéril
  - Tijeras
  - Pinzas de punta curva
  - Recipiente para hielo
  - Hielo "frappé"
- 
- Cubrebocas
  - Guantes
  - Gorro
  - Papel graficador
  - Atomizador
  - Reloj con cronómetro
  - Bolsa de aluminio para el desecho del material
- 
- Nitrógeno líquido ( $\text{N}_2\text{L}$ ) (INFRA, Cilindro 105.000  $\text{mm}^3$ , Código 602)
  - Solución salina isotónica 0.9 % (BAXTER, agua inyectable NaCl 0.9%, envase 1L; #Lote V031025)
  - Albúmina bovina inyectable (hi-bumin, Seroálbúmina Humana, sol. Inyectable 20%; frasco 50mL; #Lote O1067006; Baxter AG A-1221, Viena, Industrrestuasse 67, Austria)
  - Heparina (Inhepar 1000 UI/mL, #Lote 020224, laboratorios Pisa, S.A. de C.V., calle #1308 Zona Industrial 44940 Guadalajara, Jal., México)

- Dimetilsulfóxido (DMSO) (SIGMA, Dimethyl sulfoxide IL; #Lote 21K0091; Sigma-Aldrich CO, PO Box 14508 St Louis MO 63178 USA)
- Azul de tripano (SIGMA, Trypan blue, direct Blue 14, 100g; #Lote 68F3670; Sigma-Chemical CO, PO Box 14508 St Louis MO 63178 USA)
- Medio TC-199 (SIGMA, Medium 199, Hepes Modification, 10L; #Lote 30L83021; Sigma-Chemical CO, PO Box 14508 St Louis MO 63178 USA)
- Desinfectantes (fenol, alcohol y benzal)
- Alcohol al 70 %
- Agua destilada
  
- Células tallo contenidas en bolsa PL-3014 y recolectadas por procedimiento de aferesis
- Remanente de plasma del donador contenido en bolsa PL-3014 recolectado por procedimiento de aferesis
- Muestra del donador anticoagulada (B.H.).
- Células de cordón umbilical, recolectadas en bolsas para cosecha pediátrica para un máximo de 200 mL
- Medula ósea extraída por técnica tradicional y conservada en bolsas de 2000 mL para sus procedimientos posteriores (desplasmaticar).

## II. Cosecha de sangre de cordón umbilical (SCU)

<b>Procedimiento:</b> Cosecha de Sangre de Cordón Umbilical.	<b>Responsables:</b> Dr Carlos Martínez Murillo Dra Sandra Quintana González	<b>Elaboró:</b> Estrella Tenorio Verónica Sánchez Portillo Javier Bautista Juárez
	<b>Número:</b> 1	<b>Revisó:</b> Javier Bautista Juárez
<b>Primera edición:</b> Nov. 2003	<b>Edición previa:</b> no realizada	<b>Última edición:</b> Nov. 2004

### 2.1 Generalidades

La sangre contenida en el cordón umbilical es rica en células madre, estas son idénticas a las encontradas en la médula ósea y son la clave para combatir algunas enfermedades como por ejemplo, algunos tipos de cáncer (leucemia, linfoma no Hodking, mieloma múltiple), algunos tipos de anemias (anemia aplásica y de Fanconi), así como otros tipos de enfermedades (síndrome de Hunte, lupus eritematoso sistémico) entre otros.<sup>9, 13, 15, 16, 66, 67</sup>

Normalmente la placenta y el cordón umbilical se desechan o se utilizan en la industria cosmetológica, en la actualidad presenta una nueva y poderosa forma de salvar vidas humanas.<sup>9, 53</sup>

El proceso de recolección se debe de realizar en las salas de labor (expulsión) o en los quirófanos de las maternidades inmediatamente después del parto, este procedimiento lleva aproximadamente 10 minutos y no produce molestias a la madre ni al recién nacido.<sup>13, 15, 16, 20, 36, 46, 66, 68</sup>

### 2.2 Método

#### 2.2.1 Preparación del material

El material que se ocupa en la zona de quirófano debe estar previamente estéril en el autoclave y se deben de seleccionar los tiempos adecuados de secado con una duración de quince días y este material debe estar acondicionado por el personal que lo ocupa.



### **2.2.2 Captación de donadora en la sala de labor**

Para la captación de la donadora, ésta debe tener una dilatación aproximada de más de 5 cm, además no debe existir rompimiento prematuro de membrana (R.P.M.) de más de 8 horas de evolución, no debe presentar enfermedad hipertensiva del embarazo, diabetes u otra patología de riesgo como lo indica el programa de transplante de la tabla de exclusión del programa.

Después de haber revisado el expediente, y de haber informado a la probable donadora el procedimiento, se continúan los siguientes pasos:

- Se recaba la firma en consentimiento informado
- Se llena el formato de la historia clínica mediante interrogatorio directo antes del parto
- Se toma la muestra para los estudios de laboratorio y se coloca el apósito de tegaderm en el sitio de la punción
- Se da la información a la donadora sobre la importancia que tiene su presencia para el seguimiento clínico de su hijo y del producto a colectar
- Se tiene el control de donadoras captadas y se está alerta al momento en que pase a la sala de expulsión

### **2.2.3 Asepsia en la zona de punción del cordón**

La zona de punción se limpia con una gasa estéril e impregnada con alcohol y con movimientos de arriba hacia abajo, de la misma manera se limpia con otra gasa pero impregnada con lugol tomando en cuenta que se tiene que elegir el extremo superior del cordón placentario, tomando mayor importancia en que la zona donde se realizó la asepsia englobe las dos venas y arteria para su posterior punción.

#### **2.2.4 Captación de donadora en la sala de expulsión**

Ya en la sala de expulsión o en el quirófano, verificar que la paciente sea a quien se le tomaron las muestras para serología y a quien se le realizó la historia clínica, esperar a que llegue el alumbramiento del producto (recién nacido) y esperar a que el medico autorice la toma de la sangre de cordón umbilical por vía intrauterina, a lo cual se le realizara la asepsia como se describió en el punto 2.2.3, ya con la asepsia realizada, se abre el capuchón de la aguja de la bolsa de recolección, teniendo la precaución de haber pinzado el tubo colector, con lo que se evitara la entrada de aire a la bolsa y por lo tanto disminuyendo la posibilidad de contaminación bacteriana. Se punciona la vena o arteria seleccionada en la parte más distal a la placenta, esto por si es necesario realizar otra punción se realice más cerca de la placenta y se pinza por debajo de la zona puncionada previamente. Durante la extracción, tratar de mezclar el producto con el anticoagulante suavemente, observando que el flujo de la sangre sea continuo, recordando que el punto medular de todo el proceso es tener una cosecha de muy buen volumen. Tratar de mover la aguja si no se observa flujo en la bolsa de recolección o pinzar el cordón por debajo de la zona puncionada, sacar la aguja y colocarla por debajo de la zona pinzada para una nueva recolección. Si fuera necesario levantar la placenta con una mano dejando el cordón en la parte posterior de la placenta y continuar con el llenado de la bolsa de recolección. Terminado el proceso de la recolección, pinzar el tubo colector de la bolsa de sangrado y sacar la aguja de la vena o arteria, ahora si fuera posible, realizar tres nudos en el tubo colector de la bolsa y cortar la aguja para evitar accidentes. Si la recolección se realiza extrauterina, realizar el procedimiento de asepsia y de recolección inmediatamente después del alumbramiento de la placenta para evitar la formación de coágulos que eviten la recolección de un volumen adecuado en la cosecha.

### 2.3 Material

- Bolsa para cosecha con CPD con aguja calibre no. 16 para CCU 250 mL (BAXTER, Fenwal unidad bolsang CPD sencilla con solución anticoagulante de citrato fosfato dextrosa 250mL; #Lote M03G07056; Baxter Healthcare corporation, Deerfield IL, 60015 USA)
- Termo transportador
- Criotubos de 2 mL para temperatura de  $-196^{\circ}$  C (CRYOVIAL, sterile PK-100; Simport plastics, 176 Rue du Parc, Belueil, Quebec, Canada J3G455)
- Ropa quirúrgica
- Gorra quirúrgica
- Botas quirúrgica
- Guantes desechables
- Cubre bocas
- Gasas cortadas
- Campo estéril
- Bisturí
- Tubo Vacutainer con EDTA (BD VACUTAINER,  $K_3$ EDTA, sterile interior, #Lote 3121414; BD Franklin Lakes NJ 07417-1885)
- Tubo Vacutainer sin aditivo (BD VACUTAINER, no aditive, sterile interior, #Lote 3121576; BD Franklin Lakes NJ 07417-1885)
- Jeringa 10 mL (PLASTIPAK, jeringa de plástico estéril y desechable, sin aguja, Cat. No 302584; Becton Dickinson de México S.A. de C.V. Km37.5 Aut Mex-Qro)
- Aguja para jeringa (Precision Glide, aguja estéril y desechable, 20G 1¼, Cat. No 301730, # Lote 2L056; Becton Dickinson de México S.A. de C.V. Cuautitlán Izcalli, México)
- Torundas de algodón con alcohol
- Ligadura
- Pinzas quelly rectas
- Tijeras de mayo rectas
- Riñón
- Mesa Pasteur con ruedas

- Hoja de consentimiento de donador CCU
- Hoja de historia clínicas
- Alcohol al 70%
- Isodine espuma (Iugol)
- Pluma
- Marcador indeleble

### III. Criopreservación de sangre de cordón umbilical (SCU)

<b>Procedimiento:</b> Criopreservación de SCU	<b>Responsables:</b> Carlos Martínez-Murillo Javier Bautista Juárez	<b>Elaboró:</b> Javier Bautista Juárez
	<b>Número: 1</b>	<b>Revisó:</b> Dolores Uribe
<b>Primera edición:</b> Dic-2002	<b>Edición previa:</b> no realizada	<b>Última edición:</b> Dic-2002

#### 3.1 Método

1. La(s) bolsa(s) con las células de cordón umbilical se reciben y se verifican los datos de los donadores y de la persona que autoriza su utilización, así como los números de identificación, la hora de recolección y la hora de recepción.
2. Se verifican las condiciones de transporte y conservación de las unidades hasta la hora de la entrega. Se revisa la documentación necesaria para completar los estudios necesarios (historia clínica, solicitudes de estudio, etc.).
3. El estado de las células recibidas se valora y se documenta en el formato correspondiente, el volumen aproximado, la presencia de coágulos, la presencia de aire en exceso en la bolsa, etc.
4. Se procesan las células de acuerdo al procedimiento de separación de CPH's de cordón umbilical y se prepara el material y los reactivos necesarios que se utilizaran en la campana de flujo laminar de acuerdo a la hoja de trabajo correspondiente.
5. Se mezclan las células y el agente criopreservante para su posterior congelación, sin dejar de tomar los controles correspondientes para su estudio de HLA, biometría hemática, CD34, cultivo bacteriológico, etc.
6. Se verifica que el equipo y los consumibles del mismo se encuentren en buen estado y en las cantidades suficientes para su uso.
7. El procedimiento de criopreservación se realiza en forma automatizada en el equipo de CRYOMED sin dejar de registrar los resultados y de utilizar los controles adecuados. Las células se conservan congeladas en la cámara de almacenamiento y se registran en el formato correspondiente su localización.

Por último se informa el procedimiento a los médicos encargados del programa.

