

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**ESTANDARIZACIÓN DE CULTIVOS CLONOGÉNICOS Y SU APLICACIÓN
COMO MÉTODO DE VALIDACIÓN DE UNIDADES DE CÉLULAS
PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS DE CORDÓN UMBILICAL.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JOSÉ DE JESÚS GAMBOA ÁVILA

MÉXICO, DF.

AÑO 2007



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. Rodolfo Pastelin Palacios
Vocal	Prof. Eva Delia Calderón Garcidueñas
Secretario	Prof. Rosalinda Velázquez Salgado
1er Suplente	Prof. Perla Deyanira Maldonado Jiménez
2do Suplente	Prof. Araceli Mendieta Rergis

Sitio en donde se desarrolló el tema: Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea. Otón de Mendizábal 195, Col. Zacatenco, Deleg. Gustavo A. Madero, México, D. F.

Asesor del tema: E.B.C. Eva Delia Calderón Garcidueñas

Sustentante: José de Jesús Gamboa Ávila



Todo mi agradecimiento:

A Dios por todo lo bueno que ha sido conmigo, ya que me dió la oportunidad de vivir, guiarme, fortalecerme cada día y regalarme una familia maravillosa.

A mi asesora de Tesis la Prof. Eva Calderón Garcidueñas, por brindarme la oportunidad de colaborar en su laboratorio, haber confiado en mi y darme todo su apoyo a lo largo del desarrollo de esta tesis.

A Miriam Millan Rocha que ha sido pieza fundamental para el desarrollo de este trabajo.

A Lupita Olmedo ya que sin su intervención esta tesis nunca hubiera sido posible.

A la Familia López Varela por toda la ayuda que de forma incondicional siempre me han brindaron.

A la Sra. María Rivera Vega por su cariño, confianza y apoyo que me ha dado durante todo este tiempo.

A Álvaro Romo, Javier Aceves, Lizeth Ferrer, Sandra Ramírez, Dr. Enrique Rico por la confianza que han depositado en mi, así como toda la ayuda para el término de este trabajo.



Dedicado con todo mí cariño:

A mis padres que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento apoyándome y brindándome todo su amor.

A mi hermano que siempre me ha brindado su apoyo y cariño; además de "darme siempre una manita" cuando lo he necesitado.

A mi esposa por ser la fuente de mi inspiración y motivación para superarme cada día más y así poder luchar para que la vida nos depare un futuro mejor



ÍNDICE

Abreviaturas	1
1. Introducción	2
2. Generalidades	3
2.1 Hematopoyesis	3
2.1.1 Las Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH)	4
2.1.1.1 Características generales de las CPH	5
2.1.1.2 Características fenotípicas	6
2.1.1.3 Desarrollo de las CPH	6
2.1.1.4 Uso de las CPH	7
2.1.1.5 Fuentes de las CPH	8
2.2 Sangre De Cordón Umbilical (SCU)	8
2.2.1 Características	9
2.2.2 Ventajas	9
2.2.3 Técnica de recolección de Sangre de Cordón Umbilical	10
2.3 Banco De Cordón Umbilical (BCU)	11
2.3.1 Actividades de un banco de cordón	11
2.3.1.1 Recolección	11
2.3.1.2 Procesamiento en el laboratorio	12
2.3.1.3 Criopreservación	12
2.3.1.4 Control de calidad	13
2.4 Cultivos clonogénicos	14
2.4.1 Generalidades	14
2.4.2 Medios de cultivo	15
2.4.2.1 Metilcelulosa	17
2.4.3 Procedimiento de cuenta	17
2.4.4 Tipos de colonias	18
2.4.4.1 Colonias eritroides	19
2.4.4.1.1 Unidad Formadora de Colonias Eritroides (UFC-E)	20



2.4.4.1.2 Unidad formadora de Brotes Eritroides (BFU-E)	20
2.4.4.1.3 Unidad Formadora de Brotes Eritroides maduras (BFU-E Maduras)	21
2.4.4.1.4 Unidad Formadora de Brotes Eritroides Primitivas (BFU-E Primitivas)	21
2.4.4.2 Colonias granulopoyéticas	22
2.4.4.3 Colonias multilinaje	23
2.4.4.4 Colonias de megacariocitos	24
2.4.4.5 Colonias de blastos	24
2.4.5 Factores que afectan la formación de colonias	25
2.4.5.1 Sobresebrado	25
2.4.5.2 Inadecuada viscosidad	25
2.4.5.3 Colonias en el borde de la caja	26
2.4.5.4 Cambios en la humedad	26
2.4.5.5 Contaminación	27
2.4.6 Factores de crecimiento celular	27
2.4.6.1 Factores Estimulantes de Colonias	28
2.4.6.1.1 Factor Estimulante de Colonias (FSC)	28
2.4.6.1.2 Factor Estimulador de Crecimiento de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (FSC-GM)	29
2.4.6.1.3 Factor Estimulante de Crecimiento de Colonias de Granulocitos (FSC-G)	29
2.4.6.1.4 Factor Estimulante de Crecimiento de Colonias de Macrófagos (FSC-M)	30
2.4.6.2 Interleucinas	30
2.4.6.2.1 Interleucina IL-1	30
2.4.6.2.2 Interleucina IL-2	31
2.4.6.2.3 Interleucina IL-3	31
2.4.6.2.4 Interleucina IL-4	32



