

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

Tesis.

**Propuesta para implementación de una unidad de terapia celular
para criopreservación de células progenitoras hematopoyéticas
de sangre periférica para uso en trasplante**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Marcos Isaac Salcedo Gómez

MÉXICO, D. F.

AÑO 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

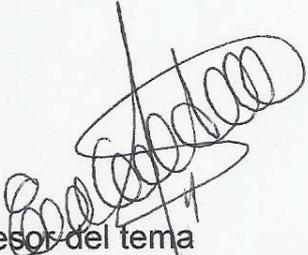
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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	Prof. Homero Hernández Montes
Vocal	Prof. Eva Delia Calderón Garcidueñas
Secretario	Prof. Perla Deyanira Maldonado Jiménez
1er. Suplente	Prof. Mendieta Rergis Araceli
2º. Suplente	Prof. Rodríguez Dorantes Mauricio

Sitio en donde se desarrolló el tema Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea



Asesor del tema
Eva Delia Calderón Garcidueñas



Sustentante
Marcos Isaac Salcedo Gómez

Dedicado a:

QFB María Teresa Herrera Barrera †

Dr. José Giral †

Prof. José Flores Flores †

Por enseñarme a ver más allá del conocimiento y no olvidar que en la vida siempre se es humano.

Agradecimientos

Señor

Te doy gracias por haberme conducido por buen camino hacia mi vocación, pues me has dado siempre la ayuda necesaria para que mi realización sea según el plan que tienes trazado para mi desde la Eternidad.

A la Nación Mexicana que sin conocerme en su totalidad me ha mantenido en un lugar privilegiado para mi formación, a través de la Universidad Nacional Autónoma de México, muestra de la fe que México tiene en sus jóvenes que se empeñan en devolver algo a la tierra que los vio nacer.

A mis Padres que sin descanso han trabajado para que ver cristalizados mis sueños, y que me han enseñado a luchar siempre por ellos, por permitirme gobernar mi vida de la mejor manera, al guiarme siempre por la senda segura bajo el auxilio de Dios.

Sandra gracias por mantenerte cerca aún en la distancia, por enseñarme algunas cosas y por todo tu apoyo.

Melisa por escucharme, y haber compartido bastante mas que escuelas comunes.

Tía Silvia y abuelita María. Por ser parte de la efectiva familia que siempre está apoyando y mostrando su cariño.

A Donaji por acompañarme en el último trecho de mi carrera y su apoyo incondicional, en este tiempo de prueba. Pero sobre todo por creer en mí, y entregarme su corazón y haber recibido el mío.

A mis amigos: compañeros de este andar que me han regalado su compañía y sus consejos durante mucho tiempo. En especial a Rubén Omar, Cecilia, Ariadna, Lupita, Laura B, Marisol, las Karinas, Omar Emanuel, Alma, Tía Helena, Raúl e Irasema, por estar ahí a mi lado cuando más los necesitaba para darme una palabra de aliento.

A todos mis profesores que ciclo a ciclo dejan parte de si en cada persona que con afán de superarse asisten a sus aulas para recibir algo más que conocimiento.

Al Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea que me abrió las puertas para realizar este trabajo en especial agradezco al Dr. Antonio Marín, a la MASS Eva Calderón, y al personal del Banco de Sangre de Cordón Umbilical, QFB. Miriam Millán, QFB, Javier Fernández, QBP. Angélica Gómez, Denhi Flores, por aceptarme y enseñarme tantas cosas.

A Mario Abad y Lourdes Aguirre por confiar en mi e iniciarme en el campo laboral, invirtiendo tiempo, dinero y esfuerzo.

Finalmente agradezco a mis pastores: Los Presbíteros Alberto Reynoso, Thomas Jordan, Charles, Joel y al Padre Roque que jornada a jornada me han enseñado mucho más que la fe. A los padres Antonio y José Ángel con los que he trabajado estrechamente por fortalecer el Reino de Dios entre los jóvenes.

INDICE

1	Generalidades.	9
1.1	Hematopoyésis.	10
1.1.2	Resumen esquemático de la hematopoyésis.	13
1.2	Célula madre.	14
1.2.1	Potencialidad celular.	14
1.2.2	Célula madre embrionaria.	16
1.2.3	Célula madre somática o adulta.	16
1.2.4	Plasticidad de las células madre adultas.	18
1.2.5	Células madre adultas presentes en la médula ósea.	19
1.2.5.1	Células progenitoras hematopoyéticas (CPH).	20
1.2.5.2	Población lateral.	21
1.2.5.3	Células mesenquimales (MSC).	22
1.2.5.4	Células progenitoras multipotenciales adultas.	23
1.2.6	Aplicación terapéutica.	24
1.3	Sangre periférica movilizada.	25
1.3.1	Células progenitoras hematopoyéticas en sangre periférica.	26
1.3.2	Dosis.	26
1.3.3	Ventajas y desventajas de esta fuente de CPH.	27
1.3.4	Aplicaciones clínicas.	28
1.4	Recolección de células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica.	29
1.4.1	Movilización.	29
1.4.2	Mecanismo de movilización e injerto.	31
1.4.3	Cinética de movilización. Pautas de administración de G-CSF.	33
1.4.4	Efectos sobre parámetros hematológicos.	34
1.4.5	Efectos sobre los parámetros bioquímicos.	34
1.4.6	Toxicidad del G-CSF a corto plazo.	35
1.4.7	Características clínicas del donante.	35
1.5	Técnicas de recolección. Aféresis.	36
1.5.1	Aspectos éticos.	38
1.5.2	Frecuencia.	39
1.5.3	Duración y volumen a procesar.	40
1.5.4	Acceso vascular.	40
1.5.5	Tipo de anticoagulante.	41
1.6	Criobiología.	41
1.6.1	Agentes crioprotectores.	43
1.6.1.1	Agentes crioprotectores intracelulares.	44
1.6.1.2	Agentes crioprotectores extracelulares.	45
1.6.2	Métodos de criopreservación.	45
1.7	Procesamiento de CPH.	46
2	Objetivos.	48
3	Justificación.	49
4	La unidad de terapia celular.	50
4.1	Infraestructura física en el CNTS.	50

4.2	Técnicas de reducción de volumen.	53
4.2.1	Procedimiento manual.	53
4.2.2	Procedimiento automatizado	54
4.2.2.1	Equipo automatizado SEPAX (Biosafe) y kit de separación.	54
4.2.2.2	Protocolo de reducción de volumen para SEPAX.	55
4.3	Criopreservación.	56
5	Impacto.	57
6	Conclusiones.	60
7	Abreviaturas.	61
8	Bibliografía.	62

1. GENERALIDADES

Las células madre actualmente gozan de un gran valor debido a su posible potencial para dotar de terapia a múltiples enfermedades devastadoras. Dichas células tienen la capacidad de autoperpetuarse, así como diferenciarse, según su capacidad, en diferentes células según el órgano en el cual se alojen y los estímulos provenientes del medio. Con lo que pueden restituir la función del órgano afectado.

Las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) de sangre periférica (SP) son una mejor opción ante los provenientes de médula ósea, ya que no es necesario llevar al donador a quirófano, lo cual lo hace más cómodo y menos riesgoso. Aunque queda la incertidumbre ética sobre el uso de factores estimulantes que favorecen la migración de las CPH de la médula a SP, ya que no existen estudios sobre la toxicidad crónica de los factores estimulantes de colonias de granulocitos y de granulocitos/monocitos. Sin embargo, a nivel mundial se realiza una gran cantidad de trasplantes de CPH provenientes de SP.

El objetivo de este trabajo forma parte de un plan estratégico para desarrollar una unidad de terapia celular en el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea. En primer lugar se implantará la unidad de procesamiento y criopreservación de CPH de SP y de médula ósea. Así mismo, se implantará la metodología para el procesamiento y criopreservación de SP

1.1 HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis es la formación o producción de la sangre, concretamente de las células sanguíneas.¹

La función normal de génesis de los elementos celulares sanguíneos se localiza en ciertos órganos que, en virtud de su función, toman el nombre de órganos hematopoyéticos. Estos órganos, que provienen de una diferenciación progresiva del mesénquima, son principalmente la médula ósea, el bazo y el tejido linfoide.

Si morfológicamente se puede decir que casi todos los elementos celulares de la sangre normal derivan de una célula única, funcionalmente hay que admitir una diferenciación clara, según tenga su asiento en los tejidos mielopoyéticos o linfopoyéticos.

Los glóbulos rojos se originan en el adulto, en condiciones normales, en la médula ósea. Hoy está bien demostrado que los glóbulos rojos del adulto provienen de células blancas, mononucleares, desprovistas de pigmento hemoglobínico, que tienen un aspecto linfoide y que, a su vez, han derivado del hemohistioblasto. Esta célula que Ferrata y Maximow llaman actualmente *hemocitoblasto*, que quiere decir célula generadora de elementos celulares sanguíneos, ha sido llamada también hematogonia (Sabrazés) o linfocito (Pappenheim). Esta célula puede dar origen no sólo a los glóbulos rojos sino también a los blancos o leucocitos. Cuando el hemocitoblasto va a dar origen a células de la serie hemoglobínica, experimenta modificaciones protoplasmáticas

y nucleares. El protoplasma se hace primero más basófilo y luego se va cargando progresivamente de hemoglobina. Para la formación del eritrocito, el hemocitoblasto pasa por las siguientes fases:

- Hemocitoblasto (hematogonia, linfocito, mieloblasto)
- Proeritroblasto (nucleolado)
- Eritroblasto basófilo (sin nucléolo)
- Eritroblasto policromatófilo
- Glóbulo rojo maduro

Los hemocitoblastos que van a dar origen a los granulocitos, sufren una pérdida progresiva de la basofilia y de los nucléolos, condensación de la cromatina, cambios de forma del núcleo y aparición de granulaciones específicas, neutrófilas, eosinófilas y basófilas, según el tipo de granulocito. El hemocitoblasto posee un núcleo leptocromático nucleolado y un citoplasma basófilo sin granulaciones.