### 3.2 Proceso de criopreservación

Se valora la calidad del producto que se recibe para su aceptación o rechazo, esto de acuerdo a los valores predeterminados para su procesamiento. Después de aceptar la cosecha de CPH's obtenidas de cordón umbilical, se realizan los siguientes pasos:

- Si es necesario se toma una muestra piloto para los estudios de pre-reducción antes de calcular el volumen.
- Con el sellador dieléctrico hay que sellar el tubo colector que esta unido a la aguja (18G), la cual se utilizó para la recolección de las células, y se descarta en un contenedor para desechos. Se deja aproximadamente 2.5 cm (1 pulgada) de tubo colector unido a la bolsa para el posterior calculo de peso-volumen.
- El volumen colectado de CCU se calcula, y para ello se toma en cuenta que la bolsa de colección (ipm) con 37.5 mL de anticoagulante tiene un peso aproximado de **66 gramos** sin la aguja, y que la densidad de la sangre total es de **1.057 g/mL** con esta cantidad de anticoagulante.

Si se utiliza el juego completo de criopreservación para CCU, se toma en cuenta que el juego completo tiene un peso de **73 gramos** con 20 mL de anticoagulante.

- El volumen de sangre obtenida en la cosecha se calcula de la siguiente forma: se resta el peso de la bolsa con anticoagulante del peso bruto y después se divide entre la densidad de la sangre total con lo cual se obtendrá el volumen de sangre cosecha.
- $$\text{Vol. Cosecha(mL)} = \frac{\text{peso bolsa con anticoag.(g)} - \text{peso bruto de la sangre en bolsa (g)}}{\text{densidad de la sangre con anticoagulante (1.057 g/mL)}}$$

- Con la muestra tomada inicialmente se realizaran los siguientes estudios:
  1. Biometría hemática completa (BHC) con su respectivo calculo de las células mononucleares (CMN) en la cosecha.
  2. Grupo ABO y Rho(D).
  3. Coombs directo.
  4. Determinación de las células CD34 por citometría de flujo en la cosecha.
  5. Propiedades de dispersión de CD34/CD45.
  6. Viabilidad celular al momento previo de la criopreservación.
  7. Cultivos microbiológicos, los cuales deben de incluir bacterias aeróbicas, bacterias anaerobias y hongos.
  8. Tipificación de HLA.
- Se calcula el volumen de hidroxietilalmidón (HES) que se adicionará a la bolsa de "sangre total" de cordón umbilical y que debe de tener una relación de una parte de la solución de HES por cada cinco partes de sangre (relación 1:6) se anota el calculo y el volumen a adicionar en la hoja de registro de la libreta asignada a esta.
- Ejemplo: si el peso de la bolsa es de 116g se le resta el peso de la bolsa que es de aproximadamente de 66g, esto nos da un resultado de 50 g que corresponde al peso de la sangre el anterior valor se divide con la densidad de la sangre y se obtiene el volumen total de la cosecha.
- Se suma el volumen de anticoagulante presente en la bolsa (para las bolsas IPM es de 37.5 mL) el resultado de esa suma se multiplica por 0.2 lo cual nos proporciona el resultado de la dilución 1:6 y por lo tanto se obtiene el volumen de HES que se va a adicionar a la bolsa.
- En la campana de flujo laminar, se agrega el volumen de HES calculado a través del sitio de inyección previa asepsia y se mezcla uniformemente durante 15 minutos en un agitador automático dando tiempo a que el HES funcione como una solución de gradiente de densidad e induzca la pseudoaglutinación (rouloux).

- Se une una bolsa "transfer" de 150 mL a la bolsa madre (cosecha) para su posterior procesamiento y después se coloca la bolsa de colección en la camisa de la centrífuga y se nivela con otra camisa, esto se centrifuga a 50 G (500 rpm) durante 6 minutos a una temperatura de 10°C y teniendo cuidado de no poner ningún nivel de frenado para evitar resuspender o mezclar las CPH's con los glóbulos rojos ya sedimentados.
- **Nota:** La fórmula para el cálculo de "G a RPM" es la siguiente:  $RPM = [G / (1.118 \times 10^{-5})(r)]^{1/2}$ . Donde G=gravedad y r=radio de la centrífuga a partir del centro de esta hasta la media de la camisa.
- Se retira con cuidado la camisa que contiene la bolsa con las CPH's de la centrífuga y si no se cuenta con el juego de bolsas comerciales, se une por medio del conector estéril una bolsa vacía estéril para coleccionar sangre (bolsang) de 150 mL (omitir este paso si ya se realizó antes) sin sacar la bolsa de la camisa de la centrífuga. Una vez unidas las bolsas se coloca la bolsa con extremo cuidado en una prensa manual de extracción.
- Se libera con cuidado el seguro que sostiene el brazo de la prensa y se presiona suavemente la bolsa con el plasma rico en leucocitos hacia la bolsa satélite en un tiempo no menor de 50mL/60s para ayudar a que los leucocitos que se encuentran distribuidos en todo el plasma pasen a la bolsa "transfer" de procesamiento oprimiendo cuidadosamente la bolsa madre hasta el momento en que se encuentre con la capa de "buffy coat".
- Si se cuenta con una báscula se pinza el tubo colector en el momento que el total del plasma rico en leucocitos ha pasado a la bolsa satélite, se pesa la bolsa con el plasma y se adiciona 20g, que es la cantidad de paquete de glóbulos rojos ricos en leucocitos que van pasar a la bolsa una vez que se retire la pinza o en su caso se tara la bascula a 0.0 g y se deja pasar 20 gramos del concentrado eritrocitario para tener el volumen de sangre ideal para congelar en una bolsa de sangre de cordón umbilical.



**Tabla 2.**

<b>HES agregado a la unidad de sangre total</b>	<b>Cantidad de paquete de glóbulos rojos rico en CPH's</b>
Menos de 20 mL	17 g de paquete
Entre 20-29 mL	18 g de paquete
Entre 30-39 mL	19 g de paquete
Más de 40 mL	Separar en dos bolsas

- Después de traspasar a la bolsa la cantidad necesaria de glóbulos rojos ricos en CPH's, se pinza (no sellar) el tubo colector y se coloca el juego de bolsas nuevamente en la camisa de la centrífuga y si se cuenta con un espaciador de plaquetas hay que utilizarlo para mantener la bolsa a un nivel que no provoque la resuspensión de las células para centrifugar a 400 g a 10°C durante 15 min (lo cual equivale a 1500 RPM en una centrífuga (Modelo Sorvall)).
- Cuando se detenga completamente la centrífuga, se retira cuidadosamente la camisa y se coloca junto a la prensa manual extractora. Inmediatamente con cuidado se coloca la bolsa en la prensa y se deja que el brazo extraiga el plasma sin CPH's a la bolsa madre inicial, la cual se convierte en bolsa de desecho. Durante este paso es importante dejar aproximadamente 15 mL de plasma para resuspender las células. Después se sella y se desecha la bolsa madre inicial.
- Mientras que estos procesos se realizan se debe de preparar el reactivo criopreservante de las CPH's en una campana de flujo laminar de acuerdo a la tabla 4. Si se cuenta con DMSO-dextran 40 comercial o preparado en su propio laboratorio, no se realiza este paso.
- La mezcla se debe de realizar siguiendo un orden de adición; primero se introduce la solución diluyente (PBS o SSI), en segundo lugar la albúmina, y esta mezcla se deja en un baño de hielo "frappé" o en el refrigerador para que cuando se agregue el tercer componente (DMSO), la solución antes descrita se

encuentre a una temperatura de entre 2-4°C para no desnaturalizar las proteínas de la albúmina, además de que se debe agregar lentamente a una velocidad de 3mL/min. Una vez preparado el reactivo se debe mantener a una temperatura de 2-4°C hasta su uso en las CPH's.

**Tabla 3.**

Dimetilsulfóxido al 20 %.		Ejemplo para 50 mL
DMSO R.A.	El necesario para una concentración final de 20 %	10 mL DMSO
Albúmina al 30%	El necesario para una concentración final de 5 %	8.33 mL de albúmina al 30%
SSI 0.9% ó PBS	El necesario para aforar el volumen requerido	31.67 mL de diluyente
		Volumen final 50 mL

- Las células ya procesadas y resuspendidas en aproximadamente 15-18 mL de plasma, deberán mantenerse a una temperatura de entre 2-4°C hasta su mezcla con el reactivo criopreservante.
- Ya en la campana de flujo laminar, se realiza la toma de las muestras controles a partir de la bolsa que contiene las células resuspendidas en plasma y se toma la cantidad necesaria para: biometría hemática, cultivo celular, cultivo bacteriológico y viabilidad. Se transfiere la sangre de cordón umbilical reducida de volumen a la bolsa de congelación por medio de una jeringa de 20 mL para saber con exactitud el volumen de DMSO a adicionar.

**Nota:** si el DMSO es preparado al momento, la cantidad que se debe de adicionar es el mismo al de la sangre en la bolsa de congelación.

**Nota:** si el DMSO es comercial y mezclado con Dextran 40 es necesario seguir la tabla 5 para adicionar el volumen adecuado.

**Tabla 4.**

	<b>25 mL SCU</b>	<b>20 mL SCU</b>	<b>18 mL SCU</b>	<b>15 mL SCU</b>
<b>DMSO-Dextran40 (DMSO conc. 50%)</b>	5-6mL reactivo	4-5mL reactivo	4mL reactivo	3-4mL reactivo
<b>Conc. Final aprox.</b>	8.5-9.5 %	8.5-9.5 %	8.5-9.5 %	8.5-9.5 %

- Después con cuidado y a partir de la zona de inyección se agrega lentamente el volumen necesario de DMSO (3-6 mL si se cuenta con el reactivo comercial o el preparado en su laboratorio) para diluir la muestra 1:2 y así tener el reactivo criopreservante en una concentración final no mayor del 10%.
- El reactivo criopreservante se introduce lentamente a una velocidad de 1 mL/min para evitar que el DMSO dañe las células a congelar. Una vez terminada la mezcla, se toman nuevamente pilotos en tubos crioviales para su conservación en nitrógeno líquido a la par con la bolsa de las células de cordón umbilical; los tubos se utilizarán cuando exista una incongruencia o cuando sea necesaria la descongelación para su reinfusión y sea necesaria la nueva viabilidad. Si no es necesaria la utilización de los tubos crioviales, se realizan sellos en el tubo colector de la bolsa de criopreservación para su posterior uso.
- Posteriormente se pasan las células mezcladas con el DMSO, para su congelación en el equipo de CRYOMED programado para la criopreservación. Para empezar el congelamiento en el equipo, no debe de pasar más de 10 minutos después de haber realizado la mezcla. Una vez terminado el proceso de congelación por el equipo automatizado para este fin, se introduce la bolsa en un "rack" y en un "portarack" debidamente identificado, para su posterior registro en la libreta de documentación.
- Se informa a la brevedad posible los resultados capturados en el procedimiento a los médicos encargados del programa. <sup>20, 36, 46</sup>

#### IV. Reinfusión de CPH's almacenadas en el BCS CMN

<b>Procedimiento:</b> Reinfusión de CPH's para paciente en hospitalización.	<b>Responsables:</b> Carlos Martínez-Murillo Javier Bautista Juárez.	<b>Elaboró:</b> Javier Bautista Juárez
	<b>Número:</b> 2	<b>Revisó:</b> Dolores Uribe
<b>Primera edición:</b> Ene-2002	<b>Edición previa:</b> Ene-2002	<b>Última Edición:</b> Oct-2004

##### 4.1 Procedimiento

En el día -3 previo a la reinfusión de las células progenitoras hematopoyéticas, se realiza una cuenta celular para obtener el porcentaje de viabilidad de los tubos crioviales congelados, además, se confirma la hora del procedimiento y se verifica que se haya enviado la solicitud de salida de los productos al Banco Central de Sangre. Se constata que el hospital involucrado cuente con la bolsa de alimentación parenteral para usarse en caso de que alguna bolsa con producto halla sufrido alguna ruptura, con lo cual se garantiza la esterilidad del mismo, aunado a que el médico previamente trato al paciente con antibióticos y antimicóticos si fuera o el médico tratante lo indica.