2.4.6.2.5 Interleucina IL-6	32
2.4.6.2.6 Interleucina IL-7	32
2.4.6.3 Eritropoyetina (EPO)	33
3. Objetivos	34
3.1 Objetivo general	34
3.2 Objetivos relacionados	34
4. Planteamiento del experimento	35
5. Diagrama de flujo	36
6.- Metodología	37
6.1 Selección de muestras	37
6.2 Cálculo del volumen de siembra	37
6.3 Liberación y descongelamiento de la Unidad	38
6.4 Determinación de la viabilidad por azul tripano	39
6.5 Sembrado de la unidad	40
6.5.1 Metilcelulosa (MethoCult)	41
6.5.2 IMDM (Medio de Dulbecco Modificado de Iscove)	42
6.6 Incubación de las cajas	42
6.7 Cuantificación de las colonias	43
6.8 Cálculo de la eficiencia clonogenica (E-clone)	46
6.9 Validación de resultados	47
6.9.1 Repetibilidad (r)	47
6.9.2 Reproducibilidad (R)	47
7. Resultados y análisis de resultados	48
7.1 Eficiencia clonogénica	48
7.2 Validación del método.....	50
7.3 Validación de las unidades.....	52
8. Conclusiones	56
9. Bibliografía	58



Abreviaturas

CPH	Células progenitoras hematopoyéticas
SCU	Sangre de cordón umbilical
BCU	Banco de cordón umbilical
UFC-E	Unidad formadora de colonias eritroides
BFU-E	Unidad formadora de brotes eritroides
FSC	Factor estimulante de colonias
FSC-GM	Factor estimulante de colonias Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
FSC-G	Factor estimulante de colonias de granulocitos
FSC-M	Factor estimulante de colonias Macrófagos
IL	Interleucina
EPO	Eritropoyetina
E-clone	Eficiencia clonogénica
SPM	Sangre periférica movilizada
MO	Medula Ósea
HES	Hidroxi-etil almidón
DMSO	Dimetilsulfóxido



1. INTRODUCCIÓN

Las células sanguíneas maduras son altamente especializadas y tienen un espacio de vida considerablemente corto. Después del nacimiento, la producción de nuevas células sanguíneas normalmente ocurre en la médula ósea a una velocidad de varios millones de células por día. Sin embargo los diferentes linajes de células sanguíneas provienen de un *pool* común de Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH). La producción de células sanguíneas a partir de éstas es un proceso extremadamente complejo que involucra la continua y coordinada diferenciación y proliferación de células progenitoras intermedias, todo esto bajo el control de un gran número de citocinas, muchas de las cuales son producidas localmente por células estromales de la médula. Durante las décadas pasadas se han realizado muchos avances científicos con la finalidad de definir las relaciones jerárquicas de estas células progenitoras y actualmente muchas de estas pueden ser detectadas *in vitro* por ensayos de colonias denominados Cultivos Clonogénicos.

Por otro lado, el auge en el uso de las CPH con fines clínicos ha motivado el surgimiento de controles que aseguren la calidad hematopoyética de las unidades que van a ser trasplantadas. Para esto no solo es importante el garantizar un elevado número de células en la muestra, también se debe tomar en cuenta que éstas sean funcionales y que en caso de ser usadas en un trasplante puedan reconstituir la función hematopoyética. Bajo esta premisa resulta de gran importancia el uso de los cultivos clonogénicos como método para la determinación del potencial funcional de las muestras.



2. GENERALIDADES

2.1 HEMATOPOYESIS

La producción de células hematopoyéticas o Hematopoyesis es un proceso dinámico constante el cual se inicia a nivel unicelular con la auto-duplicación, seguido de diferenciación y maduración, terminando con la producción de los distintos tipos de células que conforman los elementos sanguíneos. ⁽⁵⁾

La diferenciación se puede definir como la secuencia de procesos de tipo genéticos que permiten a una célula sintetizar productos específicos, los que le proporciona potencialidad para determinada función. ⁽⁵⁾

La maduración es la secuencia de fenómenos bioquímicos y morfológicos iniciados por la diferenciación y que confieren capacidad funcional a la célula. Este proceso depende principalmente de la presencia de ciertos factores de crecimiento celular, como por ejemplo, la eritropoyetina, que estimula la diferenciación y maduración de la línea eritroide. ⁽⁵⁾



2.1.1 LAS CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS (CPH)

Todas y cada una de las células hematopoyéticas desarrolladas a través del proceso de hematopoyesis (figura 1) tienen como precursor común una célula primitiva conocida como célula progenitora hematopoyética (CPH). (5)