El hemocitoblasto se transforma en mieloblasto; este elemento posee también caracteres de juventud, es nucleolado, leptocromático y su citoplasma es basófilo, pero ya presenta un elemento que nos indica su diferenciación granulocítica: posee granulaciones azurófilas, no específicas. El mieloblasto da origen al promielocito que aun posee nucleolo, pero su citoplasma presenta, además de las granulaciones azurófilas, granulaciones específicas neutrófilas o eosinófilas; el mielocito es el elemento que deriva del promielocito, presentando

caracteres de célula casi madura: núcleo sin nucléolos y con cromatina densificada; el citoplasma presenta un solo tipo de granulaciones: las específicas definitivas, que se distinguen en neutrófilas, eosinófilas y basófilas. Los metamielocitos se producen por simple maduración del núcleo que se incurva sobre sí mismo adoptando la forma en herradura. Una etapa más y se hace polimorfo, habiendo llegado en esta forma a constituir el granulocito completamente maduro.

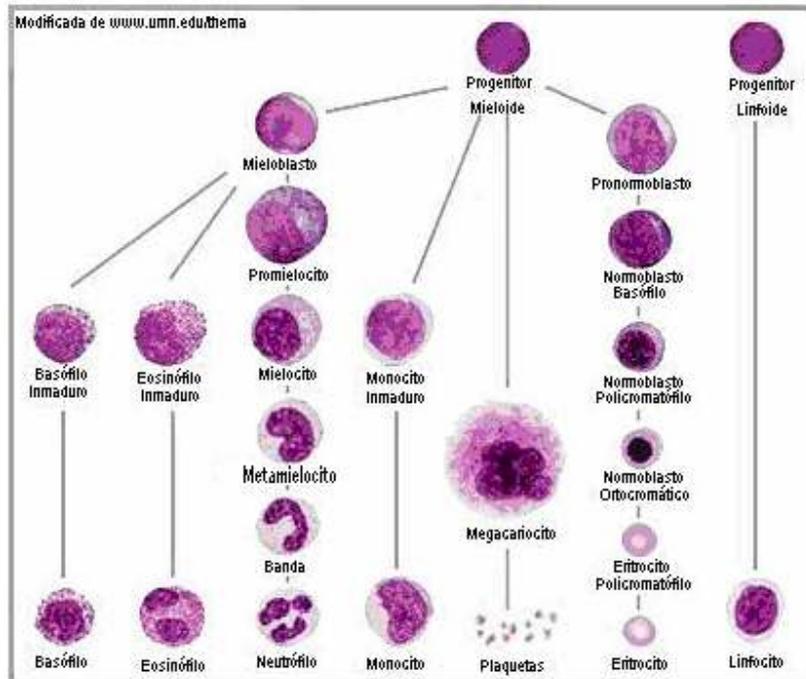
Del hemocitoblasto de la médula ósea también derivan grandes elementos celulares: los megacarioblastos, que pasando sucesivamente en su maduración por las fases de megacariocito linfoide y luego granuloso, dan origen finalmente a las plaquetas.

La génesis de los linfocitos, viene de los hemocitoblastos linfoides de los folículos linfoides. El hemocitoblasto linfoide es un elemento bastante diferenciado, puesto que está incapacitado para generar elementos mieloides.

El hemocitoblasto linfoide da origen al linfoblasto, éste al prolinfocito, del que nace finalmente el linfocito circulante.

Los monocitos derivan, en parte, directamente de los elementos mesenquimatosos indiferenciados fijos (hemohistioblastos), sin pasar por la fase del hemocitoblasto. El hemohistioblasto da origen directamente al monoblasto y éste al monocito. Otra parte de los monocitos deriva de los hemocitoblastos mieloides (de la médula ósea) o linfoides.²

1.1.2 RESUMEN ESQUEMÁTICO DE LA HEMATOPOYÉSIS



1.2 CÉLULA MADRE

La célula madre se define como aquella que puede dividirse simultáneamente para mantener, por un lado, su auto-renovación, con producción de células madre semejantes a ella, y por otro lado, generar células hijas que se diferencian en diversos tipos de células especializadas, no solo morfológicamente sino funcionalmente.³⁻⁶

De acuerdo con su estado evolutivo, las células madre se clasifican en embrionarias y somáticas o adultas.⁷

1.2.1 POTENCIALIDAD CELULAR

La potencialidad representa la capacidad y la posibilidad de diferenciación de las células, y se manifiesta en el ámbito natural conforme el orden jerárquico de su desarrollo.

De acuerdo a su potencial de diferenciación, las células madres se han clasificado en:⁶

- Totipotentes. Son aquellas que en condiciones apropiadas son capaces de formar un individuo completo.^{6,7}

- Pluripotentes. Pueden diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las 3 capas embrionarias. Aunque estas células por sí solas no pueden producir un individuo.^{3,6}
- Multipotentes. Pueden diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria, lo que las capacitaría para la formación de tipos celulares diferentes, pero no de todos.

En los últimos años, se ha hecho evidente que la potencialidad de algunos tipos de células madre adultas, es mayor que la que habitualmente se les confería. Pues se evidenció que podían diferenciarse en tejidos derivados de cualquiera de las capas embrionarias, señalándose como el caso más típico el de las células madre hematopoyéticas.⁶ Para esto, se ha planteado que cuando su entorno natural es sustituido por otro, cambian su programa de diferenciación de acuerdo con las nuevas señales de diferenciación que reciben, por lo que se les ha asignado capacidad pluripotencial, y en este sentido, se asemejarían a las células madre embrionarias.^{3,6}

Las células unipotentes son las que solo se pueden diferenciar en un tipo celular, y que han sido clasificadas en algunos trabajos como células en tránsito, células progenitoras comprometidas⁷ o células precursoras.³

Las células diferenciales, que son las que han alcanzado su plena maduración y una actividad funcional específica.⁶

1.2.2 CÉLULA MADRE EMBRIONARIA

Son células indiferenciadas y pluripotenciales que tienen capacidad ilimitada de proliferación y son capaces de diferenciarse. Se derivan a partir de células de blastocistos^{6,7} y morulas.⁸ Son capaces de auto perpetuarse indiferenciadas *in vitro* de forma ilimitada y presentan potencial para diferenciarse en cualquier tipo celular de las 3 capas germinales embrionarias.

Las células madre germinales se han aislado a partir de células germinales primordiales embrionarias y fetales, y tal como ocurre con las células madre embrionarias, estas poseen una gran capacidad proliferativa que se hace evidente cuando se cultivan. Se ha señalado que en estas condiciones las células madre germinales se mantienen viables durante 70 a 80 pases, además revisar tienen la ventaja que no forman teratomas cuando se inyectan en ratones, por lo que pudieran representar una fuente segura de material trasplantable.^{3,6}

1.2.3 CÉLULA MADRE SOMÁTICA O ADULTA

Se define como una célula especializada en la organización de un tejido específico en un organismo ya formado, restringida en su capacidad de diferenciación y capaz únicamente de generar células del tejido que presenta, a las que debe recambiar de forma natural.⁴⁻⁶

Sin embargo, en los últimos años varios estudios sugieren que la potencialidad de algunos tipos de células madre adultas es mayor a lo esperado,

ya que han mostrado en determinadas condiciones capacidad para diferenciarse en células de diferentes linajes.³⁻⁷ Por ejemplo: las CPH que pueden diferenciarse a células musculares o neuronales.

La mayor parte de los criterios que cumplen las células madre embrionarias, los satisfacen también la célula madre hematopoyética, pues: 1) puede tener divisiones auto-renovadoras, 2) puede dar lugar a todas las células sanguíneas, 3) puede reconstruir la médula ósea cuando se trasplanta en receptores irradiados letalmente o aplasiados mediante quimioterapia, y 4) se ha observado su implantación en tejidos sanos.³⁻⁷

Diversa información ha señalado la existencia de células madre adultas en varios sitios del organismo que incluyen: la médula ósea, la SP, la sangre del cordón umbilical, el cerebro, la médula espinal, la grasa, la pulpa dentaria, los vasos sanguíneos, el músculo esquelético, la piel, el tejido conjuntivo, la córnea, la retina, el hígado, los conductos pancreáticos, el folículo piloso, el tejido gastrointestinal y el pulmón.^{6,7}

1.2.4 PLASTICIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE ADULTAS

La plasticidad es la capacidad que adquieren las células bajo determinadas condiciones micro-ambientales, de diferenciarse en células de tejidos distintos a aquel con el que la célula madre se encuentra aparentemente comprometida.^{4,6,7} Así, se ha señalado una plasticidad potencial para diferentes células madre adultas, entre las que destacan las hematopoyéticas (figura 1) y las neuronales.⁷

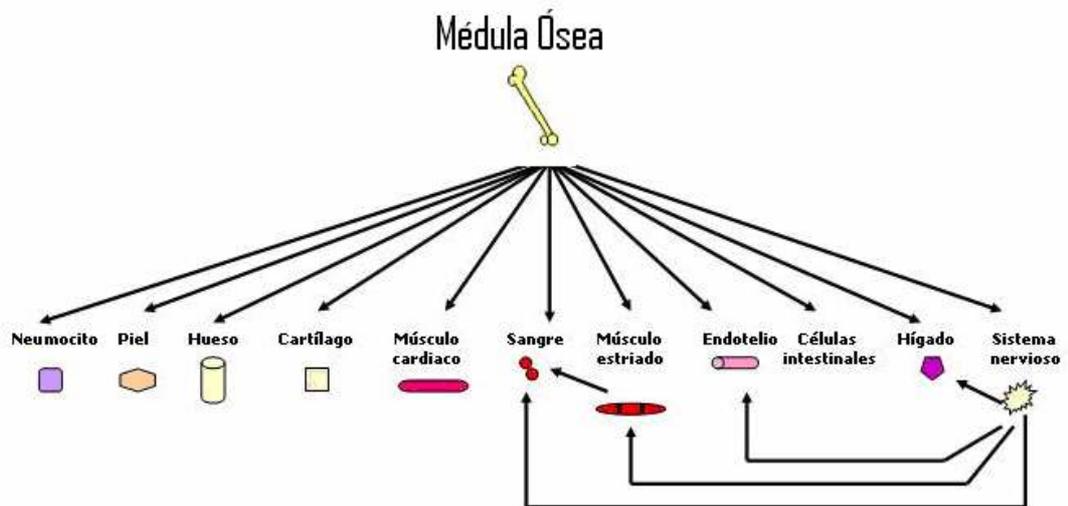


Figura 1 Plasticidad de las CPH.⁷

Los mecanismos planteados para explicar la plasticidad son los siguientes:

1. Heterogeneidad de las células madre presentes en una población celular.
2. Fusión de las células madre trasplantadas con las células específicas residentes en un órgano.
3. Consumación de un proceso de desdiferenciación y rediferenciación celular.
4. Persistencia de células madre adultas con capacidad multi o pluripotencial.⁷

1.2.5 CÉLULAS MADRE ADULTAS PRESENTES EN LA MÉDULA ÓSEA

Durante varios años se consideró a la célula madre hematopoyética como la única, en la médula ósea, con capacidad generativa y se pensaba que solo era multipotencial. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que la composición de la médula ósea es más compleja (figura 2), pues en ella se han identificado un grupo heterogéneo de células madre adultas, entre las que se encuentran los tipos siguientes:

- Hematopoyéticas
- Mesenquimales (estromales).