1. Se revisa, según la hoja de trabajo, el material que se trasladará al hospital solicitante, se recibe y se registra el material con los encargados de seguridad del hospital solicitante que se encuentren en la entrada.
2. En el servicio de Hematología (transplantes) se informa y se coordina con el encargado del servicio. Se usa el uniforme quirúrgico.
3. Para leer el procedimiento y verificar que todo el material, el equipo y el personal estén en orden, hay que coordinarse con el responsable del servicio, para poder tomar las medidas preventivas de cambio si hay alguna anomalía.
4. En cuanto al Banco de Sangre, uno de los primeros movimientos que hay que realizar es la asepsia del baño maría, y en el lugar asignado para trabajar. Se vacían tres litros de solución salina isotónica al 0.9% estéril en el interior del baño maría, y se programa a 37-39° C . Se espera a que la temperatura sea la adecuada, se prepara el material y el equipo para el momento de la reinfusión.

5. Al momento de empezar el procedimiento, se espera a que el personal de enfermería tenga listo el catéter del paciente, y se descongela la primera bolsa bajo la indicación del médico responsable del procedimiento, se verifica su nombre y el número de unidad además de la fecha de extracción, la cual será registrada por la persona que esta ayudando en el proceso. Cuando la bolsa esté por descongelarse por completo (tamaño de una moneda de diez pesos), se avisa a la enfermera para que se le proporcione el primer producto, entonces se saca del baño maría y se seca con una compresa, para entregarlo inmediatamente a la enfermera encargada de la transfusión.
6. El producto debe de ser transfundido en menos de 5 minutos si la bolsa es de 60 mL y en menos de 10 minutos si la bolsa es de 100 mL.
7. Cuando se reinfunde aproximadamente la mitad de la unidad se empieza a descongelar el siguiente producto con la autorización del médico encargado del paciente y a menos que exista alguna reacción, se termina de descongelar el nuevo producto. En caso de existir alguna reacción se saca el producto del baño maría y se mantiene sobre algún refrigerante hasta que el médico encargado haya realizado los procedimientos correspondientes y autorice continuar las transfusiones.
8. Cuando se termine de reinfundir la primera bolsa y después de entregar la segunda, la persona que se encuentre ayudando en el proceso, recoge la bolsa vacía, la marca y la corta en una de las esquinas para que entre aire, después con una jeringa de 5 mL se perfora la bolsa por una de las esquinas tomando aproximadamente 0.5 mL del residuo de la cosecha, inmediatamente después se quita la aguja y se trasvasa el contenido a uno de los tubos de 12x75, previamente preparados con la misma cantidad del colorante de azul de tripano, se resuspenden bien las células y se dejan reposando en la gradilla asignada para la prueba.
9. Se realizan estos pasos, hasta que se hayan terminado de reinfundir todos los productos. Al terminar todo el procedimiento se guarda el material y el equipo, se desecha toda la basura en sus recipientes correspondientes.

El personal se cambia de ropa y se da salida al material en la entrada con el encargado de seguridad del hospital.

10. En el laboratorio se realiza la lectura de la viabilidad de las muestras tomadas de las bolsas vacías en el hospital donde se realizó la reinfusión, esto con la finalidad de constatar que el estudio realizado previamente a los tubos crioviales concuerden con los del interior de la bolsa. <sup>10, 13, 17, 26, 28, 63, 69</sup>

## V. Filtración de concentrados eritrocitarios

<b>Procedimiento:</b> Filtración pre-almacenamiento de Concentrados Eritrocitarios.	<b>Responsables:</b> Carlos Martínez-Murillo Javier Bautista Juárez	<b>Elaboró:</b> Javier Bautista Juárez.
	<b>Número:</b> 3	<b>Revisó:</b> Dolores Uribe
<b>Primera edición:</b> Dic-2000	<b>Edición previa:</b> Ene-2002	<b>Última edición:</b> Dic-2003

### 5.1 Generalidades

El uso de componentes celulares leucorreducidos es un procedimiento rutinario en el campo de la hemoterapia moderna. Desde la década de los 70's cuando se plantearon las interrogantes acerca del papel de los leucocitos en:

1. La inmunización del receptor
2. Su uso en la lucha contra la sepsis bacteriana
3. Su participación en la incidencia de las reacciones injerto contra hospedero y
4. Su relación con la presencia de microagregados en los alvéolos pulmonares

Los métodos para la prevención de infección asociada a la transfusión son:

- El corrimiento de los estudios serológicos específicos
- Archivo de panel de donadores ya conocidos
- Congelación y descongelación de sangre con criopreservante adecuado y lavado del producto
- Irradiación de componentes sanguíneos
- Uso de agentes antivirales
- Depleción de leucocitos en los productos
- Centrifugación
- Filtración <sup>4, 5, 41, 48, 62</sup>

¿Quiénes pueden recibir componentes seronegativos o leucorreducidos?

*Indicación mayor:*

- R.N. seronegativos con peso menor de 1,250g
- Receptores de alotransplantes de órganos seronegativos
- Individuos infectados a VIH con serología negativa para CMV
- Mujeres embarazadas seronegativas

*Indicaciones posibles*

- Todos los R.N. seronegativos con madres seronegativas
- Otros pacientes inmunocomprometidos seronegativos
- Mujeres embarazadas seronegativas
- En cirugía mayor con pacientes seronegativos

Pero una realidad es clara, el proceso de leucorreducción ayuda a la prevención de reacciones transfusionales y a la transmisión de enfermedades infecciosas (CMV), así como también en la aloinmunización al HLA.<sup>41, 62</sup>

## **5.2 Procedimiento**

1. Las unidades de C.E. se seleccionan para su filtración.
2. Los siguientes datos del donador se anotan en la libreta del protocolo:
  - Fecha del procedimiento
  - Fecha de extracción del producto
  - Días de conservación
  - Número de unidad
  - Nombre del donador
  - Sexo
  - Si el donador es externo o si es donador del Banco de Sangre
  - Tipo de anticoagulante utilizado



3. El producto se pesa para después poder obtener el volumen del C.E. La unidad de sangre se mezcla con la ayuda del rodillo y después se obtiene un piloto representativo de ésta.
4. Se conecta el filtro pre-almacenamiento con la unidad del concentrado eritrocitario, por medio del conector estéril "terumo". La unidad se cuelga, y se abre el sello de unión dejado por el conector, se aprieta suavemente la unidad del C.E. hasta que las primeras gotas de la suspensión sanguínea atraviesen completamente el filtro del equipo y se toma el tiempo con el cronómetro.
5. Cuando falte aproximadamente 1/3 del producto por filtrarse, se cierra la pinza que esta unida al filtro, y se abre la pinza que esta conectada a la trampa de aire, y sin hacer mucha presión se presiona ligeramente con la mano lo ya filtrado y transferir el aire a la bolsa base, para después cerrar la pinza de la trampa de aire y se abre nuevamente la pinza que une a la bolsa base con el filtro.
6. Una vez terminado el procedimiento, se detiene el cronómetro y se recaban los datos para obtener el tiempo final de filtrado. La unidad filtrada se pesa y se anotan los datos en la libreta.
7. El producto filtrado se mezcla suavemente y con la ayuda del rodillo, para obtener una muestra sellando previamente con calor dieléctrico.
8. A los pilotos obtenidos de la bolsa pre y post-filtrado se les realiza el estudio para la biometría hemática en el contador celular automatizado. Si el donador fuera del Banco Central de Sangre se anotan los resultados de su B.H. basal previa a la donación.
9. A los productos ya filtrados, elaborarles su etiqueta y marcar en esta con algún color evidente, que el producto fue filtrado con equipo de X-logaritmos.
10. Se procede posteriormente a entregar los productos al área de refrigeradores con el médico responsable, el cual canalizara los productos a las unidades previamente establecidas en el protocolo.

### 5.3 Equipo, material y reactivos

- Conector estéril (TERUMO, termosterile tubing welder, TSCD, Mod SC201A)
  - Sellador dieléctrico (BAXTER, Fenwal Hematron II dielectric sealer)
  - Contador celular automatizado (Cell-Dyn 3700, Abbott Diagnostics Division Mod CD3700SL; Seri 20710AK List No. 02H31-01)
  - Sistema de Computo "TESI-lab"
  - Filtros de tercera generación (3-4 logaritmos) pre-almacenamiento (BAXTER, Fenwal, filtro para remover leucocitos Sepacell; #Lote A0E12308; Baxter Healthcare Corporation, Fenwal Division; Deerfield IL 60015 USA)
  - Navajas para conector estéril (BAXTER, navajas selladoras, #Lote 1071, Baxter Healthcare Corporation, Fenwal Division; Deerfield IL 60015 USA)
  - Etiquetas
  - Cronometro
  - Libreta de anotaciones
  - Tubos de 12x75
  - Papel parafilm
  - Pinzas de punta curva
  - Frasco con benzal
  - Gasas cortadas no estériles
  - Rodillo de tubo colector
  - Tijeras
- 
- Concentrados eritrocitarios de no más de 5 días de extracción

## VI. Fraccionamiento de hemocomponentes con conector estéril

<b>Procedimiento:</b> Fraccionamiento de hemocomponentes.	<b>Responsables:</b> Carlos Martínez-Murillo Javier Bautista Juárez	<b>Elaboró:</b> Javier Bautista Juárez.
	<b>Número: 1</b>	<b>Revisó:</b> Dolores Uribe
<b>Primera edición:</b> Dic.2002	<b>Edición previa:</b> no realizada	<b>Última edición:</b> Dic-2003

### 6.1 Generalidades

Nuestro país aún no es autosuficiente en productos sanguíneos, por lo que la optimización de estos es necesaria, y como ejemplo es la cantidad de sangre que se desperdicia con los pacientes pediátricos en algunos centros hospitalarios donde la cantidad transfundida en algunas ocasiones es de 30 mL, desperdiciando el volumen restante del producto o arriesgando a la contaminación bacteriana al producto y al paciente que lo reciba. Por lo que utilizar tecnología que nos ayude a obtener los productos en cantidades y volumen razonables es necesario en cualquier centro de transfusión.<sup>41, 48</sup>

### 6.2 Procedimiento

1. Se reúnen los productos sanguíneos a fraccionar (concentrados eritrocitarios, sangre total, aferesis plaquetaria, plasma, etc.) y se verifica que todos se encuentren en buenas condiciones o validados para su utilización.
2. Se separa la cantidad exacta de bolsas satélites a utilizar. El conector se limpia y se verifica su buen funcionamiento, colocando además un cartucho de navajas con la cantidad suficiente para trabajar.
3. Antes de colocar los tubos colectores de la bolsa de sangre al conector estéril, se verifica que éste, no contenga coágulos o agregados en su interior. Para iniciar a utilizar el conector hay que encenderlo de la parte trasera con el botón de fuente de poder.
4. Después se oprime el botón de mando para emparejar los rieles del conector, el cual se encuentra de color plateado siendo el primero de los tres que se encuentran en serie (tiene como signo una paloma).