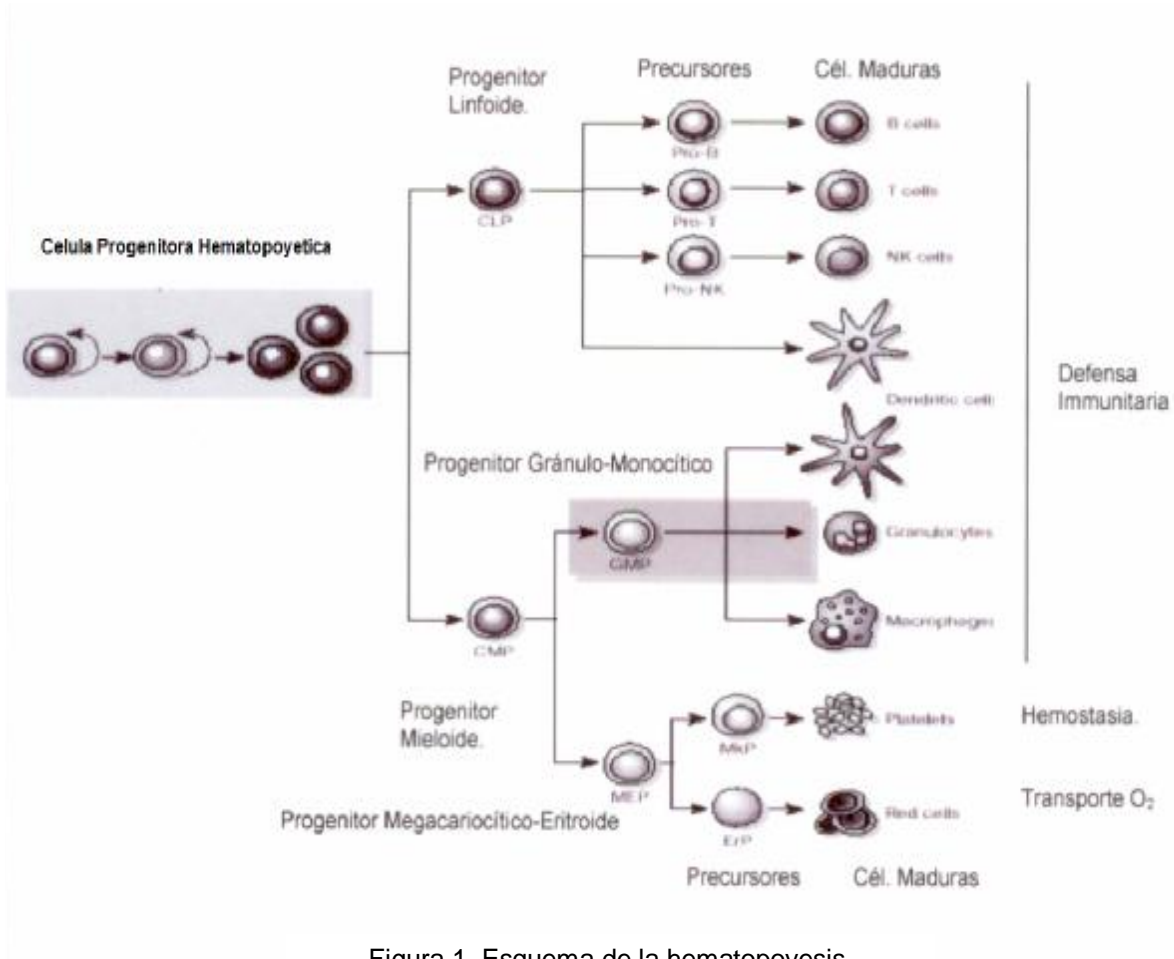


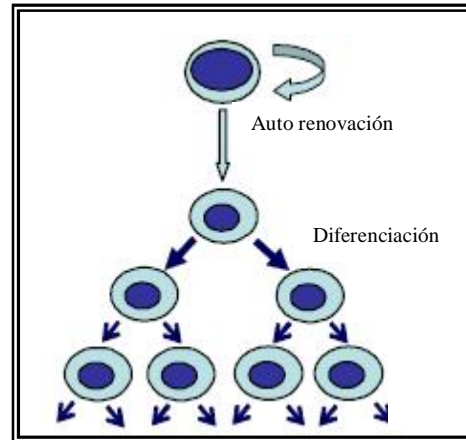
Figura 1. Esquema de la hematopoyesis.



2.1.1.1 Características Generales de las CPH

Las principales características que definen a la CPH son dos y se mencionan a continuación:

1.-Auto-renovación: Lo que da como resultado una progenie con las mismas características de la CPH primitiva. La auto-renovación es el proceso por el cual una CPH genera una (división asimétrica) o dos (división simétrica) CPH hijas con potencial de desarrollo y características que son indistinguibles de la célula madre. Se ha observado que las CPH obtenidas de sangre de cordón poseen un potencial de proliferación muy superior al observado en CPH obtenidas de Médula Ósea (MO). (2)



2.-Diferenciarse para dar origen a todos los elementos celulares sanguíneos que incluyen la serie mieloide, como los eritrocitos, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos mastocitos), monocitos/macrófagos y plaquetas, así como los linfocitos T y B.

Figura 2.- Auto renovación y diferenciación de las Células

Las características de auto-renovarse y diferenciarse dependen de la estimulación de un grupo de moléculas denominadas Factores de Crecimiento, que actúan en las CPH.

A medida que las CPH van madurando desarrollan características de un tipo particular de célula madura y al mismo tiempo, pierden la capacidad para formar cualquier otro tipo de célula así como de auto-renovarse. Las formas más maduras exceden en número considerable a sus precursores menos diferenciados. La mayor parte de las CPH al madurar pierden totalmente su capacidad de replicación, de forma que están diferenciadas terminalmente.



2.1.1.2 Características fenotípicas

A través del uso de anticuerpos monoclonales se ha establecido que las CPH expresan el antígeno CD34, mas no así los antígenos CD33, CD38 y HLA-DRL, o aquellos que identifican antígenos de linaje linfoide (Lin-), por lo tanto son CD34+ CD38- Lin-. Recientemente se han reportado pequeñas poblaciones de CPH que no expresan el antígeno CD34, esto quiere decir que son CD34⁻ CD38⁻ Lin⁻ y esto evidencia que estas últimas dan lugar a las CPH que expresan CD34⁺. (3)

2.1.1.3 Desarrollo de las CPH

Las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) se originan en el mesodermo del saco vitelino durante las primeras semanas de la vida embrionaria. En el transcurso de dos meses después de la concepción, gran parte de las CPH han migrado al hígado fetal y es en ese sitio donde se produce la mayor parte de la hematopoyesis durante el desarrollo fetal. (5,6)

En etapas más avanzadas de la gestación las CPH comienzan a colonizar las cavidades de la médula ósea en desarrollo, la cual tiene una red de células epiteliales (estroma de la médula ósea) que proporcionan el ambiente necesario para el crecimiento y la diferenciación de las CPH y de sus descendientes. En el momento del nacimiento todo el espacio medular esta ocupado por células hematopoyéticas en desarrollo, lo cual proporciona al recién nacido casi la misma capacidad hematopoyética que la de sus progenitores adultos. (5, 6)