- Población lateral.
- Células progenitoras adultas multipotentes (MAPC)⁶

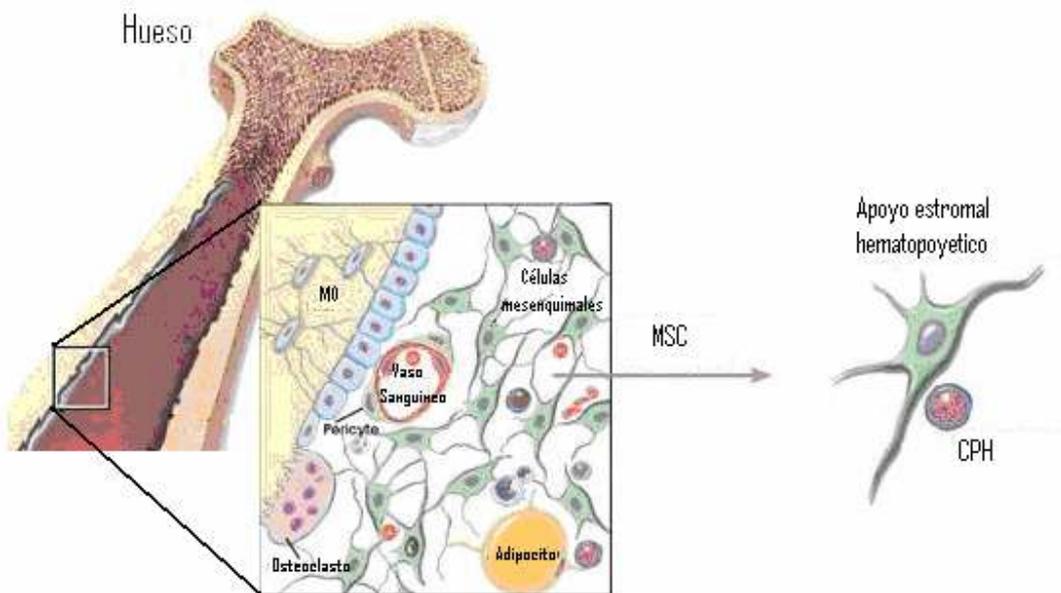


Figura 2 Células madre de interés clínico actual. Modificado de una imagen de Terese Winslow y Lydia Kibiuk 2001

1.2.5.1 CÉLULAS PROGENITORAS HEMATPOYÉTICAS (CPH)

Estas células se han utilizado desde hace más de 50 años en el trasplante de médula ósea y han mostrado su efectividad en el tratamiento de diversas enfermedades. Inicialmente su fuente casi exclusiva era la médula ósea; posteriormente se extrajeron de la SP, tras su movilización de la médula ósea mediante factores de crecimiento y también de la sangre del cordón umbilical.

Habitualmente se ha empleado el marcador de superficie CD34⁺ para la identificación de estas células; sin embargo, estudios más amplios han mostrado que su inmunofenotipo es más complejo, ya que pueden expresar un espectro de marcadores de acuerdo con su estado de diferenciación.

Se ha incorporado el marcador de superficie CD133 que indica un estado más inmaduro de estas células.⁶

Las CPH son capaces de reconstruir de manera integra la hematopoyesis, se caracterizan por: 1) su capacidad de autoduplicarse, 2) la expresión de los antígenos CD34, CD45RaO y tHY-1, 3) la tinción con rodamine 123 es débilmente positiva, y 4) no hay expresión de antígenos mieloides y linfoides T y B ni de antígenos HLA-DR. Representan aproximadamente el 1 al 2% del total de las células de la médula ósea y en condiciones normales la décima parte de este total circula en la SP.⁹

1.2.5.2 POBLACIÓN LATERAL

Estudios recientes apoyan la existencia de células madre hematopoyéticas CD34⁻, lo que va en contra del criterio establecido de que siempre expresan CD34⁺. Se ha señalado que en el ratón las células CD34⁻ representan una subpoblación en estado quiescente, que después de ser son activadas, mediante la adicción de citocinas, se diferencian en células CD34⁺. Esto concuerda con las opiniones de que las células CD34⁻ podrían representar un estado más primitivo que el de las CD34⁺. Es posible que algunas de las células CD34⁻ correspondan

a la sub-población medular recientemente identificada como “población lateral” (del inglés *side population*), que contiene una alta proporción de células CD34⁻.

Se ha señalado que esta población celular tiene una frecuencia media de 0.02% en la SP movilizada y extraída por aféresis, y es menor en la médula ósea y en la sangre de cordón umbilical. Formando parte de esta población, se han detectado sub-poblaciones CD34⁺ y CD34⁻. Se plantea que en los humanos gran parte de las células de la población lateral son CD34⁻. Por otro lado, se ha señalado que la expresión del transportador ABCG2 constituye una indicación de una célula madre muy primitiva. Se ha indicado que las células de la población lateral pueden dar lugar a diferentes tipos de células especializadas e integrarse en distintos tejidos *in vivo* que incluyen tejidos no hematopoyéticos.⁶

1.2.5.3 CÉLULAS MESENQUIMALES (MSC)

Estas fueron las primeras células madre no hematopoyéticas que se aislaron de la médula ósea. Entre sus características destacan su adherencia al plástico, el aspecto de fibroblastos fusiformes en cultivos no estimulados, expresión de marcadores específicos como SH2, SH3 y SH4 con ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34, CD11 y CD14. Recientemente se han añadido otros antígenos de superficie útiles para la identificación de las MSC, como son CD29, CD44, CD71, CD90 y CD106.

Se ha demostrado que las células estromales son necesarias para el mantenimiento y expansión de células madre hematopoyéticas derivadas de la

médula ósea de adultos y de la sangre del cordón umbilical. Estas células, además de dar apoyo a la hematopoyésis pueden diferenciarse en osteoblastos, condroblastos, adipoblastos y mioblastos⁶

1.2.5.4 CÉLULAS PROGENITORAS MULTIPOTENCIALES ADULTAS

A partir de cultivos de médula ósea de ratas, ratones y humanos se han aislado células progenitoras multipotenciales adultas con una versatilidad inusual, se ha planteado la posibilidad de que algunas células madre adultas tengan la capacidad de diferenciarse del mismo modo que lo hacen las células madre embrionarias, pues mostraban capacidad de diferenciarse rápidamente en múltiples tipos celulares según las condiciones de cultivo. Estas células se denominan con las siglas MAPC derivadas de su nombre en inglés multipotent adult progenitor cells. Después que éstas células se introducen en blastocitos murinos, pueden generar la mayoría de los tipos celulares derivados de cualquiera de las 3 capas embrionarias.^{6,7}

Se ha señalado que las MAPC son capaces de proliferar invitro con más de 120 divisiones celulares sin un aparente envejecimiento y también que no expresan CD34, CD44, CD45, c-kit, ni antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y clase II. La expresión de Fik-1, Sca-1 y Thy-1 es muy baja, pero la de CD13, SSEA-1 (en rata/ratón) y SSEA-4 (en humano) es alta.^{4,6}

La mayor limitante que se plantea para el empleo de las MAPC son las condiciones tan especializadas que al parecer son necesarias para su cultivo. Por otra parte, las condiciones que se requieren para que se diferencien en tipos celulares específicos no están totalmente esclarecidas, por lo que esto es un tema de gran interés y objeto en la actualidad de diversas investigaciones.^{5,6}

1.2.6 APLICACIÓN TERAPÉUTICA

- Administración de células madres adultas o progenitoras directamente al paciente, ya sea local o sistemáticamente de forma que colonicen el sitio correcto del cuerpo y se diferencien a los tipos celulares deseados.
- Transplante de progenitores celulares diferenciados *in vitro* y selección previa al transplante en el órgano diana.
- Aplicación de la ingeniería tisular mediante la organización de células madre en estructuras tridimensionales que pueden ser utilizadas para reparar tejidos dañados.
- Estimulación de las células madre endógenas mediante la inducción, (de la formación de las células madre del paciente) en presencia de factores de crecimiento específicos.⁸

1.3 SANGRE PERIFÉRICA MOVILIZADA

En el año 2000 se realizaron cerca de 30 000 trasplantes en el mundo, de ellos el 70% fueron autólogos y el 30% alogénicos. La SP fue la fuente de progenitores hematopoyéticos en el 90% de los trasplantes autólogos y el 30% en los alogénicos.^{10,11}

Recientemente, el uso de SP como fuente de CPH, ha aumentado. En el año 2000 más del 95% de los adultos y el 80% de los niños y adolescentes utilizaron la SP como fuente de CPH. Por otro lado, en los trasplantes alogénicos realizados, en más del 50% de los trasplantes HLA idénticos, en la mayoría de los haploidénticos y en los singénicos, así como en un tercio de los no relacionados, se utilizó esta fuente.^{10,11}

Los inicios del trasplante de SP fueron en 1962, cuando Goodman y Hodgson demostraron la existencia de CPH en la sangre de los ratones, las cuales podían recolectarse de forma exitosa, cuando comenzó a desarrollarse la tecnología de la citocentrifugación.¹⁰

Experimentos en perros sanos que fueron irradiados letalmente, se encontraron células progenitoras viables (probablemente pluripotenciales) en circulación, que podían promover la recuperación hematopoyética.¹²

Esta fuente de CPH se comenzó a utilizar en pacientes en los que no se podían obtener células progenitoras medulares, debido a su enfermedad de base o a irradiación previa, y su uso se amplió después de descubrir que los

factores de crecimiento hematopoyéticos causaban una liberación transitoria de CPH en la SP. De esta forma, en 1981 se introdujo la SP como fuente de CPH.¹⁰

Se comprobó que un número suficiente podía ser recolectado por leucoféresis y se lograba un implante rápido y mantenido después de la infusión.¹⁰