5. Siguiendo las recomendaciones de uso del aparato, se colocan los dos tubos colectores de la bolsa a unir en la posición que indica el aparato: se toma en cuenta que en la parte superior a la izquierda y en la parte inferior a la derecha de los rieles, serán donde se encuentren las mangueras que se van a desechar.
6. Se colocan las mangueras (tubos colectores) adecuadamente y se tapan con las placas de aluminio con que cuenta el sistema. Hay que oprimir el botón con el número uno (central), el cual nos dará la pauta y la autorización de cambiar la navaja de cobre para poder utilizar una nueva.
7. Después se cambia la navaja recorriendo la palanca que se encuentra junto al cartucho. Se desecha la navaja y se regresa la palanca a su posición original.

### **6.3 Material**

- Bolsas cuádruples con capacidad de 150 mL (BAXTER, Fenwal; 6 units quadruple transfer pack container 150 mL with coupler; A02JO8308 Code 4R2004)
- Conector estéril (TERUMO, terumo sterile tubing welder, TSCD, Mod. SC201A)
- Navajas para conector estéril
- Gasa estéril
- Guantes
- Cubrebocas
- Tripie con ganchos
- Pinzas
- Tijeras

## VII. Control de calidad de productos leucorreducidos

<b>Procedimiento:</b> Control de calidad de productos leucorreducidos.	<b>Responsables:</b> Carlos Martínez-Murillo Javier Bautista Juárez	<b>Elaboró:</b> Javier Bautista Juárez
	<b>Número:</b> 1	<b>Revisó:</b> Dolores Uribe
<b>Primera edición:</b> Dic-2002	<b>Edición previa:</b> no realizada	<b>Última edición:</b> Dic-2002

### 7.1 Generalidades

El control de calidad de productos leucorreducidos es importante para verificar el filtro a utilizar, por lo que es necesario tener una hoja de trabajo lista para su utilización que contenga todos los parámetros medibles durante el proceso.

Es importante contar con el inserto del fabricante para poder adicionar algún parámetro que no se tenga contemplado y para poder comparar los resultados obtenidos con los esperados. El inserto tiene como finalidad, el de indicar los pasos necesarios y adecuados para realizar el proceso correctamente.

Todos los parámetros anteriormente descritos deben de valorarse al anotarlos en la tabla correspondiente (Anexo II).

- Al leucorreducir los productos estos deben de tener menos de cinco días de haber sido colectados.
- El anticoagulante no tiene importancia sin embargo, es importante para considerar el tiempo de filtrado, ya que entre más concentrado se encuentre el producto, mayor será el tiempo de filtración.
- A partir del peso bruto de la sangre, se calcula el volumen a filtrar, utilizando además el peso de la bolsa vacía y la densidad del producto a filtrar.
- Con el peso del filtro con sangre sabemos el volumen perdido o retenido durante el procedimiento, restando el peso del filtro vacío y dividiendo entre la densidad del producto a filtrar.

- El resultado de la cuenta diferencial de la biometría hemática nos ayuda a comprender que proporción de células está reteniendo el filtro durante el proceso por lo que es importante para saber el tipo de células que mejor retienen.
- El filtro para reducir leucocitos, también retiene plaquetas, por lo que su informe pre y post deben de anotarse para su posterior comparación.
- La hemoglobina y el hematocrito no deben de variar, por lo que los resultados pre y post deben ser muy parecidos y por lo tanto serán un control interno de la reproducibilidad.
- Los leucocitos por citometría de flujo, por cuenta en cámara de Nageotte, por porcentaje de reducción o por logaritmos de reducción, son términos que se dan para determinar el número de leucocitos en la bolsa final, o el número de leucocitos perdidos para poderlos comparar con los leucocitos iniciales previos a la filtración. <sup>4, 5, 41, 48, 62</sup>

## 7.2 Equipo para los procedimientos

*Biometría hemática completa:* ésta, se realiza en el contador celular automatizado (Cell-Dyn 3700 de Abbott Diagnostics Division Modelo CD 3700SL serie 20710AK list No. 02H31-01). Primero se realiza un lavado en los orificios del equipo y una lectura de fondo como control de calidad del equipo. El estudio de la muestra se realiza por duplicado, y solo en caso de que el equipo registre algún valor fuera del rango (elevado), se realiza una dilución 1:2 con SSI 0.9% para obtener los valores de los leucocitos, así como la cuenta diferencial. Una vez registrados e impresos los resultados, se realizan los cálculos de las células mononucleares en la cosecha (CMN/harvest).

*Grupo sanguíneo ABO y Rho(D):* para este estudio se utilizan: los antisueros anti-A, anti-B, anti-AB (Laboratorios LAFON; sueros monoclonales, Lote 8730, F.C. 14 abril 2005), anti-D (policlonal) y suero control del Rh (DIAGAST Laboratories, monoclonales; Lot. 049000).

Tubos de 12x75, centrifuga (Clay Adams; Serofuge), pipetas Pasteur, bulbos para pipetas Pasteur, SSI 0.9%, suero de Coombs (LAFON; anti-globulina humana (monoclonal, policlonal) poliespecífico; Lote 381; F.C. 07 marzo 2005), eritrocitos sensibilizados, pipeta y baño maría.

Para este procedimiento se resuspende una gota de eritrocitos del producto con SSI 0.9% en un tubo de ensayo de tal forma que tenga una concentración de entre 2-3%, inmediatamente se agrega una gota de la suspensión en cinco tubos más una gota de cada antisuero o lo que indique el inserto de cada reactivo. Se homogeneizan muy bien las células con los antisueros y se centrifugan a 3200 r.p.m., después se realiza la lectura de cada tubo cuidadosamente y se registran los resultados. Solo en caso de que el tubo que contiene el reactivo anti-D proporcione un resultado negativo, la prueba se lleva hasta Coombs junto con el tubo del suero control del Rh.

*Coombs directo:* para este procedimiento se utiliza suero de Coombs poliespecífico, tubos de 12x75 y centrifuga (Clay Adams; Serofuge), y para lo cual se lava una gota de los eritrocitos de la cosecha y se resuspenden hasta una concentración al 2-3% con SSI al 0.9% en un tubo de ensayo. En otro tubo se adicionan dos gotas del suero de Coombs poliespecífico (o lo que indique el inserto) y una gota eritrocitos resuspendidos, se homogeneizan y se centrifugan a 3200 r.p.m., se realiza la lectura, observando la ausencia o la presencia de aglutinación y se registran resultados.

*Determinación de las células CD34 por citometría de flujo:* para este procedimiento se utiliza el equipo Facs Calibur (Becton Dickinson) con el programa de ProCount, el cual cuenta con un juego especial de controles y de sueros específicos de anti-CD34, para la debida determinación de la muestra anticoagulada.

El cual cuenta con el programa para reportar las CD34 absolutas, las CD34 en la cosecha y así como los datos del CD34 /Kg del paciente (dosis).

*Viabilidad celular:* se utiliza el colorante azul de tripano al 0.4% en SSI 0.9% y cuya mezcla debe de filtrarse periódicamente para evitar la acumulación de hongos, bacterias y levaduras. En este procedimiento se utiliza la misma muestra anticoagulada volumen a volumen con el colorante (100  $\mu$ L y 100  $\mu$ L) y la lectura se realiza en menos de 10 minutos en el microscopio óptico (OLYMPUS Optical Co. LTP; Made in Japan Olympus CH-2 Japan 151586Model CHS No. 5L0158) en un aumento de 40x o 100x, se anotan el número de células vivas después de haber contado en una cámara de Neubauer.

*Cultivos microbiológicos:* en este estudio se utiliza el equipo Bact Alert 120 (Organon Teknika) y para evitar sustraer cantidades excesivas de la muestra a sembrar se utilizaran frascos pediátricos que después de haber sido inoculados se introducen en el equipo automatizado para su posterior registro en el sistema de cómputo y para la detección de microorganismos por el equipo. La incubación tiene un tiempo aproximado de 7 días y en caso de positividad se realiza la identificación mediante las pruebas correspondientes.

*Serología de enfermedades transmisibles:* los estudios se realizan en los equipos Prisma y AxSYM System (Abbott Diagnostics División). Para el estudio se utiliza suero de la madre que no este icterica ni lipémica utilizándose el equipo para ELISA de competencia para su exclusión.

En caso de existir algún resultado reactivo, se repite la prueba por el mismo método, una vez que se confirme la reactividad se efectúan los estudios confirmatorios por Western Blot o Elisa confirmatorios por diluciones en el mismo BCS CMN SXXI.

*Criopreservación:* se realiza en el equipo automatizado para criopreservación de muestras biológicas CRIYOMED, el cual consta de computadora, graficadora, cámara de congelación, tanque de nitrógeno líquido y tanque de almacenamiento. El proceso se efectuara según en programa seleccionado para el tejido específico.



## VIII. Cultivo celular hematopoyético

<b>Procedimiento:</b> Cultivo Celular Hematopoyético	<b>Responsables:</b> Carlos Martínez-Murillo Javier Bautista Juárez	<b>Elaboró:</b> Javier Bautista Juárez
	<b>Número:</b> 1	<b>Revisó:</b> Verónica Sánchez Portillo
<b>Primera edición:</b> Nov-2003	<b>Edición previa:</b> no realizada	<b>Última edición:</b> Nov-2003.

### 8.1 Generalidades

Antes de llevar a cabo el trasplante de células hematopoyéticas (médula ósea, sangre periférica o de cordón umbilical), es necesario que se realice la valoración de la capacidad de reconstitución hematológica de la fracción celular que se va a utilizar como injerto.<sup>7, 23, 57</sup>

Para ello es importante conocer, además del número de células nucleadas totales (CNT), el número de las células mononucleares (CMN), el número de marcadores celulares para las CPH's por citometría de flujo (CD34), la integridad de las mismas mediante técnicas de viabilidad, y la cantidad de precursores hematopoyéticos por medio de cultivos celulares.<sup>29, 64</sup>

*Cultivo de precursores hematopoyéticos en medio semisólido con Metho Cult:* el cultivo *in vitro* de progenitores hematopoyéticos, constituye un índice de la capacidad de repoblación de las células que se van a trasplantar; además de valorar el sentido de maduración de cada uno de los precursores mediante la cuantificación de las unidades formadoras de colonia (UFC).<sup>14, 44, 57</sup>

## 8.2 Procedimiento

**Nota:** para realizar la cuantificación de las células de la muestra a cultivar, puede ser necesario diluir la muestra (1:10).

**Tabla 5. Concentración recomendada de células en 1.1 mL de medio en el cultivo**

Muestra	Tipo de células	Concentración final deseada
Médula ósea	células de la capa leucoplaquetaria	$2 \times 10^5$
	células de baja densidad	$1 \times 10^5$
Sangre periférica	células de baja densidad	$4 \times 10^5$
	CMN de trasplante autólogo	$1 \times 10^5$
	CMN de trasplante alogénico	$5 \times 10^4$
	células CD34+ de trasplante autólogo	$1 \times 10^3$
	células CD34+ de trasplante alogénico	$5 \times 10^2$
Sangre de cordón umbilical	células mononucleares	$1 \times 10^4$

El cálculo del volumen de células a cultivar se realiza de la siguiente manera:

$$C1V1=C2V2$$

$$V1=(C2V2)/C1$$

Donde:

C1= conteo de células/mL

V1= ¿

C2= concentración de las células necesarias para cultivar

V2= 2.2 mL (volumen para dos cajas de cultivo)

### **Procedimiento:**

1. Adicionar el número adecuado de células mononucleares a un tubo que contiene 2.2 mL de medio utilizado como máximo 130  $\mu$ L de suspensión celular.
2. Homogenizar perfectamente.
3. Dejar reposar la suspensión por 2-3 minutos para eliminar burbujas.
4. Tomar 1 mL del contenido del tubo con la suspensión celular y sembrar en una caja de 35 mm moviendo por rotación suavemente para dispersar el medio dentro de la caja.
5. Colocar las dos cajas sembradas y colocarlas dentro de una caja de cultivo de 100 mm y manteniéndolas en una atmósfera de humedad total, si fuera necesario colocar una caja de 30 mm con agua estéril dentro de la misma.
6. Incubar a 37° C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación. Después de 10-14 días de incubación las colonias se cuantificaran con una caja de cuenta de 60 mm en microscopio invertido.