2.1.1.4 Uso de las CPH

A lo largo de las últimas tres décadas, el principal uso de las CPH es en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (CPH), el cual se ha convertido en un recurso terapéutico imprescindible en la práctica moderna de la medicina con diversos tipos de enfermedades hematológicas, como son: (20,21)

- Leucemia Linfoblástica Aguda
- Leucemia Mieloblástica Aguda
- Leucemia Mieloblástica Crónica
- Síndromes Mielodisplásicos
- Neuroblastoma
- Trombocitopenia Amegacariocítica.
- Anemia de Fanconi
- Disqueratosis.
- Enfermedad Gaucher
- Anemia Severa
- Osteopetrosis

Ha resultado muy importante el uso de este procedimiento para brindar mejores expectativas de vida a una gran cantidad de pacientes.

Investigaciones recientes están enfocadas en buscar aplicar estas células para tratar una gama más amplia de enfermedades hematopoyéticas y no hematopoyéticas.



2.1.1.5 Fuentes de las CPH

Para la obtención y uso de las CPH existen 3 fuentes principales que son: (7)

§ Médula Ósea (MO): durante mucho tiempo, se constituyó como la única fuente para la obtención de las CPH con fines de trasplante. En personas adultas, la vasta mayoría de las CPH residen en la médula ósea, donde representan el 0.1% del total de células presentes en este tejido.

- Sangre Periférica Movilizada (SPM): este método consiste en trasladar células madre de la médula ósea hacia la sangre en cantidad suficiente como para usarlas para un trasplante. El donante es tratado con un fármaco que traslada las células madre hacia la sangre.
- Sangre de Cordón Umbilical (SCU): la sangre de cordón se ha constituido como una fuente muy importante de CPH para su uso en trasplantes. Esta sangre se obtiene en el momento del parto a través del cordón umbilical mientras la placenta se encuentra *in útero*.

El uso de MO y SPM se ha visto limitado principalmente por la baja compatibilidad de HLA entre donadores relacionados. (7)

2.2 SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL (SCU)

A la fecha la SCU es una de las mayores fuentes de CPH para aplicaciones clínicas, y representa una alternativa real para el trasplante de CPH de médula ósea. Esto debido a que el uso de la SCU presenta diversas ventajas con respecto a las otras fuentes.



2.2.1 Características

De la Sangre de Cordón Umbilical el volumen que se puede obtener por una Unidad de SCU oscila de 42 a 240 mL y el número total de células nucleadas varía entre 4.7×10^8 y 10.2×10^8 .⁽¹⁾ Un mililitro contiene entre 1 000 y 10 000 UFC-Mix, 8 000 BFC-E y entre 5 000 y 14 000 UFC-GM; así el número total de UFC es aproximadamente de 23 000 por mL que representa el 1.1% del total de células por mililitro.⁽²⁾

2.2.2 Ventajas

La SCU presenta diversas ventajas comparada con la MO y la SPM. Entre las más importantes están: ^(6, 9, 18)

- El contenido celular, en particular el número de CPH, es aproximadamente 10% mayor que en las obtenidas de MO.
- Existe una disponibilidad casi inmediata de las unidades de SCU ya almacenadas.
- Método de obtención simple y sin riesgos para el donante.
- Se pueden obtener tanto de partos vía vaginal como de cesárea.
- El injerto ocurre en una proporción superior a la observada con el uso de MO.
- Frecuencia de enfermedad injerto contra hospedero es significativamente menor que cuando se usa MO.
- Necesita una identidad HLA menos restrictiva, hasta con una identidad de 4/6 para antígenos A y B de clase I y II. Esto hace posible que la probabilidad de encontrar una unidad compatible sea superior al 70% para un banco que posea un inventario de unas 10 000 muestras.



2.2.3 Técnica de recolección de Sangre de Cordón Umbilical

La SCU se obtiene cuando la placenta está "*in útero*" y el recién nacido ha sido separado de la placenta. La recolección de la SCU la realiza el médico que asiste el parto.

La técnica es rápida y, de manera resumida, incluye el doble "pinzaje" y sección del cordón umbilical, asepsia y punción de la vena umbilical, seguida del drenado por gravedad en la bolsa de recolección, cooperando mediante expresión suave del cordón. Frecuentemente se practica una segunda punción.

El procedimiento de recolección se realiza en un promedio de tres minutos. Una vez recogido el máximo volumen posible se espera al alumbramiento de la placenta. Así mismo se guarda un fragmento de cordón en el tubo correspondiente. La SCU recolectada se mantiene a temperatura ambiente y es enviada al banco de sangre de cordón umbilical para su procesamiento, preferentemente durante las primeras 24 horas después de la recolección.

Dentro de los factores obstétricos que pueden condicionar el volumen residual de sangre placentaria se encuentran: el peso del recién nacido, el peso de la placenta, el trabajo de parto y el tipo de maniobra del recién nacido tras el nacimiento. La técnica de recolección es el factor final que condiciona un mayor rendimiento en la obtención de la SCU, la cual tiene implicaciones en la calidad hematopoyética de la misma. (7,9,18)



2.3 BANCO DE CORDÓN UMBILICAL (BCU)

Alrededor del mundo el éxito del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas ha motivado el surgimiento de instituciones de carácter público conocidas como Bancos de Cordón Umbilical con el fin de recolectar y almacenar unidades de cordón y así suministrar unidades con las máximas garantías de calidad, a los centros de trasplante. Para facilitar el funcionamiento de estos Bancos ha sido necesario el desarrollo de programas de donación, obtención, manipulación y almacenamiento de la SCU.