1.3.1 CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS EN SANGRE PERIFÉRICA

Los progenitores hematopoyéticos presentes en la SP son tan buenos como los de la médula ósea (MO), pues comparten muchas características similares como su tamaño, densidad y marcadores antigénicos. Además estos progenitores pueden ser usados para la recuperación de pacientes con médula depletada. Éste tratamiento ha sido ampliamente aceptado por los médicos.¹²

1.3.2 DOSIS

A pesar de que no existe un criterio uniforme en cuanto al número de CPH a recolectar, se considera necesario un mínimo de células CD34+ mayor a $2 \times 10^6/\text{kg}$, dosis que es consistente con los miembros del Comité Británico para la Estandarización en Hematología.^{9, 10} Drager y colaboradores como plantean cifras mínimas de $0.2 \times 10^6/\text{Kg}$, cuando la conservación es de 4 a 8°C por un tiempo no mayor de 72.⁹

El número óptimo de células madre para apoyar la recuperación rápida de la médula ósea y la producción de células sanguíneas después de un tratamiento con dosis altas de quimioterapias, es de 5×10^6 de células CD34⁺/kg, aproximadamente. La infusión de más de 5×10^6 de células /kg, tiene como resultado en la mayoría de los pacientes, una recuperación en la producción de células sanguíneas en la médula ósea en solo 9 a 10 días.¹³

1.3.3 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE ESTA FUENTE DE CPH

o VENTAJAS

- No hay necesidad de emplear la sala de operaciones y se evitan todos los riesgos que esto conlleva.
- Obtención de un mayor número de células hematopoyéticas con respecto a la recolección de médula ósea.^{10,14}
- Rápida recuperación hematológica después del implante.^{10,14}
- Menor posibilidad de obtener células malignas.¹⁴
- Disminución del riesgo de infección del material recolectado.
- Se puede obtener células hematopoyéticas en situaciones en las que se dificulta su extracción de la médula ósea (mielofibrosis, irradiación pélvica, etc.).¹⁰
- Disminuye el empleo de componentes de la sangre.
- Acorta la estancia hospitalaria lo cual disminuye costos.⁹

- **DESVENTAJAS**

- Mayor posibilidad de desarrollar enfermedad injerto contra huésped (EICH) dado el mayor contenido de células T.
- Necesidad del uso de factores estimuladores hematopoyéticos en personas sanas.¹⁰
- Exposición a anticoagulante durante el proceso de recolección que puede provocar hipocalcemia.¹⁵

1.3.4 APLICACIONES CLÍNICAS

El uso más reportado para CPH de SP es en la leucemia no linfocitaria aguda (ANLL).¹²

El linfoma de Hodgkin y no Hondgkin^{9,10} es la siguiente aplicación.

La leucemia mielocítica aguda es otra de las primeras aplicaciones reportadas para los CPH de SP.

Pocos reportes han aparecido sobre el uso de CPH de SP contra leucemia linfoblástica aguda.¹²

En el campo de la oncohematología para el tratamiento de hipernefomas, inmunodeficiencias congénitas, mieloma múltiple, leucemia mieloide crónica, y artritis reumatoidea.⁹

Síndromes mieloproliferativos, leucemia linfática crónica y otras enfermedades linfoproliferativas, talasemia, drepanocitosis, síndrome de

Wiskott-Aldrich y anemia de Fanconi, enfermedad de Gaucher, osteopetrosis, mucopolisacaridosis y diversos trastornos lisosómicos; aplasia medular, y trastornos metabólicos hereditarios.¹⁰

Enfermedades que requieren un tratamiento antineoplásico intensivo. Se incluyen la mayoría de los tumores sólidos, para cuyo tratamiento deban emplearse dosis de quimioterapia mortales por su efecto mielosupresor.¹⁰

1.4 RECOLECCIÓN DE CPH DE SANGRE PERIFÉRICA

La recolección de células madre de SP, desde la década pasada se está realizando de forma segura. Las CPH normalmente circulan en la sangre en cantidades muy pequeñas.

El proceso de recolección se inicia cuando hay suficientes CPH circulantes en la sangre para recolectar. Las células madre son recolectadas, mediante una máquina para aféresis.

1.4.1 MOVILIZACIÓN

Hay varias formas de incrementar el número de CPH en circulación. Una es la variación diurna que tiene un pico en la tarde con un incremento del 50 al 100% con respecto a la mañana. Esta variación se puede revertir con el uso oral de prednisona.

El ejercicio incrementa el número de CPH en circulación si se realiza antes de la aféresis. Otros compuestos pueden aumentar a CPH en circulación como endotoxinas, ácido fólico, corticotropina y dextrán, entre otros.

El método más efectivo para promover la circulación de CPH y el más usado clínicamente es la quimioterapia y los factores estimulantes hematopoyéticos, y si éstos se combinan con factor estimulante de colonias de granulocito/macrófago el efecto es sinérgico.¹²

El número de CPH circulantes en la sangre se incrementa en los pacientes cuya médula ósea se recupera de una quimioterapia. Las citocinas (factores de crecimiento de la células sanguíneas) administradas a los pacientes después de la quimioterapia mielosupresiva, también pueden incrementar hasta de 100 veces el número de células madre circulantes en la sangre.

Las citocinas también se pueden administrar sin quimioterapia y producen un incremento sustancial en el número de CPH circulantes. Las citocinas Neupogen (filgrastim) y lenogastim, ambas moléculas recombinantes del G-CSF¹⁴ y Leukine (molécula recombinante de GM-CSF), estimulan la producción de células madre en la médula ósea y están aprobadas por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA).¹³

El uso de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), es útil en la movilización en donadores sanos por su eficacia y tolerancia clínica.¹⁴

Se ha empleado el CSF gránulo-monocítico (GM-CSF) de igual forma, aunque se ha descrito una menor actividad de linfocitos T cooperadores, lo que

tendría un impacto en la recuperación inmunológica después del trasplante, aunque no ha sido probado en ensayos clínicos.^{10,16}

Las células pueden ser recolectadas después del uso de varios métodos como quimioterapia, factor estimulante de colonias (CSF) o ambos, o bien el uso de estos factores de forma secuencial. En el trasplante alogénico de SP, exclusivamente se emplean los CSF para la movilización de las células del donante.^{10,17}

1.4.2 MECANISMO DE MOVILIZACIÓN E INJERTO

Las CPH muestran un rango amplio de moléculas de adhesión, que incluye miembros de la familia de integrinas, selectinas y la súper familia de las inmunoglobulinas, entre otras.

Entre estas moléculas de adhesión están, VLA-4, VLA-5, LAF-1 y la L-selectina cuyo ligandos, VCAM-1, I-CAM y el receptor de selectina en las células endoteliales respectivamente, son expresados en el estroma de la médula ósea.^{10,18,19}

Las moléculas VLA-4, VLA-5 y L-selectina sobre las células CD34⁺ movilizadas, muestran una expresión más baja que en médula ósea, dado el

efecto producido por la administración de factores estimuladores de colonias. El uso de CSF permite una migración de las células hematopoyéticas hacia la periferia, ya que es capaz de escindir las moléculas de adhesión pues libera proteasas como la elastasa, proteinasa 3 y de la catepsina G, que degradan a VLA-4, VCAM y a CXCR4 permitiendo la salida de las células de su nicho (figura 3).^{10,19,20}

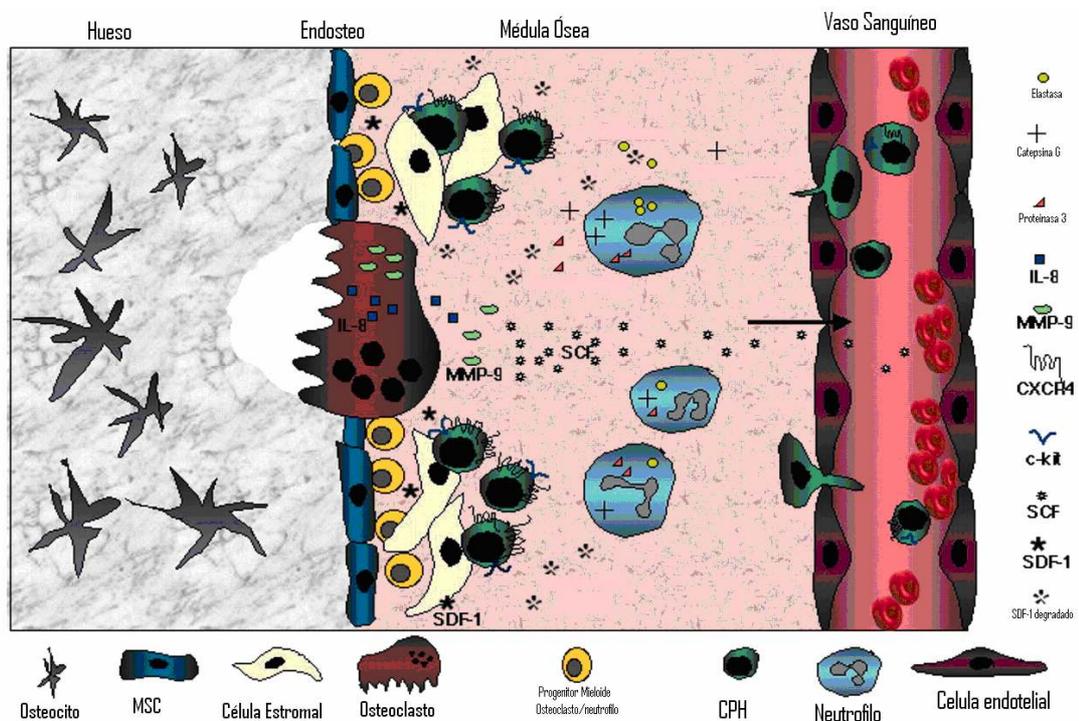


Figura 3 La actividad masiva inflamatoria de enzimas proteolíticas lleva a la degradación del anclaje de las CPH en la médula.²⁰

En el proceso del injerto las células madre son reconocidas fácilmente por el estroma medular, proceso en el que está involucrado el factor 1 derivado de células estromales (SDF-1), producido en la MO, que se une al receptor CXCR4

y activa varias moléculas de adhesión como VLA-4, LAF-I y VCAM-1, a través de varias señales intracelulares (figura 4).^{10,18,19,21}