### **8.3 Equipo, material y reactivos**

- Campana de flujo laminar (TELSTAR; cabina de seguridad microbiiológica; Mod. BIO-IIA; Telstar Industrial, S.L. José Tapiolas 120, 08226 Terrassa, España)
- Centrifuga
- Incubadora de CO<sub>2</sub> (5%), temperatura 37° C y humedad mayor de 95%
- Microscopia óptico normal (OLYMPUS optical Co. LTP, Made in Japan, Olympus CH-2 Japan 151586 , Model CHS No.5L0158)
- Microscopio invertido (OLYMPUS M021, ULWCD 0.30 Olympus Japan CK<sub>2</sub> ZSO18000 J22608 086; Model CK<sub>2</sub> 120V 0.23<sup>a</sup>, 60Hz, Lamp 6V 20W 210019)
- Agitador vórtex
- Pipeteador automático
- Baño maría
- Tubos cónicos de polipropileno con tapa estériles y desechables de 15 mL
- Jeringas desechables estériles de 1 mL (PLASTIPAK, jeringa de plástico estéril y desechable, sin aguja, Cat. No 302584; Becton Dickinson de México S.A. de C.V. Km37.5 Aut Mex-Qro)

- Pipetas serológicas desechables de 10 mL o jeringas del mismo calibre
- Cajas de cultivo plástico estériles y desechables de 35 mm (GREINER, tissue culture dishes sterile)
- Cajas de cultivo plástico estériles y desechables de 100 mm (GREINER, tissue culture dishes sterile)
- Caja cuenta-colonias
- Agujas para jeringas desechables de 18Gx1.5 (Precision Glide, aguja estéril y desechable, 18G; Becton Dickinson de México S.A. de C.V. Cuautitlán Izcalli, México)
  
- Medio de cultivo semisólido condicionado Metho Cult GF H4433 (Stem Cell Technologies inc. Vancouver, B.C. No. Cat 004434)
- Amortiguador salino de fosfato (PBS) (Gibco BRL cat. 041-90834)
- Solución Lymphoprep Nycomed Pharma (Cat.804064)
- Medio de cultivo McCoy's (5A Medium modified, frasco 500mL; #Lote 01103012; Cambrex BioScience, Walkerville Inc., Walkerville MD USA)
- Filgrastim (Neurogen sol. Inyectable 30MU/1mL; #Lote B10162)
  
- Médula ósea o sangre periférica obtenida por aferesis
- Células mononucleares recuperadas en gradiente de Fycoll Hypaque
- Células CD34+ obtenidas mediante cualquier tipo de enriquecimiento
- Células criopreservadas por cualquier método
- Células obtenidas de sangre de cordón umbilical

## IX. Determinación de CD34 por citometría de flujo

<b>Procedimiento.</b>	<b>Responsables.</b>	<b>Elaboró.</b>
Determinación de CD34 por Citometría de Flujo.	Carlos Martínez-Murillo Javier Bautista Juárez	Javier Bautista Juárez
	<b>Número. 1</b>	<b>Revisó. Javier Bautista Juárez</b>
<b>Primera edición. Mar-2004</b>	<b>Edición previa. no realizada</b>	<b>Última edición. Mar-2004..</b>

### 9.1 Generalidades

La citometría de flujo es una tecnología que nos permite la medición simultánea de características físicas de múltiples partículas individuales, usualmente células, cuando se hacen pasar individualmente por medio de flujo hidrodinámico, ante la incidencia de un rayo láser. La información que puede ser obtenida acerca de una célula usando la citometría de flujo incluye:

- Su tamaño relativo (dispersión frontal FCS: forward scatter)
- Su granularidad o complejidad interna (dispersión lateral SSC: side scatter)
- Y su intensidad de fluorescencia relativa (FL1, FL2 y FL3)

Las características del tamaño relativo y granularidad son detectados utilizando un sistema de acoplamiento óptico a eléctrico que registra como una célula desvía la luz láser incidente y emite fluorescencia.

En citometría se utilizan anticuerpos monoclonales previamente acoplados a la membrana celular, los cuales están marcados con un fluorocromo, el cual se manifiesta al ser excitado por el rayo láser permitiendo así detectar, cuantificar y clasificar cada célula de la muestra a analizar de acuerdo a su capacidad de dispersar la luz y emitir fluorescencia. Los parámetros registrados por ésta tecnología ayudan a la clasificación específica de las células de muestra en poblaciones y subpoblaciones, determinado el número y tipo de antígeno de superficie en la membrana de cada célula o midiendo parámetros celulares de DNA o la actividad enzimático celular.<sup>25, 36, 49, 59, 64</sup>

**Procedimiento :**

1. En un tubo trucount, previamente revisado, agregar 10ul de anticuerpo anti-CD34 y 10ul de anti CD-45, procurando no mezclar los reactivos hasta no haber agregado la muestra.
2. Agregar 50 ul de muestra a estudiar tomando en cuenta que deben de existir entre 20 y 50 k/ul de leucocitos para que la lectura en el citómetro sea lo mas exacta posible, si el valor no es el adecuado, diluirla muestra para obtener el valor deseado.
3. Mezclar en vortex unos segundos y dejar incubando la reacción en obscuridad a una temperatura de 18-22° C durante 15 minutos.
4. Pasado el tiempo de incubación, agregar 1 mililitro de lisante eritrocitario (cloruro de amonio), y dejar actuar al reactivo por un tiempo mínimo de 5 minutos en el mismo lugar oscuro con las mismas condiciones de temperatura.
5. Durante este lapso, encender el citómetro entrando al programa específico para la cuenta de CD34, agregar reactivos consumibles por el equipo, y calibrar si fuera necesario.
6. Pasado el tiempo de incubación colocar las muestras en el carrusel de trabajo y dar la orden de inicio al equipo para su procesamiento.
7. Esperar a que se imprima el reporte del estudio y realizar los cálculos para su reporte oficial al médico responsable del programa.
8. Esperar que el equipo realice su mantenimiento y limpieza y apagarlo.

## Anexo I

### 1. Preparación de reactivos y soluciones

#### 1.1 Azul de tripano al 0.4%

<b>Procedimiento:</b> Preparación de azul de tripano al 0.4%	<b>Responsables:</b> Carlos Martínez-Murillo Javier Bautista Juárez	<b>Elaboró:</b> Javier Bautista Juárez
	<b>Número:</b> 3	<b>Revisó:</b> Dolores Uribe
<b>Primera edición:</b> Dic-2000	<b>Edición previa:</b> Ene-2002	<b>Última Edición:</b> Dic-2003

#### **Procedimiento**

1. Se enciende la báscula y se deja calentar durante 15 minutos. Después de este tiempo se calibra, se introduce el papel seleccionado y se "tara" a 0.000.
2. Se agrega con la espátula el colorante y se pesa 0.400g. Posteriormente se deposita cuidadosamente en el matraz aforado perfectamente limpio. Se apaga la báscula y se limpia.
3. Con el amortiguador de P.B.S aforar a 100 mL, se mezcla y se disuelve la sal completamente y se mantiene a una temperatura de 18°-22°C.
4. La solución anterior se filtra y se transfiere a un frasco color ámbar conservando la solución a una temperatura de 18°-22°C y protegido de la luz.
5. Se etiquetan los frascos con los siguientes datos:
  - Fecha de Elaboración
  - Nombre de quien lo elaboró
  - Nombre de la solución
  - Temperatura de conservación <sup>4, 23, 58, 59</sup>

### ***Material y reactivos***

- Báscula analítica
- Espátula
- Frasco ámbar con capacidad de 150 mL
- Matraz aforado de 100 mL
- Papel filtro
- Embudo
  
- Amortiguador P.B.S o S.S.I.
- Azul de tripano R.A. (SIGMA, Trypan blue, direct Blue 14, 100g; #Lote 68F3670; Sigma-Chemical CO, PO Box 14508 St Louis MO 63178 USA)



## 1.2 Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

<b>Procedimiento:</b> Solución amortiguadora de fosfatos PBS.	<b>Responsables:</b> Carlos Martínez-Murillo Javier Bautista Juárez	<b>Elaboró:</b> Javier Bautista Juárez
	<b>Número:</b> 3	<b>Revisó:</b> Dolores Uribe
<b>Primera Edición:</b> Dic-2000	<b>Edición previa:</b> Ene-2002	<b>Última edición:</b> Dic-2003

### **Procedimiento**

1. Se enciende la báscula y se deja estabilizar durante 15 minutos. Después de este tiempo se calibra, se introduce el papel seleccionado y se "tara" a 0.000.
2. Se pesan con exactitud las sales y después se traspasan a un matraz aforado.
3. Después de cada pesada se tara la balanza y al finalizar se apaga el equipo.
4. La cantidad de las sales dependerá del pH final deseado de la solución final, las cuales se presentan en la siguiente tabla:

**Tabla 6. Preparación de la solución amortiguadora de fosfatos (PBS)**

<b>Sal R.A.</b>	<b>pH 7.5</b>	<b>pH 7.4</b>
NaCl	8.0 g	8.0 g
KCl	0.2 g	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g	2.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g	0.20 g

5. Después de terminar de pesar las sales se agrega agua destilada hasta aforar el matraz a 1000 mL.
6. Se disuelven completamente las sales por agitación. Se mide el pH de la solución en un potenciómetro y se ajusta con una base o un ácido.
7. La solución anterior sirve como "solución madre" de la cual se tiene que diluir 1:10 con agua destilada para tener un amortiguador listo para su uso.

### **Material y reactivos**

- Balanza analítica
- Matraz aforado de 1000 mL
- Espátula
- Tiras reactivas para pH o potenciómetro
- Pipetas graduadas de 1 mL
- Pipetas graduadas de 5 mL
- Pipetas graduadas de 10 mL
  
- NaCl R.A. (MERCK, Cloruro de sodio, cristal, IK 603113N, Art. 6404, Merck México S.A. 720-1 P.M 58.44g/mol)
- KCl R.A.
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> R.A. (MERCK, Fosfato de sodio anhidro, 603153R 442-1, P.M 141.96 g/mol)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> R.A. (BAKER Analyzed, Fosfato de potasio monobásico, Lote M-273M, J.T. Baker)
- H<sub>2</sub>O destilada
- Acido
- Base

### 1.3 Solución criopreservante con dimetilsulfóxido (DMSO)

<b>Procedimiento:</b> Solución Criopreservante con DMSO al 10%.	<b>Responsables:</b> Carlos Martínez-Murillo Javier Bautista Juárez	<b>Elaboró:</b> Javier Bautista Juárez.
	<b>Número:</b> 3	<b>Revisó:</b> Dolores Uribe
<b>Primera edición:</b> Dic-2000	<b>Edición previa:</b> Ene-2002	<b>Última edición:</b> Dic-2003

#### **Procedimiento**

1. Para preparar la solución criopreservante con DMSO se debe de trabajar en condiciones estériles y con material limpio y estéril, dentro de la campana de bioseguridad y con los reactivos a una temperatura de 4°C.
2. En un frasco estéril se colocan 35 mL del medio RPM 199 o del plasma del paciente y se adiciona 35 mL de agua estéril. Inmediatamente después se agrega 7 mL de albúmina bovina y se mezcla la solución cuidadosamente y se introduce el frasco en un recipiente que contenga hielo "frappe" con una capa intermedia de papel aluminio.
3. A la solución anterior se le adiciona 3 mL de solución salina isotónica al 0.9%. Por último se adiciona 20 mL de DMSO con la finalidad de tener una relación 1:2 vol/vol, por lo que si se desea preparar más dilución, se debe conservar la relación.