2.3.1 Actividades de un banco de cordón

A fin de criopreservar la sangre de cordón umbilical, el banco de sangre realiza las siguientes actividades:

2.3.1.1 Recolección

La recolección de sangre de cordón umbilical se realiza utilizando un “Kit de recolección”, que consiste de una bolsa de recolección de sangre de 150 mL de capacidad, con anticoagulante CPD-A, y material estéril para la toma de muestra de sangre materna para realizar pruebas de serología. Este kit es entregado a la pareja durante el embarazo. Con la muestra tomada a la mamá se realiza serología habitual para bancos de sangre que incluye pruebas para sífilis, chagas, CMV, toxoplasmosis, HIV 1-2, HCV y AgsHB y antígeno de superficie. La recolección es realizada por el propio médico obstetra que asiste al parto, o por personal del banco que se hace presente al momento de la recolección. ⁽¹⁰⁾



2.3.1.2 Procesamiento en el laboratorio

Una vez que la bolsa con sangre del cordón ingresa al laboratorio, es pesada para determinar el volumen de sangre recolectado; luego se toma una muestra en un gabinete de bioseguridad para realizar recuento celular total, cálculo de la viabilidad, y recuento leucocitario diferencial. Para la reducción de volumen de la muestra original, y para lograr la concentración de las células madre se utiliza un agente que aglomera los glóbulos rojos, como el hidroxietil almidón (HES) complementado con fuerza centrífuga. Para la concentración celular se utiliza un kit de bolsas interconectadas para trabajo en sistema cerrado que incluye la bolsa donde se criopreservará el material concentrado; estos sistemas tienen menos probabilidad de contaminación, y una menor exposición de las células a sustancias químicas y a la agresión gravitacional. Luego de lograr el concentrado celular, en forma aséptica se toma una muestra del mismo, con la que se realizan nuevamente recuentos totales y diferenciales y determinación de la viabilidad. ⁽¹⁰⁾

2.3.1.3 Criopreservación

El crioprotector habitual es el Dimetilsulfóxido (DMSO), y debe ser utilizado en frío y agregado al concentrado celular lentamente ya que puede ser tóxico para las células. Una vez realizada la mezcla crioprotector con concentrado celular, se cierra la bolsa de criopreservación en un estuche metálico adecuado al tamaño de la misma, y se procede a disminuir la temperatura de manera progresiva y controlada mediante sistemas computarizados y nitrógeno líquido. Una vez que se han alcanzado los -50°C , se transfiere la unidad congelada a la ubicación definitiva dentro del termo de almacenamiento en nitrógeno líquido, donde debe mantenerse sumergida permanentemente a una temperatura de -196°C . ⁽¹⁰⁾



A los efectos de mantener un nivel adecuado del mismo, los termos que se utilizan generalmente están provistos de sensores y de un mecanismo automático que regula el ingreso de nitrógeno, desde un tanque de transferencia que se encuentra adyacente al termo de almacenamiento, y conectado al mismo por un sistema de tuberías que permitan la transferencia del nitrógeno líquido, en cantidad suficiente como para reponer el que se haya evaporado.

2.3.1.4 Control de Calidad

A fin de garantizar la calidad hematopoyética de cada una de las unidades de sangre de cordón criopreservadas, se realiza estudios diversos como:

- Microbiología: se realiza con el fin de determinar que no exista contaminación por microorganismos.
- Serología: para descartar la presencia de VIH, HVC, AgHB, chagas, CMV, sífilis y toxoplasma
- Cuantificación de células nucleadas totales: la unidad debe tener una cantidad mínima de 8×10^8 .
- Citometría de flujo: determinación de la cantidad de células CD34+, esta cantidad no debe ser menor al 0.1% del total de células nucleadas, viabilidad celular 7-AAD

Este último, es resultado directo de la cantidad de CPH presentes en la unidad, con lo cual se asegura que cada unidad cuenta con la cantidad suficiente para ser usada en caso de realizar un procedimiento de trasplante. ⁽¹⁰⁾



2.4 CULTIVOS CLONOGÉNICOS.

2.4.1 Generalidades

El primer ensayo de colonias para células progenitoras hematopoyéticas fue descrito en 1967 por un grupo de investigadores en Toronto Canadá como una extensión natural de estudios previos realizados con ratones en 1960. ⁽¹¹⁾

Los ensayos de cultivos de CPH, conocidos como Cultivos clonogénicos son usados para detectar la capacidad de proliferación y diferenciación de las CPH en distintos y sucesivos estadíos, e incluso medir la frecuencia de estas células. Actualmente, las condiciones de cultivo han sido identificadas y permiten la formación *in vitro* de colonias de células eritroides, granulocitos, macrófagos y megacariocitos, además de combinaciones de éstas. La detección de la progenie clonal de precursores individuales presentes en la muestra original es posible a través de cultivar las células en un medio que contiene un agente gelificante que generalmente impide el movimiento celular. Las células mas maduras que se encuentran en sangre o medula ósea generalmente se lisan dentro de unos pocos días después de iniciado el proceso de cultivo. Las nuevas células que son producidas como colonias localizadas son por lo tanto fácilmente identificadas usando un microscopio de objetivos invertidos. ^(12, 19)

La capacidad de reproducibilidad y cuantitatividad de ensayos *in vitro* para una variedad de diferentes tipos de CPH ha sido un fuerte impulso a la investigación tanto en la hematopoyesis normal como anormal. Este método es también útil para calcular el contenido de progenitores de médula ósea o en sangre de cordón umbilical antes o después de una serie de manipulaciones, particularmente los procesos usados como parte de la criopreservación y del trasplante. ⁽¹²⁾