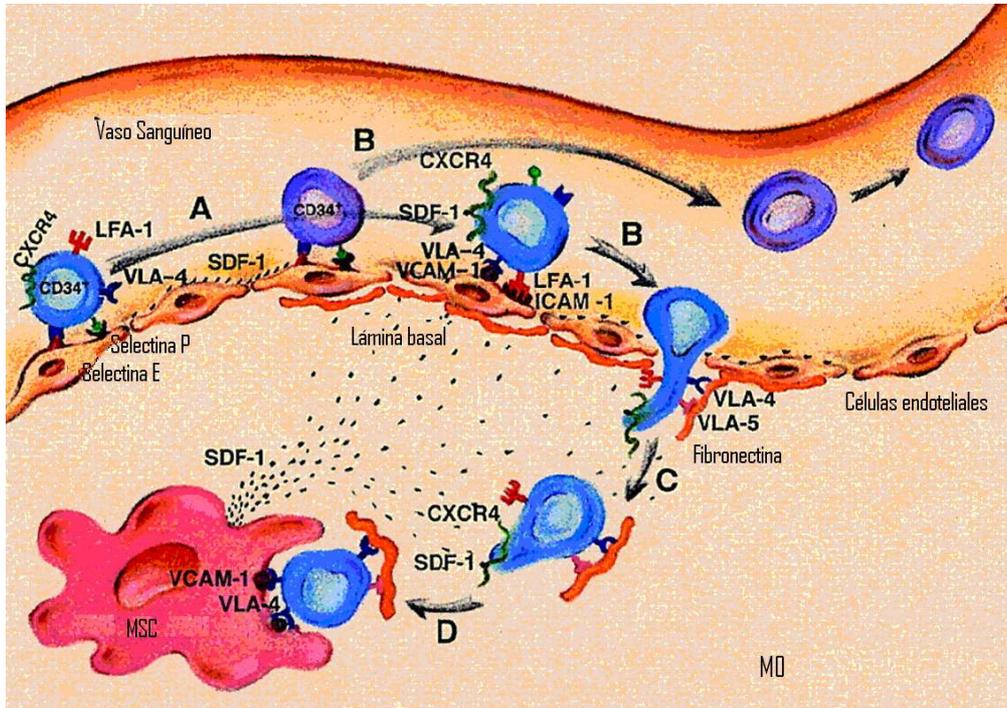


Figura 4 El papel del SDF-1 junto con su receptor CXCR4 extravasa CPH a través a la lamina basal usando VLA-4 y VLA-5.²¹

1.4.3 CINÉTICA DE MOVILIZACIÓN. Pautas de administración de G-CSF.

La experiencia acumulada hasta el momento muestra que con una dosis de 2 a 6 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ durante 4-6 días consecutivos, se puede obtener una cantidad suficiente de CPH para trasplante con efectos secundarios aceptables. Aunque dosis superiores ($\approx 10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$) se usan habitualmente para la recolección de

progenitores hematopoyéticos de SP. Si bien la pauta óptima de movilización no está establecida, los datos disponibles permiten considerar una dosis de alrededor de 10 µg/kg/día durante 4-6 días y el inicio de las aféresis de 4^o o 5^o día tras la primer dosis de G-CSF.

Para pacientes sanos se usa la administración de 10 µg/kg/día por vía subcutánea durante 4-5 días hasta que finalicen los procedimientos de aféresis.¹⁴

1.4.4 EFECTO SOBRE PARÁMETROS HEMATOLOGÍCOS

El G-CSF apenas modifica los parámetros hematológicos periféricos con excepción de la cifra de leucocitos. Algunos autores refieren que la administración por más de 7 días parece inducir trombocitopenia.

La administración de G-CSF origina una leucocitosis con neutrofilia que depende de la dosis del fármaco y de la duración del tratamiento. Se recomienda la interrupción del tratamiento si la cifra de leucocitos es $\geq 70 \times 10^9/L$. En cualquier caso, la granulocitosis o la trombocitopenia asociada, revierte en 48 tras cesar la administración.¹⁴

1.4.5 EFECTO SOBRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

El G-CSF induce un aumento importante y transitorio de las enzimas lactatodeshidrogenasa (LDH) y fosfatasa alcalina (FA), debido a una expansión de la masa mieloide.

También se ha referido una ligera disminución del potasio, magnesio y colesterol debido al aumento de neutrófilos.¹⁴

1.4.6 TOXICIDAD DEL G-CSF A CORTO PLAZO

En general, la tolerancia clínica al G-CSF es buena. Las principales molestias referidas por los donantes son dolor osteomuscular, cefalea y astenia.

Analgésicos como el paracetamol, asociados o no a codeína, son suficientes para controlar de la cefalea, la hipotensión, el malestar general, la somnolencia, la pérdida de apetito, la erupción, las náuseas, la fiebre, la retención de líquido y/o los dolores osteomusculares. Es rara la necesidad de hospitalización.^{10,16,14}

1.4.7 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DEL DONANTE

Los donantes sanos de CPH de SP deben cumplir los siguientes requisitos:

- Hemoglobina ≥ 11 g/dL.
- Recuento plaquetario $\geq 150 \times 10^9$ /L antes de comenzar el tratamiento de movilización.
- Resultados negativos de estudios virológicos (citomegalovirus, hepatitis B, C y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)).^{10,16,22}

Si no se consigue la celularidad necesaria con un solo proceso de aféresis, los requisitos para las donaciones subsiguientes deben ser: hemoglobina $\geq 10\text{g/dL}$ y recuento plaquetario $\geq 70 \times 10^9/\text{L}$. La edad no constituye una limitante.

En caso de existir más de un donante, el mejor será aquel que tenga un mayor volumen corporal.

1.5 TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN. Aféresis

Aféresis, es un término derivado del griego que significa separar. En la aféresis la sangre se remueve de un donador o paciente, se separa en sus componentes, de los cuales de manera selectiva uno o más son retenidos y el resto de los elementos se retornan al donador o paciente.

La transfusión actual procura administrar a cada paciente solo los componentes sanguíneos que le hacen falta, lo que disminuye los riesgos innecesarios de la transfusión y debe asegurar conseguir el máximo beneficio en cada transfusión sanguínea.

Existen varios tipos de separadores celulares con características diferentes para colectar plasma, plaquetas, leucocitos, células progenitoras hematopoyéticas, células dendríticas, entre otras. Todos estos métodos usan como base la centrifugación. Algunas máquinas obtienen los productos mediante una doble punción, con flujo continuo de la sangre a través del separador de células sanguíneas y otros separadores obtienen los productos mediante una sola punción con flujo intermitente.²³

Esencialmente todos los separadores de células sanguíneas que se usan en la clínica para recolectar plaquetas y granulocitos, se han usado para recolectar CPH: como el CS3000 de Baxter, Haemonetics y el COBE Spectra. Todos han demostrado ser efectivos en la recolección de CPH (Figura 5).

Es recomendable que el centro extractor tenga amplia experiencia y personal entrenado en la realización de procedimientos de aféresis.¹²



Figura 5 Recolección de CPH por un procedimiento de aféresis

El número de aféresis dependerá de la cantidad de células CD34⁺ que se considere óptima para el trasplante, por ello, la medición diaria de las células madre CD34⁺ contenidas en la SP, es útil para determinar el número de días a realizar la aféresis.¹³

La elección del separador celular depende de la experiencia de cada centro.

El hematocrito de la fracción mononuclear deberá ser menor a 1%.

Durante la aféresis es recomendable controlar el hemograma y el ionograma.¹⁴

1.5.1 ASPECTOS ÉTICOS

El empleo de esta fuente celular tiene problemas éticos derivados del uso de CSF en donantes sanos para la movilización celular, ya que persiste la duda de si se puede o no una lograr permanente reproducción de las células hematopoyéticas. El otro problema ético está relacionado con la posibilidad de alto riesgo de EICH, causado por el mayor contenido de células T.

Para la donación es necesario manejar los siguientes conceptos

- Consentimiento informado. Es la autorización escrita tras un consentimiento informado del donante, dicha información debe ser: descripción del sistema de recolección y sus complicaciones, confidencialidad de los datos, necesidad de realizar determinaciones serológicas que descarten enfermedades infecciosas. Dicho consentimiento deberá ir firmado por el donante y por el médico informante.
- Privacidad y confidencialidad. Asegurar al máximo la privacidad y confidencialidad de toda la información de los donantes.

- Actuación justa: La asignación de donantes de CPH se realizará únicamente sobre la base de criterios clínicos e inmunológicos entre donante y receptor.
- Seguimiento del donante: Dado que aún existe duda acerca de posibles efectos secundarios del G-CSF, es imprescindible realizar un seguimiento prolongado del donante. Dicho seguimiento consistirá en una exploración física, así como un perfil analítico básico (hemograma y bioquímica). Se realizará un primer control a las 2 semanas de finalizar las recolecciones y posteriormente uno al año durante un mínimo de 5 años

1.5.2 FRECUENCIA

La frecuencia está regida más por la relación tiempo movilización que por cualquier otra consideración. Si la recolección se realiza para coincidir con la concentración más alta de CPH, siguiendo la misma forma de movilización el mejor método es probablemente hacer la recolección diaria. Con excepción de un paciente pequeño, pues hay que tener en cuenta los conteos de plaquetas y mononucleares.¹²

1.5.3 DURACIÓN Y VOLUMEN A PROCESAR

La duración del procedimiento es arbitraria. En general cuanto más dure el procedimiento, más CPH se recolectan.¹² Sin embargo, no se recomienda una duración mayor a las 4 o 5.¹⁵

El volumen a procesar en cada aféresis será de 2-3 volemias, pudiéndose llegar hasta 5-6 en técnicas de grandes volúmenes, esto dependerá del tipo de procesador y la experiencia del centro.¹⁵

En muchos pacientes o donantes preparados para movilizar células hematopoyéticas; generalmente la extracción de un solo día no es suficiente para lograr el injerto (2×10^6 células CD34⁺/kg), ya que el número de células es pequeño, por lo que se requiere repetir el proceso durante varios días. Es necesario obtener un gran volumen de leucoféresis, que representa aproximadamente 20 L en un adulto o de 2 a 4 volúmenes sanguíneos en un niño.^{10,17}

1.5.4 ACCESO VASCULAR

El acceso vascular para la recolección de CPH es igual al de cualquier procedimiento de aféresis.¹² Habitualmente se realiza la punción en la flexura antecubital o braquial con aguja de calibre 14-16, siendo ésta preferible porque

ocasiona menos problemas. Se debe evitar colocar catéteres centrales,¹⁵ su uso solo se recomienda en casos excepcionales.¹⁴

1.5.5 TIPO DE ANTICOAGULANTE

Citrato de sodio es el anticoagulante de preferencia. La coagulación plasmática no se altera durante todo el proceso de aféresis.