**Tabla 7. Cantidades de reactivos necesarios para preparar 50, 100, 150 y 200 mL de solución criopreservante con DMSO.**

Reactivo	Para 50 mL	Para 100 mL	Para 150 mL	Para 200 mL
<b>Medio RPM 199</b>	17.5 mL	35 mL	52.5 mL	70 mL
<b>H2O Destilada</b>	17.5 mL	35 mL	52.5 mL	70 mL
<b>Albúmina</b>	3.5 mL	7 mL	10.5 mL	14 mL
<b>SSI</b>	1.5 mL	3 mL	4.5 mL	6.0 mL
<b>DMSO</b>	10.0 mL	20 mL	30 mL	40 mL

**Tabla 8. Cantidades de reactivos necesarios para preparar 50, 75, 100 y 120 mL de solución criopreservante con DMSO.**

Producto	Para 50 mL	Para 75 mL	Para 100 mL	Para 120 mL
<b>Plasma compatible</b>	40 mL	60 mL	80 mL	96 mL
<b>DMSO</b>	10 mL	15 mL	20 mL	24 mL

4. La solución anterior se conserva a una temperatura de 4°C en hielo “frappe” dentro de la campana hasta su uso. El resto de la solución que no se utilice se desecha. <sup>4, 11, 17, 37, 38, 39, 43</sup>

### **Material y reactivos**

- Frasco ámbar (estéril) con capacidad de 120-150 mL
- Pipetas graduadas (desechables y estériles) de 5 y 10 mL
- Campana de flujo laminar (TELSTAR; cabina de seguridad microbológica; Mod. BIO-IIA; Telstar Industrial, S.L. José Tapiolas 120, 08226 Terrassa, España)
- Gasas estériles
- Propipetas
- Recipiente con hielo “frappé”
- Refrigerador
- Pinzas y tijeras
- Cubrebocas y guantes

### Sal R. A

### Temperatura de conservación

- |                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| • Medio RPM 199 ó plasma del paciente | 4°C       |
| • Agua destilada estéril              | 4°C       |
| • Albúmina inyectable                 | 4°C       |
| • Solución salina isotónica 0.9%      | 4°C       |
| • Dimetilsulfóxido (DMSO)             | 18-22 ° C |

## 1.4 Solución criopreservante con DMSO-dextran40

<b>Procedimiento:</b> Solución criopreservante con DMSO-Dextran-40. (50%-5%)	<b>Responsables:</b> Carlos Martínez-Murillo Javier Bautista Juárez	<b>Elaboró:</b> Javier Bautista Juárez.
	<b>Número:</b> 1	<b>Revisó:</b> Verónica Sánchez Portillo
<b>Primera edición:</b> Nov-2003	<b>Edición previa:</b> Nov-2003	<b>Última edición:</b> Oct-2004

### **Procedimiento**

1. Se realiza la asepsia de la campana de flujo laminar y se acondiciona dentro de esta el material, previamente esterilizado, de tal forma que se pueda utilizar en orden de uso. Se deja la solución de dextran 40 dentro del hielo "frappé" durante todo el procedimiento.
2. Se enciende la luz ultravioleta (UV) el tiempo estimado por el fabricante con el material dentro de esta. Transcurrido el tiempo de la luz UV, se encienden los motores de extracción de aire y se dejan trabajar durante quince minutos antes de empezar a preparar la solución.
3. Con la solución de dextran 40 a una temperatura de 4° se abre el frasco que lo contiene y en un matraz de 500 mL se afora e inmediatamente después se trasvasa a un matraz aforado de 1000 mL y se coloca dentro de un recipiente con el hielo "frappé".
4. Posteriormente dentro de la campana de flujo, aforar el DMSO en un matraz de 500 mL, esta solución se agrega muy lentamente (a una velocidad de 5 –10 ml por minuto) al matraz que contiene el dextran 40 dentro del hielo "frappe" y sin dejar de mezclar el recipiente hasta el final del procedimiento.
5. Una vez terminado este proceso se deja reposar el recipiente con la solución en el hielo "frappe", hasta el momento del envasado.
6. Con un bisturí estéril y previamente calentado con mechero, se desecha la cuerda de dos jeringas de 20 mL, se abren los frascos ámbar estériles de sus empaques y se preparan los tapones de goma y gárgolas para su envasado.

7. Del matraz de 1000 mL con la solución de DMSO-Dextran, y con la ayuda de una jeringa de 20 mL, se hace pasar la solución por el soporte del filtro milipore que será colocado sobre un frasco de vidrio estéril y se agrega la cantidad deseada en el mismo. Se procura adicionar la solución lentamente para evitar romper los filtros que se encuentran dentro del soporte del filtro milipore.
8. Se repite el procedimiento hasta agotar completamente el volumen preparado. Después se les coloca a todos los frascos su tapón de goma y tapa metálica para posteriormente engargolarlos, tomar al azar 5 % de los frascos y se mandan a sembrar para el cultivo bacteriológico.
9. Se colocan los frascos en cuarentena hasta contar con los resultados de bacteriología.
10. Se realizan las etiquetas para cada frasco las cuales deberán contener los siguientes datos: laboratorio de criopreservación, nombre del reactivo con las concentraciones correspondientes, lote (DDMMAA e iniciales de las personas que lo realizaron), fecha de caducidad (un año después de su producción) y finalmente BCS CMN SXXI, IMSS.
11. Después de obtener los resultados de bacteriología y que sean negativos, se liberan colocando los frascos en un lugar adecuado para su uso, de lo contrario dar destino final al lote completo. <sup>18, 27, 40, 43, 60</sup>

### **Material y reactivos**

- Frasco ámbar (estéril) con capacidad de 50 mL
- Tapón de hule y gárgola metálica para frasco ámbar
- Engargoladora
- Campana de flujo laminar (TELSTAR; cabina de seguridad microbilógica; Mod. BIO-IIA; Telstar Industrial, S.L. José Tapiolas 120, 08226 Terrassa, España)
- Gasas estériles
- Jeringas de 20 mL (PLASTIPAK, jeringa de plástico estéril y desechable, sin aguja, Cat. N° 302584; Becton Dickinson de México S.A. de C.V. Km37.5 Aut Mex-Qro)
- Agujas para las jeringas (Precision Glide, aguja estéril y desechable, 20G 1¼, Cat. No 301730, # Lote 2L056; Becton Dickinson de México S.A. de C.V. Cuautitlán Izcalli, México)
- Recipiente con hielo "frappé"

- Refrigerador
- Pinzas y tijeras
- Cubrebocas, gorra quirúrgica y guantes
- Bisturí y mechero bunsen
- Solución de alcohol al 70% como desinfectante
- Solución de iodine en torundas como desinfectante
- Matraz aforado de 500 mL
- Matraz aforado de 1000 mL
- Filtro milipore estéril con papel filtro de 10 micras y prefiltro (Millipore Swinnex-47)
  
- DMSO R.A. (SIGMA, Dimethyl sulfoxide IL; #Lote 21K0091; Sigma-Aldrich CO, PO Box 14508 St Louis MO 63178 USA)
- Dextran 40 al 10% (Rheomacrodex, sol. Inyectable 10%, envase 500mL, #Lote 033120, Laboratorios Pisa S.A. de C.V. Calle 7 #1308, Zonaind 44940 Guadalajara Jal., México)

## 1.5 Solución hidroxietilalmidón (HES)

<b>Procedimiento:</b> Solución hidroxietilalmidón al 6% (HES)	<b>Responsables:</b> Carlos Martínez-Murillo Javier Bautista Juárez	<b>Elaboró:</b> Javier Bautista Juárez.
	<b>Número:</b> 1	<b>Revisó:</b> Verónica Sánchez Portillo
<b>Primera edición:</b> Nov-2003	<b>Edición previa:</b> Nov-2003	<b>Última edición:</b> Nov-2003

### **Procedimiento**

1. Se realiza la asepsia de la campana de flujo laminar y se acondiciona dentro de esta el material, previamente esterilizado, de tal forma que se pueda utilizar en orden de uso. Se deja la solución de hidroxietilalmidón (HES) al 6% lista para su uso dentro de la campana y en el caso de utilizar HES al 10% se realiza la dilución correspondiente para llevarla hasta el 6% (aproximadamente 333.3 mL por cada 500 mL de HES al 10%). Para este procedimiento se utiliza un matraz Erlenmeyer.
2. Se enciende la luz ultravioleta (UV) el tiempo estimado por el fabricante con el material dentro de esta. Transcurrido el tiempo de la luz UV, se encienden los motores de extracción de aire y se dejan trabajar durante quince minutos antes de empezar a preparar la solución.
3. Con un bisturí estéril y previamente calentado con mechero, se desecha la cuerda de dos jeringas de 20 mL, se abren los frascos ámbar estériles de sus empaques y se preparan los tapones de goma y gárgolas para su envasado.
4. Del matraz de 1000 mL con la solución de HES al 6% y con la ayuda de una jeringa de 20 mL, se hace pasar la solución por el soporte de un filtro milipore que será colocado sobre un frasco de vidrio estéril y se agrega la cantidad deseada en el mismo. Se procura adicionar la solución lentamente para evitar romper los filtros que se encuentran dentro del soporte del filtro milipore.



5. Se repite el procedimiento hasta agotar completamente el volumen preparado. Después se les coloca a todos los frascos su tapón de goma y tapa metálica para posteriormente engargolarlos para tomar al azar 5 % de los frascos, y se mandan a sembrar para el cultivo bacteriológico.
6. Se colocan los frascos en cuarentena hasta contar con los resultados de bacteriología.
7. Se realizan las etiquetas para cada frasco y que contengan los siguientes datos: laboratorio de criopreservación, nombre del reactivo con las concentraciones correspondientes, lote (DDMMAA e iniciales de las personas que lo realizaron), fecha de caducidad (un año después de su producción) y finalmente BCS CMN SXXI, IMSS.
12. Después de obtener los resultados de bacteriología y que sean negativos, se liberan colocando los frascos en un lugar adecuado para su uso, en caso contrario se dará destino final a los frascos en recipientes sólidos. <sup>2, 27, 40, 46</sup>

### **Material y reactivos**

- Frasco ámbar (estéril) con capacidad de 50 mL
- Tapón de hule y gárgola metálica para frasco ámbar
- Engargoladora
- Campana de flujo laminar
- Gasas estériles
- Jeringas de 20 mL (PLASTIPAK, jeringa de plástico estéril y desechable, sin aguja, Cat. No 302584; Becton Dickinson de México S.A. de C.V. Km37.5 Aut Mex-Qro)
- Agujas para las jeringas (Precision Glide, aguja estéril y desechable, 20G 1½, Cat. No 301730, # Lote 2L056; Becton Dickinson de México S.A. de C.V. Cuautitlán Izcalli, México)
- Refrigerador
- Pinzas y tijeras
- Cubrebocas, gorra quirúrgica y guantes
- Bisturí y mechero bunsen
- Solución de alcohol al 70% como desinfectante
- Solución de iodine en torundas como desinfectante
- Matraz aforado de 500 mL