Uno de los grandes problemas inherentes en el uso *in vitro* de ensayos de colonias hematopoyéticas es la variabilidad tanto en el desarrollo y apariencia de las mismas, que pueden ser encontradas con ligeros cambios en particular debido a el cambio de lotes o concentración de cada uno de los componentes del medio usado. (11)

Es importante recordar que la estandarización del medio de cultivo es solo una de las condiciones necesarias para maximizar la reproducibilidad en la formación de colonias hematopoyéticas. Otras condiciones, incluyendo: temperatura, humedad, niveles O_2 y CO_2 , pueden afectar el crecimiento y morfología de la colonia. Además, el método usado para sembrar las células, su pureza y concentración, y que el tipo de factores de crecimiento usados en la prueba pueden influenciar los resultados obtenidos. (11)

2.4.2. Medios de cultivo

Las células progenitoras hematopoyéticas presentes en la sangre y en la médula ósea cuando son cultivadas en un medio de metilcelulosa tienden a formar colonias, estos progenitores son llamados “Unidades Formadoras de Colonias” (UFC) o “Unidades Formadoras de Brotes” (BFU) en el caso de ciertos progenitores hematopoyéticos.



Estas UFC son clasificadas de acuerdo a el tipo (linaje) y número de células maduras producidas en cada colonia como sigue:

- UFC-E (Unidad Formadora de Colonias Eritroide): produce 8-200 eritroblastos en 1-2 clusters.
- BFU-E (Unidad Formadora de Brotes Eritroides): produce 3 o mas clusters de eritroblastos o un número equivalente de eritroblastos.
- UFC-GM (Unidad Formadora de Colonias Granulocitos, Macrófagos): produce 20 o mas granulocitos y macrófagos.
- UFC-GEMM (unidad formadora de colonias granulocitos, eritrocitos, macrófago, megacariocitos): produce 20 o mas células incluyendo algunas de los primeros dos tipos mencionados.

Ensayos *in vitro* han sido desarrollados para cuantificar el multipotencial de los progenitores hematopoyéticos y la restricción para diferenciarse en eritrocitos, granulocitos, monocitos, macrófagos y megacariocitos mieloides. Cuando cultivamos en una matriz semi-sólida, progenitores individuales llamados células formadoras de colonias CFC, proliferan para formar discretos clusters o colonias. Ensayos de CFC son realizados en suspensiones celulares usando medios semi-sólidos, tales como metilcelulosa o colágeno suplementados con nutrimentos y citosina, seguido de una incubación a 37° C por 10 a 14 días, las CFC, son clasificadas y enumeradas basadas en el reconocimiento morfológico de uno o más tipos de linajes celulares con las colonias. La evaluación y enumeración de las colonias puede ser hecho *in situ* usando solo el microscopio o tomando colonias individuales y sometiéndolas a métodos de histoquímica o inmunocitoquímica. (11)



2.4.2.1 Metilcelulosa

Varios agentes gelificantes incluyendo el agar, agarosa, metilcelulosa, colágeno y fibrina han sido usados en ensayos de CFC. Metilcelulosa es un polímero relativamente inerte que forma un gel estable con claridad óptica. Es comúnmente usada en una concentración final de 0.9-1.2% en medios de cultivo suplementados con diversos compuestos incluyendo suero fetal bovino (SBF), albúmina sérica bovina (ASB), 2-mercaptoetanol, insulina, transferrina y citosina recombinantes o medio condicionado con una fuente de factores estimulantes de colonias. El medio con base de metilcelulosa permite un mejor desarrollo del linaje de células eritroides que otro tipo de matrices semisólidas, de este modo permite ensayos de CFC eritroides, granulocitos, monocitos y multipotenciales con el mismo cultivo. (13)

2.4.3 Procedimiento de cuenta

El conteo del número y tipo de colonias es mejor usando un microscopio que ha sido equipado con objetivos invertidos de alta calidad y piezas ópticas que le dan un poder de amplificación de aproximadamente 20-30X, 80X y 150X. Para facilitar el conteo, cada caja es colocada dentro de una caja de cultivos de tejidos que cuenta con un grabado de columnas o hileras, dentro de la caja del cultivo se inicia el conteo. La caja de 60 mm puede ser marcada con una cruz usando un plumón para formar los 4 cuadrantes. Se centra la caja de cultivo en la intersección de la cruz marcada, esto posibilita el dividir a la mitad o en cuadrantes el área de conteo sobre todo cuando las colonias son suficientemente numerosas. Es necesario primero realizar una observación a la caja entera en amplificación baja para asegurar que la porción de la caja que se va a usar para realizar el conteo es representativa de la caja entera. (11,13)



El conteo es mas fácil a los ojos, cuando la caja de cultivo es revisada verticalmente; por lo que se recomienda realizar el primer movimiento de arriba hacia abajo antes de moverla hacia los lados. Cada prueba debe ser colocada por duplicado. Para realizar el cálculo del número de cada uno de los progenitores que se encuentran en la muestra original se debe calcular el promedio del tipo colonias en una porción definida o en todo el medio de metilcelulosa de una caja. Este cálculo esta basado en el número de células sembradas por unidad de volumen en el medio final de metilcelulosa. (11,13)

Se debe realizar comparaciones entre las cuentas obtenidas por diferentes miembros del personal para mantener un criterio de conteo consistente dentro del laboratorio. Es importante además no agitar las cajas para evitar distorsiones en el medio, esto debido a que la metilcelulosa es un líquido viscoso, no un sólido, y la formación de colonias será afectada con este movimiento. (11,13)

2.4.4 Tipos de colonias

Como se expuso en la parte dedicada a hematopoyesis, todas las colonias hematopoyéticas se desarrollan a partir de una sola célula que se divide y diferencia para dar una progenie que se puede reconocer morfológicamente. Bajo condiciones rutinarias usadas en ensayos de colonias, la mayoría de los progenitores se diferencian formando colonias en un período finito y previsible de incubación, tras el cual, todas las células han llegado a la madurez y la colonia no incrementará mas su tamaño. Es en este punto, cada tipo de colonia es valorado adecuadamente, ya que las células maduras producidas empezarán a destruirse.