La heparina de sodio también se puede emplear en combinación de citrato. Se emplea en adultos de bajo peso o en procesos de gran volumen para evitar intoxicaciones por citrato (hipocalcemia). La coagulación plasmática permanece alterada hasta 4-6 después de acabar el proceso de aféresis.¹⁵

1.6 CRIOBIOLOGÍA

La criobiología es la ciencia que trata el comportamiento de los seres vivos, o de sus constituyentes a muy bajas temperaturas.

El objetivo esencial de la criopreservación es mantener la viabilidad y funcionalidad celular para que pueda utilizarse en un trasplante.²⁴

La mayoría de los trasplantes hechos en E.U.A. se hacen con CPH críopreservada y almacenadas a -80°C en congeladores mecánicos o a temperaturas de nitrógeno líquido (-196°C a nivel del mar). Poco ha cambiado la criopreservación desde las décadas de 1950 y 1960.

La criopreservación nació en 1949 con el descubrimiento de Polge y colaboradores, donde con glicerol criopreservaron espermatozoides de aves de corral.²⁵

Cuando una suspensión celular se enfriada y alcanza temperaturas entre -5 y -10°C se forman núcleos de hielo distribuidos aleatoriamente en el medio extracelular que darán lugar a regiones en fase cristalina. El hielo en el espacio extracelular coexiste con el agua líquida intracelular gracias a la membrana plasmática que constituye la barrera que detiene el crecimiento cristalino dentro de la célula.

Cuando en el medio extracelular ocurre la cristalización, se forma hielo puro dejando solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida, a medida que el cambio de fase progresa, de manera que las células en suspensión deben deshidratarse para mantener el equilibrio osmótico con un medio extracelular cada vez más hipertónico.

En un proceso programado de enfriamiento, a medida que el sistema de refrigeración extrae el calor, la temperatura baja hasta alcanzar el punto eutéctico, la fase líquida remanente y los solutos solidifican juntos.²⁶

Si la velocidad con que desciende la temperatura es muy rápida, la célula puede no ser capaz de deshidratarse suficientemente rápido y al llegar a la temperatura de nucleación, el agua remanente se congela formando hielo intracelular. Si por el contrario la velocidad de enfriamiento es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiendo llegar al colapso celular.^{24,26}

Con una velocidad de enfriamiento adecuada, la célula se deshidratará y concentrará intracelularmente antes de alcanzar la temperatura de nucleación de forma que la posibilidad de congelación intracelular y consecuentemente de daño celular se minimizará.^{26,27}

Por lo tanto, la supervivencia celular será máxima a una velocidad de enfriamiento óptima, que es específica para cada tipo celular dependiendo del tamaño celular y de la permeabilidad de su membrana.^{26,26}

Las CPH se deben congelar a una velocidad constante de 1°C/minuto para mantenerlas viables.²⁵

Los periodos críticos para la supervivencia celular durante la criopreservación son la fase inicial de enfriamiento y el periodo de retorno a condiciones fisiológicas.^{26,27}

Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de congelación en general, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lípidicos. La transición de lípidos fluidos a sólidos se presenta a temperaturas entre 10 y 16°C alterando todas las funciones de la membrana y confiriéndole un alto grado de fragilidad.²⁶

1.6.1 AGENTES CRÍOPROTECTORES

Los agentes crioprotectores son sustancias muy hidrosolubles y de baja toxicidad que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada.²⁶

Hay dos clases de agentes crioprotectores los intracelulares o penetrantes y los extracelulares o no penetrantes.^{25,26}

El modo de acción de los crioprotectores es muy complejo; su efecto protector proviene de: 1) su capacidad para vincularse con el agua, lo que evita la formación de cristales de hielo que pueden dañar los organelos

intracitoplasmáticos y 2) de su capacidad para reducir los efectos tóxicos de las altas concentraciones de solutos.²⁶

Los agentes intracelulares usados en la clínica son glicerol y dimetil sulfóxido (DMSO) y el extracelular de uso clínico es el hidroxietilalmidón (HES).²⁵

1.6.1.1 AGENTES CRIOPROTECTORES INTRACELULARES

Los crioprotectores intracelulares difunden rápidamente a través de la membrana celular, por eso incrementa la osmolaridad durante el proceso de congelamiento, minimizando el daño causado por una velocidad de congelación lenta.^{25,26}

El glicerol se uso inicialmente en estudios con CPH. Sin embargo, el DMSO lo sustituyó rápidamente, por que difunde más rápido dentro de las células, pero a diferencia del primero este necesita manipulación extra post-descongelación.

El DMSO se usa ampliamente a una concentración de 10% basado en estudios iniciales con eritrocitos criopreservados. Es efectivo en criopreservación de CPH usadas para la reconstrucción hematopoyética y es relativamente tóxico cuando se infunde en el paciente (no más de 1ml/kg de peso).²⁶

Otros crioprotectores de este grupo son: el 1,2- propanodiol y el etilenglicol.²⁶

1.6.1.2 AGENTES CRIOPROTECTORES EXTRACELULARES

Son sustancias de alto peso molecular que forman una barrera ajustada alrededor de la célula disminuyendo el grado de deshidratación vista en el congelamiento lento,²⁵ suelen usarse asociados a criopreservantes intracelulares.²⁶

El HES, como ya se mencionó es el único usado en la clínica dentro de este grupo de crioprotectores, no se ha usado solo para criopreservación de CPH, pero aumenta sus capacidades con el DMSO.²⁵

Otros crioprotectores extracelulares son la sacarosa, glucosa, dextrosa, polivinil-pirrolidona, el dextrano y el polietilenglicol.

Dependiendo de la permeabilidad del crioprotector utilizado y de su toxicidad, la adición se realiza a 4°C, 37°C o a temperatura ambiente.

Pueden añadirse o extraerse en pasos, aumentando o disminuyendo gradualmente la concentración del crioprotector en el medio, lo que reduce el estrés osmótico sobre la célula a congelar; o bien añadirse o extraerse en un solo paso, lo que reduce el tiempo de exposición celular al crioprotector.²⁶

1.6.2 MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN

De acuerdo a la velocidad de enfriamiento y descongelación los métodos de congelación pueden clasificarse como: 1) congelación lenta-descongelación

rápida, 2) congelación lenta-descongelación lenta, 3) congelación ultrarápida y vitrificación.

En los dos primeros la adición del crioprotector suele hacerse por pasos y el descenso de la temperatura se realiza lentamente en un congelador programable. La descongelación lenta también se lleva a cabo mediante el uso de congelador programable, mientras que la descongelación rápida se hace a temperatura ambiente o en baño de agua a 30 o 37°C, para evitar la recristalización.

La congelación ultra-rápida implica una deshidratación celular rápida, utilizando altas concentraciones de crioprotector, usualmente DMSO y sacarosa, seguida de inmersión en nitrógeno líquido.²⁶

La vitrificación consiste en utilizar una solución altamente viscosa que al ser enfriada, aumenta su viscosidad hasta alcanzar la consistencia de un vidrio; posee la ventaja de que no produce daños celulares causados por la formación de hielo extracelular.^{24,26}

1.7 PROCESAMIENTO DE CPH

Las dos razones principales para el procesamiento son: el gran volumen líquido y el contenido de eritrocitos.

Grandes volúmenes significan más DMSO y mayor volumen de infusión al paciente.

Una simple centrifugación antes de congelar, permite remover el exceso de volumen. El volumen retirado es determinado por la concentración final de célula deseada, esta es usualmente de 100×10^6 de células nucleadas mL.

Algunos separadores celulares recolectan un alto número de eritrocitos con CPH. Los eritrocitos son hemolizados durante el congelamiento y descongelamiento por métodos diseñados para preservar CPH, los restos de eritrocitos pueden causar coagulación intravascular diseminada o daño renal; para disminuir esto, se puede simplemente centrifugar para producir buffy coat. El proceso de congelamiento–descongelamiento tampoco preserva los granulocitos. Los restos de estas células quizá sean los posibles responsables de algunas reacciones observadas en pacientes durante la infusión de CPH.

Otra posibilidad es con gradiente de densidad y centrifugación. La densidad del medio de soporte, que puede ser con Ficoll-diatrizoato o Percall, es aproximadamente 1.077. La centrifugación puede realizarse en una centrífuga refrigerada, en un procesador de células sanguíneas o en un separador de células.¹²

2 OBJETIVOS

- Proponer el diseño de una unidad de terapia celular para el procesamiento y criopreservación de células progenitoras hematopoyéticas provenientes de SP movilizada, dentro de las instalaciones del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea (CNTS).
- Proponer la metodología a seguir para el procesamiento y criopreservación de células progenitoras hematopoyéticas, en dicha unidad.

3 JUSTIFICACIÓN

No existe ninguna institución del Sector Salud, hospitales privados o públicos con infraestructura específica para una unidad de terapia celular, que incluya el procesamiento y criopreservación de progenitores hematopoyéticos de SP o de médula ósea, si bien dentro de sus bancos de sangre cuentan con servicio de procesamiento y criopreservación de progenitores hematopoyéticos, sus instalaciones no cubren la totalidad de los estándares de seguridad y calidad de éstas áreas.

El Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea (CNTS) como centro de referencia y gracias al empuje que ha demostrado al establecer el banco de sangre de cordón umbilical, CordMx, bajo altos estándares de calidad y seguridad tanto transfusional como de trabajo, marca la tendencia en cuanto a terapia celular se refiere, por ello sería idóneo que este centro cuente con una unidad de terapia celular formalmente constituida que responda a las demandas de la población mexicana.

4. LA UNIDAD DE TERAPIA CELULAR

La unidad de terapia celular debe contar con 4 áreas básicas: unidad de recolección, unidad de procesamiento, unidad de criopreservación y banco paralelo. Solo la unidad de recolección no estará físicamente dentro de las instalaciones del CNTS, ésta se encontrará en los hospitales que cuenten con la experiencia necesaria para llevar a cabo la recolección de CPH por aféresis.

Unidad de Recolección. En esta se llevarán a cabo, las pláticas informativas a los donantes, así como la firma de los documentos de consentimiento informado, de responsabilidad médica y la recolección de las CPH por aféresis según la experiencia de cada centro extractor.