- Matraz aforado de 1000 mL
- Filtro milipore estéril con papel filtro de 10 micras y prefiltro
- Hidroxietilalmidón 6% ó al 10% (FRESENIUS KABI; HAES-steril (05), sol inyectable al 10%, frasco 500mL; #Lote N13210, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, D61346 Bad Homburg u.d.H Alemania)
- Solución Salina Isotónica al 0.9%

## 1.6 Solución criopreservante control

<b>Procedimiento:</b> Preparación de la solución criopreservante control.	<b>Responsables:</b> Carlos Martínez-Murillo Javier Bautista Juárez	<b>Elaboró:</b> Javier Bautista Juárez
	<b>Número:</b> 3	<b>Revisó:</b> Dolores Uribe
<b>Primera Edición:</b> Dic-2000	<b>Edición previa:</b> Ene-2002	<b>Última edición:</b> Dic-2003

### **Procedimiento**

1. Se trabaja en la campana en las mismas condiciones que para la preparación de la solución criopreservante; se adiciona en un frasco estéril 87 mL de SSI. Después con se adiciona 3 mL de albúmina bovina. Como reactivo final se adicionan 10 mL de DMSO. Se homogeniza y se adiciona la solución a una bolsa de poliolefina con capacidad de 60 mL, la cual estará conectada a un sensor de temperatura que se cambiara una vez al mes o cuando las gráficas no sean reproducibles. 4, 11, 17, 35, 37, 38, 39, 43, 60, 61

### **Material y reactivos**

- El mismo que la solución criopreservante
  
- Los mismos que la solución criopreservante

## 2. Preparación del equipo

### 2.1 Asepsia de la campana

<b>Procedimiento:</b> Asepsia de la campana.	<b>Responsables:</b> Carlos Martínez-Murillo Javier Bautista Juárez	<b>Elaboró:</b> Javier Bautista Juárez
	<b>Número:</b> 3	<b>Revisó:</b> Dolores Uribe
<b>Primera edición:</b> Dic-2000	<b>Edición previa:</b> Ene-2002	<b>Última edición:</b> Nov-2003

#### ***Medidas básicas para trabajar en la campana***

1. Se debe de utilizar la bata, el gorro quirúrgico, los guantes, el cubrebocas y si son necesarios los lentes protectores.
2. Se realiza la asepsia de la campana al inicio y al final del trabajo diario.
3. Se evita que los productos y reactivos, que así lo requieran, permanezcan innecesariamente fuera del control de la temperatura de 4°C.
4. Realizar limpieza exhaustiva por lo menos i vez al mes.

#### ***Procedimiento***

1. Se enciende la campana y el sistema de iluminación y se abre la ventana; ésta se limpia suavemente con fenol al 3% (sin rociar), de arriba hacia abajo con gasa estéril y con una pinza aséptica. Se limpia de la misma forma con benzal, por último con agua desionizada y se seca todo con una gasa estéril.
2. Antes del uso de la campana se enciende la luz ultravioleta y el motor del aire durante diez minutos. En la hoja asignada para los tiempos y horarios de uso se anota cada movimiento, además de las lecturas de partículas al momento de empezar y de terminar de trabajar.
3. Se realiza periódicamente el control microbiológico de la campana, del área de trabajo, del benzal, agua, fenol, etc.
4. Se reportar cualquier incidente en el área para corregir de inmediato el problema.

### ***Material y reactivos***

- Campana de flujo laminar
  - Pinzas
  - Tijeras
  - Frasco con benzal
  - Bata de manga larga
  - Gorro
  - Guantes
  - Cubrebocas
  - Lentes de protección
- 
- Fenol al 3%
  - Benzal
  - Agua desionizada estéril

### 3. Preparación del material biológico

#### 3.1 Viabilidad celular

<b>Procedimiento:</b> Viabilidad celular.	<b>Responsables:</b> Carlos Martínez-Murillo Javier Bautista Juárez	<b>Elaboró:</b> Javier Bautista Juárez
	<b>Número:</b> 3	<b>Revisó:</b> Dolores Uribe
<b>Primera edición:</b> Dic-2000	<b>Edición previa:</b> Ene-2002	<b>Última edición:</b> Dic-2003

#### **Introducción**

En los protocolos terapéuticos que utilizan el autotrasplante de médula ósea, y en algunos casos de alotrasplante, las células se someten a diversas manipulaciones que pueden dar lugar a variaciones cuantitativas, cualitativas o ambas. La valoración de las mismas puede hacerse por medio de diferentes pruebas, cuyo último fin será asegurar la capacidad de reconstitución hematológica de la fracción celular que se va a utilizar como injerto. Para ello es importante conocer, además del número de células nucleadas totales y de células mononucleares, la integridad de las mismas mediante técnicas de viabilidad, y la cantidad de precursores hematopoyéticos, por medio de técnicas de cultivo celular y marcadores inmunológicos. Por último, es necesario controlar la esterilidad del producto que se va a infundir.

#### **Procedimiento**

1. Se verifica que el material este completamente limpio. Se etiquetan los tubos de ensayo con las iniciales del paciente
2. Con la pipeta automática se toman 50  $\mu$ L de la muestra del paciente bien mezclado y se colocan en el tubo de ensayo previamente marcado.
3. Con otra punta se toman 50  $\mu$ L del reactivo azul de tripano y se adicionan al mismo tubo que contiene la muestra del paciente y se mezcla suavemente, y después se deposita la muestra en la cámara de Neubauer.

4. Se realiza la lectura de todas las células que aparezcan en los cinco cuadrantes centrales para eritrocitos de la cámara de Neubauer, y se reporta el porcentaje de células muertas y vivas. <sup>4, 23, 58, 59</sup>

**Material y reactivos**

- Portaobjetos
- Microscopio óptico
  
- Aceite de inmersión
- Pipeta automática 50  $\mu$ L
- Puntas para pipeta automática
- Tubos de ensayo de 12x75
- Cámara de Neubauer
- Cubreobjetos para cámara de Neubauer
  
- Azul de tripano al 0.4 %
- Muestra biológica
- Células tallo del paciente recolectada en tubo con E.D.T.A.

## Anexo II

### 1. Formato de recepción de Células de Cordón Umbilical (CCU)

Nombre del donador (madre del producto): _____																	
Número de identificación o afiliación del donador: _____																	
Hora de recolección de las células: _____																	
Forma de conservación de las células: _____																	
Hora de recepción en el Banco de Sangre CMN SXXI: _____																	
Condiciones de las células recibidas:																	
_____																	
Volumen aproximado de la cosecha: _____																	
Presencia de coágulos: Si ( ) No ( )																	
Presencia de aire: Si ( ) No ( )																	
Otros. Especifique: _____																	
_____																	
Grupo sanguíneo:																	
<table border="1"><thead><tr><th>Anti-A</th><th>Anti-B</th><th>Anti-AB</th><th>Anti-Rho(D)</th><th>Control Rh</th><th>Coombs Directo</th></tr></thead><tbody><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></tbody></table>						Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-Rho(D)	Control Rh	Coombs Directo						
Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-Rho(D)	Control Rh	Coombs Directo												
Por los antecedentes revisados se dará destino final (desecho) al producto:																	
SI ( ) NO ( )																	



**2. Hoja de trabajo para el control de calidad en productos leucorreducidos**

Parámetros / # unidad								
Tipo de Muestra	Pre	Post	Pre	Post	Post	Pre	Post	Pre
Fecha de Extracción								
Fecha de Procesamiento								
Anticoagulante								
Peso de CE con Bolsa (g)								
Volumen mL								
Tiempo de Filtración								
Peso de filtro								
Volumen retenido en filtro								
Leucocitos K/uL								
Neutrofilos %								
Linfocitos %								
Monocitos %								
Eosinofilos %								
Basofilos %								
Plaquetas K/uL								
Hemoglobina								
Hematocrito								
Leucocitos x CF								
%de reducción								
Logs. de reducción.								

**3. Hoja de uso de la Campana de Flujo Laminar Bio II-A**

<b>Fecha</b>	<b>Luz UV</b>			<b>Luz blanca</b>			<b>Motor filtros</b>			<b>Uso</b>	<b>Usuario</b>

**4. Formato para la determinación de grupos sanguíneos y factor RhO(D) en donadores.**

Identificación del donador	Anti A	Anti B	Anti AB	T (Autot)	GR A1	GR A2	GR B	GR O	Anti Rh(D)	C. Rh	Anti A1	Anti II	Resultados

Reviso: \_\_\_\_\_ Rectificación: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

## 5. Hoja de resultados

INFORMACIÓN DEL PACIENTE	INFORMACIÓN DEL DONADOR
Nombre:	Nombre:
Diagnóstico:	ABO/Rh:
Hospital:	Peso actual (Kg):
ABO/Rh:	Separador celular
Peso actual (Kg):	No. de cosecha:
Médico solicitante:	Fecha de recolección:

TIPO DE COLECCIÓN			
Médula ósea	Aféresis	Otros	Criopreservación
( ) autólogo	( ) autólogo	( ) cordón	( ) sí
( ) alogénico	( ) alogénico	umbilical	( ) no

RESULTADOS BIOMETRÍA HEMÁTICA			
<i>Hemoglobina (mg/dL)</i>		<i>Hematocrito (%)</i>	
<i>Plaquetas cosecha (x 10<sup>11</sup>)</i>		<i>Plaquetas biometría (K/uL)</i>	
<i>Leucocitos (K/uL)</i>		<i>Neutrófilos (%)</i>	
<i>Linfocitos (%)</i>		<i>Monolitos (%)</i>	
<i>Eosinófilos (%)</i>		<i>Basófilos (%)</i>	

## 6. Hoja de control de calidad de CPH's

CONTROL DE CALIDAD DE CPH'S		
Descripción	Pre-criopreservación	Post-criopreservación
Volumen (mL)		
Leucocitos harvest	$\times 10^8$	$\times 10^8$
CMN-dosis	$\times 10^8$ /Kg	$\times 10^8$ /Kg
Células CD34 absoluto ( $\times 10^6$ CD34/uL)	$\times 10^6$ ul	$\times 10^6$ ul
Células CD34 harvest ( $\times 10^6$ CD34)	$\times 10^6$	$\times 10^6$
Células CD34 dosis ( $\times 10^6$ /Kg)	$\times 10^6$ /Kg	$\times 10^6$ /Kg
Células CD34 % vs CD45 (%)	%	%
Viabilidad (%)	%	%
Cultivo bacteriológico		
<b>Observaciones:</b>		

\_\_\_\_\_  
QFB Javier Bautista Juárez

\_\_\_\_\_  
Dr. Carlos Martínez Murillo

## Bibliografía

1. Acosta A: *Capacitación en servicio en el laboratorio de criopreservación*; Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salubridad y Asistencia: México, D.F. 1999.
2. Ademokun JA, Chapman C and Dunn J: *Umbilical cord blood collection and separation for haematopoietic progenitor cell banking*; Bone Marrow Transplantation 1997; 19: 1023-1028.
3. Alexander J, Indrikovs MD: *II Encuentro de inmunohematología y medicina transfusional*, The University of Texas Medical Branch at Galveston , Cancer Center, USA: 2000.
4. Álvarez E: *II Encuentro de inmunohematología y medicina transfusional*, The University of Texas Medical Branch at Galveston , Cancer Center, Monitores de programas de calidad; USA: 2000.
5. Ambríz, Martínez M, Bautista J: *Manual de procedimientos. Laboratorio de criopreservación*; Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS; México D.F.
6. Ash RC, Detrick DA, Zanjani ED: *Studies of human pluripotential hemopoietic stem cells (CFU-GEMM) in vitro*; Blood: 309-316; 1981.
7. Ayats R, Sardá P, Gilabert R, García J, Ramón I, Martínez E, Rutllan MLI: *Cultivos de CFU-GM en trasplante de médula ósea*; Libro de symposium, XXXI reunión de la AEHH, Córdoba, Ver: 253-268: 1989.
8. Barrett BB, Andersen JW, Anderson KC: *Strategies for the avoidance of bacterial contamination of blood components*; Transfusión (33):228-233; 1993.
9. Beatty PG, Arthur C, Hess E, Meyer DM and Slichter SJ: *Recruiting blood donors into a local bone marrow donor registry*; Transfusion (29): 778-782; 1989.
10. Bernstein Irwin D., MD; Andrews Robert G.,MD and Rowley Scott, MD: *Isolation of Human Hematopoietic Stem Cells*; Marrow and Stem Cell Processing for Transplantation: 209-220; 1995.