(11,13)



2.4.4.1 Colonias Eritroides

En ensayos realizados en metilcelulosa, los progenitores eritropoyeticos generan colonias que cuando maduran, pueden consistir de un variable número de *clusters* de eritroblastos que ya contienen hemoglobina. Normalmente este tipo de células no se desarrollan cuando no existe la suficiente cantidad de eritropoyetina en el medio. Sin embargo, la proliferación de progenitores eritroides en tempranos estadios de desarrollo puede ser estimulado por otros factores y por lo tanto, aun en la ausencia de eritropoyetina, un número considerable de células puede ser producida de individuales BFU-E antes que el crecimiento se detenga. El grado a el cual los *cluster* aparecen como unidades distintas puede fácilmente estar también influenciado por los cambios en las condiciones de cultivo. Uno de estos es la concentración final de metilcelulosa que se disolvió en el medio, en un medio mas viscoso, existe una gran tendencia de los cluster de eritroblastos a quedarse en un solo grupo de células, e inversamente, en un medio menos viscoso existe una gran tendencia de fragmentarse los *clusters* en un gran número de pequeños *clusters*. El tipo y concentración de los factores de crecimiento presentes es otro parámetro que influencia fuertemente la morfología de las colonias de eritrocitos.

(11,13)

Es por lo tanto importante establecer los criterios de conteo de colonias eritroides basados en un cálculo aproximado del número total de células en la colonia, como el número de *clusters* que la componen. (11,13)



2.4.4.1.1 Unidad Formadora de Colonias Eritroides (UFC-E)

UFC-E (Unidad Formadora de Colonias Eritroides) es el término usado para referir a estos progenitores que dan lugar a colonias eritroides pequeñas y de rápida maduración. Cuando maduran, las UFC-E consisten de solo uno o dos *clusters* conteniendo un máximo de aproximadamente 100 a 200 eritroblastos. Cada *cluster* puede contener un mínimo de 8 eritroblastos al ser contados. Los eritroblastos son únicamente reconocibles en metilcelulosa por un distintivo tono rojizo-naranja debido a su contenido de hemoglobina. La gran mayoría de las UFC-E presentes en la suspensión original alcanzaran la madurez de 10 a 12 días. Después de este tiempo las células se comienzan a lisar. Si se cuentan todas las colonias después de 14 o más días de incubación, se debe tomar en cuenta que las colonias aparecen lisadas, con un color parduzco. (11,13)

2.4.4.1.2 Unidad formadora de brotes eritroides (BFU-E)

El término BFU-E (Unidad Formadora de Brotes Eritroides) es usado para denotar una clase de progenitores más primitiva que UFC-E. La propiedad distintiva de las BFU-E es el grado de capacidad proliferativa que le permite un gran crecimiento con el cual produce multi-*clusters* de colonias eritroides. El término “brote” fue acuñado para reconocer el aspecto repentino de hemoglobina en colonias antes descoloridas debido al modelo de diferenciación de las células eritroides. Los brotes eritroides son también algunas veces referidas con una morfología de racimo de uvas. Pueden extenderse en tamaño desde colonias consistentes de 3 pequeños *clusters* (o un gran *cluster*) conteniendo más de 200 eritroblastos extremadamente grandes, pero colonias de eritroblastos puros contienen 10 o más *clusters* y 10^4 o más células individuales. (11,13)



Cuando se cuentan colonias eritroides desarrolladas en metilcelulosa conteniendo una combinación de factores de crecimiento recombinantes, es usualmente más difícil distinguir diferentes *clusters* y por lo tanto valorar el tamaño de la colonia depende más a menudo en un estimado del número de células en la colonia. (11,13)

2.4.4.1.3 Unidad Formadora de Brotes Eritroides maduras (BFU-E Maduras)

Las BFU-E maduras es un término que es usado para identificar BFU-E que son el inmediato precursor de UFC-E. Ellas están definidas por su habilidad para generar colonias eritroides intermediarias que contienen por lo menos 3 pero no más de 8 *clusters* de eritroblastos, correspondiendo a colonias maduras de 100 a 500 células. Las colonias producidas por BFU-E maduras están usualmente completamente hemoglobinizadas dentro de 10 a 12 días de incubación y pueden aparecer conteniendo eritroblastos lisados de color parduzco cuando se cuenta después del día 16 ó 18. (11,13)

2.4.4.1.4 Unidad Formadora de Brotes Eritroides Primitivas (BFU-E Primitivas)

Las BFU-E Primitivas son definidas como aquellos progenitores que dan un aumento de 9 ó más *clusters* de eritroblastos hemoglobinizados. Estas colonias son mejor evaluadas después de 18 días de incubación en medio de metilcelulosa que contiene medio condicionado de leucocitos o después de 14 a 16 días cuando es usada la concentración óptima de factores de crecimiento recombinante. En etapas tempranas muchas de estas colonias no habrán comenzado todavía a hemoglobinizarse y pueden ser confundidas con colonias de granulocitos. Ocasionalmente, algunas colonias que conseguirán un tamaño muy grande al final no pueden estar completamente hemoglobinizadas hasta que hayan pasado 18 días. (11,13)