4.1 INFRAESTRUCTURA FÍSICA EN EL CNTS

Todas las áreas de la unidad de terapia celular dentro del CNTS deberán contar con el siguiente diseño:

- El piso debe nivelarse y cimentarse según la carga a soportar debida a los equipos (tanques de nitrógeno líquido), esta información es suministrada por el fabricante y requerida por la NOM-059-SSA1-1993 Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.²⁸

- Acabados interiores: el acabado del piso y los muros debe ser de material impermeable y monolítico (de una sola pieza) y sus esquinas deben ser redondeadas (acabado sanitario) de acuerdo con la NOM-059-SSA1-1993.
- La altura de las paredes estará en relación con el tamaño de los equipos que estén en cada área, permitiendo su manejo y/o movilidad libremente.
- Necesidades eléctricas: se contará con tomacorrientes separados de los equipos y del voltaje necesario para cada equipo según la información referida por el fabricante, es deseable contar con conexiones al sistema de emergencia, además de equipos reguladores de voltaje y de respaldo (*no break*).
- Recambio de Aire: el área debe estar ventilada constantemente con un mínimo de 20 recambios por hora a través de filtros HEPA 99.99% de eficiencia, para separar partículas de hasta 0.22 μm ; además, se debe contar con una temperatura de 18 a 23°C y una humedad relativa del 50-70% con base a lo establecido en el punto 8.4.1 de la NOM-059-SSA1-1993.
- Espacio entre equipos: el espacio entre equipos debe ser mínimo de 1 m según el punto 8.2 de la NOM-059-SSA1-1993.

Unidad de Procesamiento. Es donde se llevará a cabo el proceso de reducción de volumen, así como el acondicionamiento de la unidad para su criopreservación. Para ello deberá contar con el siguiente equipo: campana de

bioseguridad clase II, desplasmadores, separadores celulares automáticos y un sistema de computo para la gestión de resultados de manera electrónica, lo que garantizará la rastreabilidad y el aseguramiento de la identidad de cada unidad.

Unidad de Criopreservación: Esta área además de contar con el diseño descrito anteriormente deberá contar con:

- Abastecimiento de nitrógeno líquido: es necesario tanques de baja presión de 20 a 30 psig (137-207 kpa); la capacidad de estos tanques es de 520L, siendo necesario contar con un sistema de carga y descarga dentro del área de criopreservación. El tanque de alta presión contiene alrededor de 1420L de capacidad y puede operar a presiones de hasta 170 Lb/pulg² (1164 Kpa), pero requiere de una instalación especial a base de tubería recubierta de aislante para el suministro de nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C.
- Accesorios para el área: Deben incluirse lectores de temperatura y humedad, sensor del nivel de oxígeno, entrada de aire frío y/o caliente con regulador de temperatura (15 a 30°C), dos llaves de salida de nitrógeno líquido para soportar una presión de 20 a 30 psig, un manómetro de carátula y una crioválvula con terminal de ½ pulg.
- De ser posible ventana abatible de emergencia en caso de contingencia por descendimiento del nivel de oxígeno dentro del área.

En esta área se localizarán los tanques de nitrógeno líquido para almacenamiento de las unidades, así como el congelador biológico programable.

Banco Paralelo: en ésta área se realizará la detección de las poblaciones CD 34⁺, ensayos de viabilidad por citometría de flujo, biometría hemática con contador celular automático, grupo sanguíneo por inmunoaglutinación, pruebas de histocompatibilidad con primers específicos para secuencias de nucleótidos (SSP), cultivos clonogénicos (técnica de Stem Cell Technology), pruebas serológicas (VIH, HBV, HCV por ELISA automatizado con quimioluminiscencia, sífilis y brucella por aglutinación en placa, toxoplasma y citomegalovirus; por detección de anticuerpos IgG e IgM por inmunofluorescencia, IFA y chagas por ELISA en placa de micropocillos).

4.2 TÉCNICAS DE REDUCCIÓN DE VOLUMEN

Se proponen dos metodologías de reducción de volumen: una manual y otra automatizada, con la finalidad de procesar las unidades bajo cualquier circunstancia.

4.2.1 PROCEDIMIENTO MANUAL

La reducción de volumen por medio manual dependerá de cuando los dispositivos automatizados tengan alguna falla técnica.

La técnica se basa en la centrifugación a 1600 rpm por 15 min. a 4°C para posteriormente extraer el plasma ajustando el volumen final a 100mL.²⁹ Dicho concentrado de células blancas se trasvasará a una bolsa de criopreservación para la adición del criopreservante.

4.2.2 PROCEDIMIENTO AUTOMATIZADO

Un procedimiento automatizado permite la uniformidad entre unidades pues el proceso será homogéneo en parámetros críticos como tiempo y velocidad constante de centrifugación, por ello se propone el uso del SEPAX y el kit CS490.

4.2.2.1 EQUIPO AUTOMATIZADO SEPAX (BIOSAFE) Y KIT DE SEPARACIÓN

El equipo SEPAX de Biosafe (figura 6), es un equipo automatizado para la separación de células sanguíneas nucleadas totales, dicha separación se lleva a cabo por centrifugación de acuerdo a la densidad y tamaño de las partículas sanguíneas.³⁰



Figura 6 Equipo SEPAX de Biosafe

El Kit de separación usado para el procedimiento con SP, es el kit CS 490 (figura 7); el cual, es un kit estéril de uso único compuesto por una cámara de separación, un juego de tres llaves de paso, 2 bolsas de 500mL, una para plasma y la otra para eritrocitos, un punto libre para conectar diferentes tipos de bolsas de criopreservación, filtro y bayoneta para conectar la bolsa de recolección.

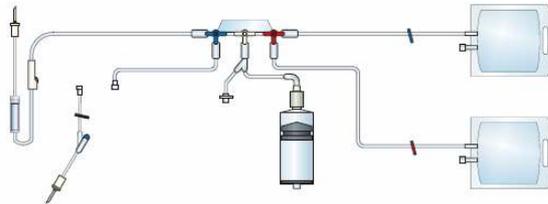


Figura. 7 Kit CS 490 para la separación a partir de SP.³¹

4.2.2.2 PROTOCOLO DE REDUCCIÓN DE VOLUMEN PARA SEPAX

El protocolo de reducción establecido para el equipo SEPAX de Biosafe, permite procesar muestras con volúmenes de entre 80-600 mL usando ciclos múltiples (Figura 8) para lograr la reducción máxima del volumen en orden de 70-80% con pérdida mínima de células. El volumen final esta en función de la concentración celular y del volumen inicial recolectado y puede establecerse entre 20-150 mL. Una vez terminado el protocolo, la cámara se lava con plasma para la recuperación máxima de células.

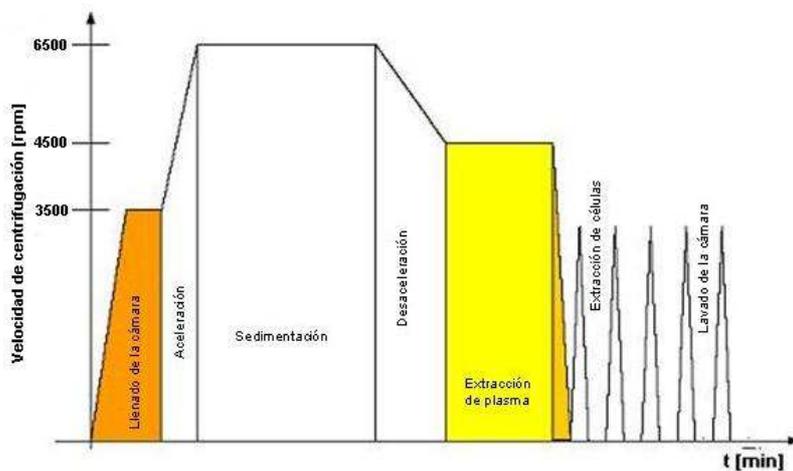


Figura 8 Gráfica que representa un ciclo dentro del protocolo de reducción de volumen.

Volumen final del producto	Ajustable de 20 a 150 mL		
Presición	+/- 2 mL		
Duración del proceso	Volumen hasta 220 mL	1 ciclo	≈ 15 min.
	Volumen entre 220 y 440 mL	2 ciclos	≈ 20 min.
	Volumen entre 440 y 660 mL	3 ciclos ²⁸	≈ 25 min.

4.3 CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación inicia con la adición de una mezcla de DMSO, disolución múltiple de electrolitos, albúmina y citrato, en un tiempo de 7 min. sobre acumuladores de frío. Para dividir posteriormente el volumen final en dos bolsas de criopreservación, las cuales serán introducidas en cánisters metálicos para su conservación a temperaturas criogénicas.

Se toman muestras para cultivos microbiológicos aerobios y anaerobios, cultivos clonogénicos y otra alícuota para realizar estudios adicionales si son requeridos.³²

Estas muestras se congelarán en las mismas condiciones que las unidades contenidas en los cánisters metálicos con el congelador biológico programable. Una vez que las unidades se han congelado a -120°C , se retiran del congelador biológico para colocarlas dentro del tanque de nitrógeno líquido, en la posición indicada en el mapa del tanque.

Volumen final del producto	100 mL por bolsa (se congelan dos bolsas por unidad).
Viabilidad	$84\pm 11\%$

5 IMPACTO

Para las instituciones de salud en México como ya se mencionó, las leucemias son un problema grave pues se ubican dentro de los primeros lugares de muerte en edad preescolar y escolar. También se sabe que el 40% de los pacientes con dicha afección llega a ser candidato a trasplante, pues no responden a la quimioterapia.

Poner al alcance de todos los centros de trasplante el servicio de criopreservación, fortalece el programa de trasplante en México, pues muchos pacientes aún se siguen tratando con trasplantes de CPH obtenidos de MO y SP como se observa en la figura 9.

Estas muestras se congelarán en las mismas condiciones que las unidades contenidas en los cánisters metálicos con el congelador biológico programable. Una vez que las unidades se han congelado a -120°C , se retiran del congelador biológico para colocarlas dentro del tanque de nitrógeno líquido, en la posición indicada en el mapa del tanque.

Volumen final del producto	100 mL por bolsa (se congelan dos bolsas por unidad).
Viabilidad	$84\pm 11\%$

5 IMPACTO

Para las instituciones de salud en México como ya se mencionó, las leucemias son un problema grave pues se ubican dentro de los primeros lugares de muerte en edad preescolar y escolar. También se sabe que el 40% de los pacientes con dicha afección llega a ser candidato a trasplante, pues no responden a la quimioterapia.