11. Berthier R, Kaufman A, Schweitzer A, Thevenon D and Hollard D: *Cryopreservation of human bone marrow cells by a modification of the two step cooling technique*; *Cryobiology* (20): 637; 1983.
12. Bigger is better: Maternal and neonatal predictors of hematopoietic potential of umbilical cord blood units; *Bone Marrow Transplantation* (27): 7-14, 2001.
13. Broxmeyer Hal E., PhD: *Human Umbilical Cord And Placental Blood Transplantation*; *Marrow and Stem Cell Processing for Transplantation*: 191-200; 1995.
14. Broxmeyer HE and Cooper S: *High efficiency recovery of immature haematopoietic progenitor cells with extensive proliferative capacity from human cord blood cryopreserved for 10 years*; *Clin Exp Immunol* (107) sup 1: 1-14; 1997.
15. Broxmeyer H.E., Douglas, G.W., Hango G., Cooper S., Bard J., English D., Arny M., Thomas L., Boyse E.A.: *Human Umbilical Cord Blood as a Potential Source of Transplantable Hematopoietic stem/progenitor cells*: *Proc Natl Acad Sci USA* (86), 3828-3832, 1989.
16. Broxmeyer H.E., Kurtzberg J., Gluckman E, Auerbach A.D., Douglas G., Cooper S., Falkenberg J.H.F., Bard J., Boyse E.A.: *Umbilical Cord Hematopoietic Stem repopulating cells in Human Clinical Transplantation*: *Blood Cells* (17), 313-329, 1991.
17. Carter Charles S., BS, Gress Ronald, MD and Klein Harvey G., MD: *Routine Methods for Preparing Hematopoietic Progenitor Cell Components*; *Marrow and Stem Cell Processing for Transplantation*: 51-68; 1995.
18. Collins NH, Gee AP and Henslee PJ: *T cell depletion of allogeneic bone marrow transplant by immunology and physical techniques*; *AABB*: 149-168; 1995.
19. Davis JM, Rowley SD: *Autologous bone marrow graft processing*; *Processing of bone marrow for transplantation*; *AABB*: 41-62; 1990.
20. Fisher Cynthia A, McGrath Marie B. and Cannon Marie E., MD: *Related and Autologous Cord Blood Banking*; *AABB Press Cellular Characteristics of Cord Blood Transplantation*; 199-216; 1998.

21. Elchalal U, Fasouliotis SJ, Shtockheim D et al: *Postpartum umbilical cord blood collection for transplantation: a comparison of three methods*; Am J Obstet Gynecol (182): 227-232; 2000.
22. Fliedner TM, Calvo W, Korbling M et al: *Collection, storage and transfusion of blood stem cell for the treatment of hemopoietic failure*; Blood Cells (5): 313-328; 1979.
23. Florensa BL, Almarcha PJ and Woessner S: *Manual de técnicas de cultivo in vitro*; II curso de técnicas de cultivo aplicadas a la hematología; 1990.
24. Fountain D, Ralston M and Higgins N: *Blood component. Liquid nitrogen freezers: a potencial source of microbial contamination of hematopoietic item cell components*; Transfusión (37): 585-591; 1997.
25. Fritsch G, Printz D and Stimpft M: *Transplatation. Quantification of CD34+ cells: comparison of methods*; Transfusión (37): 775-784; 1999.
26. Galmés A, Besalduch J, Bargay J and Matamoros N: *Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide at -80°C without rate-controlled freezing*; Transfusión (36): 794-797; 1996.
27. García J, Bornstein R, Lamana M y Maldonado J: *Obtención y manipulación de precursores hematopoyéticos*; Manual de técnicas, grupo de criobiología y biología del T.M.O., Asociación Española de Hematología y Hemoterapia, Sociedad Española de Transfusión Sanguínea; 1998.
28. Gardella S: *Obtención de células precursora hematopoyéticas, su reinfusión y patrón de recuperación de mielopoyesis*. Factores estimulantes del crecimiento de colonias: 7-13; 1990.
29. Gartner S, Kaplan S: *Long-term cultura of human bone marrow cells*; Proc Natl Acad Sci (77): 4756-4759; 1980.
30. Gerota J, Bonnack M, Bunthor H et al: *Concentration of bone marrow cells using the haemonetics system*; Criobiology: 19, 675; 1982:
31. Glassman AB and Umlas J: *Cryopreservation of tissue and solid organs for transplantation*; AABB; 1983.
32. Gluckman E.: *Autologous Stem Cell Transplantation*; Biological and Clinical Results in Malignancies, Advances in Blood Disorders: 425-430 (2); 1997.



33. Gorin NC: *Collection, manipulation and freezing of haematopoietic stem cells*; Clin Haematol (15) 19-48; 1986.
34. Haewon K MD: *Therapeutic pediatric apheresis*; Journal of Clinical Apheresis (15): 129-157; 2000.
35. Katayama Y, Yano T and Bessho A: *The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells*; Bone Marrow Transplantation (19): 283-287; 1997.
36. LIM Frans T.H., Winsen Lisa van, Willemze Roel, Kanhal Humphrey, and Falkenburg J.H. Frederik: *Influence of Delivery on Numbers of Leukocytes, Leukocytes Subpopulations, and Hematopoietic Progenitor Cells in Human Umbilical Cord Blood*; Blood Cells: 547-559 (20), 1994.
37. Linch DC, Knottl J, Petterson KG et al: *Bone marrow processing and cryopreservation*; J Clin Pathol (35): 186-190; 1982.
38. López M, Andreu G, Beaujean F et al: *Human bone marrow processing in view of further in vitro treatment and cryopreservation*; Blood Transf Immunohaematol (28): 411-425; 1985.
39. Lovelock JE, Bishop MWH: *Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide*; Nature (183): 1394; 1959.
40. McCullough Jeffrey, Clay Mary E., Fautsch Susan, Noreem Harriet, Segall Miriam, Perry Elizabeth, and Stroncek David: *Proposed Policies and Procedures for the Establishment of a Cord Blood Bank*; Blood Cells: 609-626 (20), 1994.
41. Manual técnico de la AABB: 394, 420, 450; 1993.
42. Manual técnico de la AABB (15): 300-320; 1997.
43. Manual técnico de la AABB (23): 481-503; 1997.
44. O'Murchadha ET, Horland A, Neiman RS and Valeri CR: *Morphology of cells grown in the CFU-GEMM tissue culture assay for mononuclear cells obtained from peripheral blood and bone marrow of normal volunteers*; Exp Hematol (16): 235-239; 1988.

45. Patrick J and Stiff MD: *Cryopreservation of haematopoietic stem cells: Marrow and stem cell processing for transplantation*; American Association of Blood banks; 1995.
46. Peterson Randolph K., MD, Clay Mary, MS, MT (ASCP) and McCullough Jeffrey, MD: *Unrelated Cord Blood Banking*; AABB Press Cellular Characteristics of Cord Blood Transplantation; 165-192; 1998.
47. Pons Enric Carreras, B.I.M. Salot, R.I.T. Montserrat, S.G. Jorge, U.I. Álvaro: *Manual de Transplante Hematopoyético*; 1-18; 1998.
48. Protocolos de transplantes; Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS; 2000.
49. Rood J.J. van: *Commentary: Cord Blood Banking for Bone Marrow Reconstitution: A Need for Standardization and International Cooperation*; Blood Cells (20): 627-629; 1994.
50. Rubinstein P, Rosenfiels RE, Adamson JW and Stevens CE: *Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution*; Blood (81): 1679-1690; 1993.
51. Schwella N Zimmermann R, Heuft HG et al: *Microbiology contamination of peripheral blood stem cell autografts*; Vox Sang (67): 32-56; 1994.
52. Solves P, Moraga R and Saucedo E: *Comparison between two strategies for umbilical cord blood collection*; Bone Marrow Transplantation (31): 269-273; 2003.
53. Sonnenberg FA, Eckman MH, and Pauker SG: *Bone marrow donor registries: the relation between registry size and probability of finding complete and partial matches*; Blood (74): 2569-2578; 1989.
54. Sousa T, De Sousa ME, Godinho MI and Mendes C: *Umbilical cord blood processing: volume reduction and recovery of CD34+ cells*; Bone Marrow Transplantation (19): 311-313; 1997.
55. Stiff Patrick J.: *Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells*; Bone Marrow Transplantation, 299-308; 1997.
56. Stiff Patrick J., MD: *Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells*; Marrow and Stem Cell Processing for Transplantation: 69-82; 1995.

57. Tepperman AD, Curtis JE and McCulloch EA: *Erythropoietic in cultures of human marrow*; Blood (44): 659-669; 1974.
58. Tennant Jr: *Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability*; Transplantation (2): 685-694; 1964.
59. Tugues D, Carretero F, Puntí C, Ramó I, Martínez E, Amill B and García J: *Determinación de la viabilidad celular mediante citometría de flujo (FC) en el tratamiento de la médula ósea (MO)*; Biol Clin Hematol (2): 121-128; 1989.
60. Valeri CR: *Blood banking and the use of frozen blood product*; CRC Press; 1976.
61. Valeri CR and Pivacek LE: *Effects of the temperature, the duration of frozen storage and freezing container on in vitro measurements in human peripheral blood mononuclear cells*; Transfusion (36): 303-308; 1996.
62. VII Congreso de la Asociación Española de Bancos de Sangre: *Ingeniería tisular, terapia celular*; El puerto de Santa María, 3-5 abril; 2002.
63. Van de Oucelan F; De Wite T, Geerdink P and Haaenen: *Enrichment and cryopreservation of bone marrow progenitor cells for autologous Reinfusión*; Cryobiology (19): 292-298; 1982.
64. Vázquez E: *Manual de criopreservación y cultivos celulares de trasplante de médula ósea*; 2002.
65. Vázquez E: *Hematología básica. Trasplante de médula ósea* (46); 2002.
66. Wagner John E: *Umbilical Cord Blood Transplantation; Overview of the Clinical Experience*; Blood Cells (20): 227-234, 1994.
67. Wagner John E., MD and Kurtzberg Joanne, MD: *Allogenic Umbilical Cord Blood Transplantation*; AABB Press Cellular Characteristics of Cord Blood Transplantation; 113-146; 1998.
68. Warkentin Phyllis J, MD: *Clinical Background for Marrow and Progenitor Cell Processing*; Marrow and Stem Cell Processing for Transplantation: 1-20; 1995.
69. Weiner RS, Tobias JS and Yankee RA: *Processing of human bone marrow for cryopreservation and reinfusion*; Biomedicine (24): 226; 1976.