Poner al alcance de todos los centros de trasplante el servicio de criopreservación, fortalece el programa de trasplante en México, pues muchos pacientes aún se siguen tratando con trasplantes de CPH obtenidos de MO y SP como se observa en la figura 9.

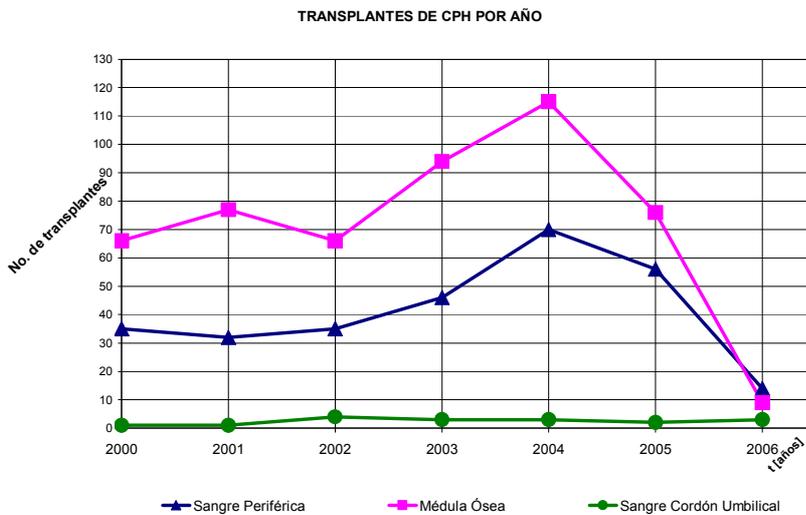


Figura 9 La gráfica ilustra la evolución de los trasplantes de CPH en México en los últimos 6 años, hasta mayo 2006.³³ Fuente CENATRA www.cenatra.gob.mx/cnt/Grafica_tot.php.

El CNTS tiene la capacidad de ofrecer metodologías automatizadas para la reducción de volumen de unidades de SP y MO, lo cual es fundamental pues al reducir el volumen también se eliminan sustancias no deseadas y se reduce el uso de otros compuestos como el DMSO que es tóxico según el volumen presente en la unidad. Además, este tipo de procedimiento aumenta la capacidad hematopoyética y favorece el injerto. Bajo este tenor, el CNTS ha desarrollado técnicas para evaluar la calidad de la unidad garantizando su injerto, a través de estudios como: cultivos microbiológicos, citometría de flujo y cultivos clonogénicos, con lo que se reforzará el programa de trasplante evitando dar unidades con baja calidad hematopoyética y evitando el no injerto.

La posibilidad de contar con estos procedimientos favorecerá a toda la población que así lo requiera, reforzando la línea gubernamental de que la salud debe ser un derecho de todos los mexicanos, ya que contar con una unidad de

terapia celular de estas características en México abatirá los costos, con lo que se reforzaran los alcances de las instituciones de salud en materia de trasplantes.

Esto último se ha demostrado con la existencia de CordMx, el banco de sangre de cordón umbilical del CNTS, que desde su inicio logró reducir de costo de los trasplantes en un 70%, ya que se evitó la importación de CPH de sangre de cordón umbilical.

6 CONCLUSIONES

El establecer una unidad de terapia celular en el CNTS fortalecerá el programa de trasplante en México, de diferentes maneras:

- ✓ Abriendo un nuevo marco de posibilidades en cuanto al trasplante de MO y SP mediante el procesamiento y la criopreservación.
- ✓ Implementando técnicas automatizadas dentro de la unidad de terapia celular, que garantizan la rastreabilidad de las unidades a lo largo de todo el proceso.
- ✓ Reduce costos, favoreciendo a la población, en especial a los sectores marginados.
- ✓ Ofrecen unidades con un buen pronóstico de injerto, gracias a los ensayos de cultivos clonogénicos y a la citometría de flujo.
- ✓ Montando las técnicas manual y automatizada, lo que permitirá su funcionamiento aún por fallas técnicas propias del equipo, con lo que no se detendrá el funcionamiento de la unidad de terapia celular.

7 ABREVIATURAS USADAS

ANLL	Leucemia No Linfocitaria Aguda
CPH	Células progenitoras hematopoyéticas
CSF	Factor Estimulante de Colonias
DMSO	Dimetil Sulfoxido
EICH	Enfermedad Injerto Contra Huésped
G-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocito
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias de granulo-monocito
HES	Hidroxietilalmidón
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
MAPC	Células progenitoras multipotenciales adultas
MO	Médula Ósea
MSC	Células mesenquimales o estromales
SP	Sangre Periférica

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Catalana de transplante. "Transplante de células progenitoras de la hematopoyesis" en donación y transplante. 2003
http://www10.gencat.net/catsalut/ocatt/es/don_tra_tei_pro.htm
2. PIAGGIO, Paseyro. "Las hemopatías".
2ª ed. Editorial Científica del Sindicato Médico del Uruguay, Uruguay 1944, 17-19
<http://publicaciones.smu.org.uy/publicaciones//libros/historicos/lh/>
3. Rosenthal. "Prometheus's vulture and ítem-cell promise."
N Engl J Med. 2003 Jul 17; 349(3):267-74.
4. Korbling M, Estrov Z. "Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept?" N Engl J Med. 2003 Aug 7; 349(6): 570-82
5. Daley, Goodell, Snyder. "Realistic prospects for stem cell therapeutics."
Hematology (Am Soc Hematol Educ Program). 2003; 398-418
6. Hernández, Dorticós. "Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas". Revista Cubana Hepatología 2004; 20(3)
http://bvs.sld.cu/revistas/hih/vol20_3_04/hih01304.htm
7. Verfaillie, Pera, Lansdorp. "Stem cells: hype and reality."
Hematology (Am Soc Hematol Educ Program). 2002:369-91
8. Galván, Valbuena, Escobedo, Simón. "Células troncales embrionarias verdades e incertidumbres." En Libro de Comunicaciones del XVI Congreso nacional de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea, San Sebastián 2005. pág. 191-194
9. Diego de la Campa et al. "Obtención y procesamiento de células progenitoras hematopoyéticas periféricas" Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 2003; 19(2-3)
bvs.sld.cu/revistas/hih/vol19_2_03/hih11203.htm
10. Fagundo, Dorticós, Pavón, Rosales. "Transplante de células progenitoras hematopoyéticas: tipos, fuentes e indicaciones". Revista Cubana de hematología 2004; 20(2)
bvs.sld.cu/revistas/hih/vol20_20_04/hih02204.htm
11. IBMTR/ABMTR Newsletter. February 2002, volumen 9, issue 1.
12. Lasky. Cap. 10 "Peripheral Blood Stem Cells". En Lasky, Warkentin. "Marrow and Stem Cell Processing for Transplantation". American Association of Blood Banks, Maryland, 1995. págs 169-181
13. CancerConsultans.com "Recolección de células madre".
Actualizado oct. de 2002, copyright 1998.
<http://cancer.nccs.drtango.com/411es.asp?article=allo-recoleccion&type=default.css&style=default.css&navtype=1&lid=2&otherParams>

14. Grupo de trabajo sobre Trasplante de células hematopoyéticas de SP a partir de donantes no emparentados, Organización Nacional de Trasplantes “Informe sobre trasplantes de progenitores hematopoyéticos de SP a partir de donantes no emparentados” marzo 1998.
<http://www.ont.msc.es/donacion/consenso/pdf/consenso17.pdf>
15. Naya, de Tomás, Castillo, Pérez. “Actividades ONT-progenitores hematopoyéticos. Recomendaciones para la extracción y transporte de progenitores hematopoyéticos obtenidos de medula ósea/SP de donantes no emparentados.
<http://ww1.msc.es/ONT/esp/actividades/ph/transph.pdf>
16. Bensinger, et al. “Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in patients with advanced hematologic malignancies: A retrospective comparison with marrow transplantation.” *Blood* 1996; 88:2794
17. Cutler, Antin. “Peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation: A Review.” *Stem cells* 2001 Mar;19(2):108-17
18. Levesque, Nilson. “Mobilisation of hematopoietic progenitors cells into peripheral blood is associated with VCAM-1 proteolytic cleavage in the bone marrow.” *Blood* 2000; 96 –(suppl 1):221a.
19. Gazitt. Homing and mobilization of hematopoietic stem cells and hematopoietic cancer cells are mirror image processes, utilizing similar signaling pathways and occurring concurrently: circulating cancer cells constitute an ideal target for concurrent treatment with chemotherapy and antineoplastic-specific antibodies.
Leukemia. 2004; 18(1):1-10.
20. Cottler-Fox, et al. Stem cell mobilization.
Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2003:419-37
21. Peled et al The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*. 2000 Jun 1; 95(11):3289-96.
22. Carreras. “Estado Actual del trasplante no emparentado.”
XLVI Reunión Nacional de la AEHH y XX Congreso Nacional de la SETH. Simposios. Hematológica (ed. esp.) vol. 89 extraordin 1, oct. 2004
23. Quintana-González. “Recolección de Multicomponentes por Aféresis”.
Gac Méd Méx 2003Vol 139, supl 3,s151-s154
24. Torradadella. “Criopreservación Celular”
Gac. Méd. Méx. 2002 Vol. 138 supl 1; s128-129
25. Stiff. Cap. 5 “Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells” En Lasky, Warkentin. “Marrow and Stem Cell Processing for Transplantation”. American Association of Blood Banks, Maryland, 1995. págs 69-73
26. Boiso. “Principios Básicos de Criobiología”
Revista Iberoamericana de Fertilidad 2001 vol. 18; 4
www.editorialmedica.com/Fert%20/Jul_Ag01-Ponen3.pdf
27. Mazur. “Freezing of living cell: mechanisms and implications”. *Am J Physiol* 1984; 247:C125-C142

28. NOM-059-SSA1-1993 Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/059ssa13.html>
29. Bone Marrow and Stem Cells processing: manual of current techniques. Areman, Deeg, Sacher. Ed. FA. Davis company; 1992 cap. 9
30. Millán. Factores que influyen en la eficacia del procesamiento y criopreservación de células progenitoras hematopoyéticas procedentes de sangre de cordón umbilical. Tesis 2004 UNAM.
31. Catálogo de productos biosef.
<http://www.biosafe.ch/includes/catalog.pdf>
32. Manual del Operador SEPAX sistema de procesamiento celular. OM-0144. Biosafe. 4A-1
33. Centro Nacional de Transplantes (CENATRA)
www.cenatra.gob.mx/cnt/Grafica_tot.php