Las BFU-E Primitivas algunas veces se subdividen más, en aquellas que genera 9 a 16 *clusters* de eritroblastos y aquellas que generan mas que 16 *clusters* de eritroblastos, facilitando así la investigación de propiedades que cambian con mucha facilidad en la diferenciación de las células progenitoras. (11,13)

2.4.4.2 Colonias granulopoyéticas.

Los progenitores clonogénicos de granulocitos (UFC-G), macrófagos (UFC-M), o ambas (UFC-GM) son definidos en base a su habilidad de producir colonias que contienen un mínimo de 20 ó 50 de estas células, dependiendo del criterio de conteo desarrollado en cada laboratorio. (11,13)

Los progenitores granulopoyéticos fueron las primeras células clonogénicas hematopoyéticas en ser desarrolladas en un medio semisólido antes de saber que estas tenían un potencial diferencial o no, inicialmente fueron llamadas UFC-C (Unidades Formadoras de Colonias en Cultivo). Después de estos primeros ensayos se hizo evidente el potencial proliferativo de estas células, pero limitado a diferenciarse hacia granulocitos y/o macrófagos, es entonces cuando se involucran los términos UFC-G, UFC-M y UFC-GM. Inicialmente, muchas de las colonias de granulocitos obtenidas *in vitro*, eran en realidad colonias de neutrófilos y/o macrófagos, y solo después fueron colonias de eosinófilos y basófilos también reconocibles. Eosinófilos y basófilos no son típicamente vistos mezclados con macrófagos y tienen un aspecto diverso incluso en preparaciones sin manchas.

(11,13)



En general, colonias de neutrófilos y macrófagos demuestran una relativa morfología homogénea, a menudo con una parte central muy concentrada de células envueltas por un halo poco denso de células. En cuanto a su tamaño, los neutrófilos son pequeñas células, mientras que los macrófagos tienden a ser grandes, algunas veces son muy grandes. Por otro lado las colonias de basófilos son raramente encontradas en ensayos de rutina, a diferencia de las colonias de eosinófilos que son más abundantes. (11,13)

2.4.4.3 Colonias multilinaje

Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos-Eritrocitos-Macrocitos-Megacariocitos (UFC-GEMM) es el nombre dado al progenitor de células que producen colonias que contienen células de múltiples linajes que usualmente incluyen células eritroides. Tales colonias son mejor evaluadas después de 14 a 16 días cuando son usados factores recombinantes de crecimiento. Se debe tomar cuidado extra cuando se cuentan colonias multilinaje, debido a que la diversidad de linajes puede crear confusión y ser mal identificada. En algunos otros casos, pequeños números de granulocitos, macrófagos y/o megacariocitos pueden aparecer alrededor de la periferia de una masa esférica de células eritroides que contienen hemoglobina, este tipo de colonias pueden ser contadas por error como colonias puras eritroides si no se examina con cuidado o con alta resolución. (11,13)



2.4.4.4 Colonias de megacariocitos

Progenitores de megacariocitos pueden también generar diferentes tamaños de colonias en metilcelulosa. Sin embargo, son extremadamente sensibles a la inhibición por TGF- β (factor de crecimiento transformador β) el cual puede estar presente en el suero fetal de ternero en concentraciones suficientes para impedir la optima formación de colonias megacariociticas. Es muy importante que, aunque muchos megacariocitos tienen un gran tamaño y aspecto traslucido, esto no es una vía segura para identificar todas las colonias de megacariocitos o distinguirlos de colonias de macrófagos. Como las colonias mas puras de megacariocitos contienen menos de 50 células, su número raramente interfiere significativamente con el conteo obtenido de UFC-M o UFC-GM. (11,13)

2.4.4.5 Colonias de blastos

Los progenitores que son capaces de dar un aumento muy grande en colonias ($>10^3$), no producirá una progenie madura hasta después de varias generaciones. En adición, la iniciación de su desarrollo puede ser lenta lo que es característico de más tipos de colonias. Por lo tanto, durante el período inicial de crecimiento de tales colonias, todas las células que ellas contienen van a ser encontradas con una morfología de blastos. Además, si estas células son recogidas y se colocan en medio fresco de metilcelulosa, generaran nuevas colonias con una alta frecuencia. Progenitores de tales colonias son general y relativamente infrecuentes en comparación a otro tipo de células, en la mayoría de los ensayos de rutina a menudo no son detectables. Colonias normales de blastos pueden, sin embargo, ser mas evidentes en preparaciones que son enriquecidas de células progenitoras muy primitivas. (11,13)



2.4.5 Factores que afectan la formación de colonias

2.4.5.1 Sobresembrado

Si demasiados progenitores son sembrados, en general el desarrollo de las colonias es inhibido. El resultado es una reducción principalmente en el tamaño final que las colonias alcanzan. Tales cultivos son difíciles de contar por que las colonias están muy juntas. Sin embargo, algunos progenitores pueden ser impedidos de generar progenie suficiente para constituir una colonia detectable. Colonias eritroides son particularmente sensibles a el número excesivo de colonias granulopoyéticas desarrolladas en el mismo cultivo ya que el pH del cultivo pueda caer por debajo de 7.0 por la acidificación del medio. La síntesis de hemoglobina es enormemente reducida cuando el pH del medio de cultivo es inferior a 7.0, y esto puede comprometer la identificación de colonias eritroides. En general, se deben obtener en 1 mL de volumen cultivado idealmente un aproximado de 50 colonias. Puesto que la frecuencia exacta de células no se sabe, es a menudo útil plantear cada análisis en diversas concentraciones de células. ⁽¹¹⁾

2.4.5.2 Inadecuada viscosidad

Si la concentración de metilcelulosa es demasiado baja, la viscosidad del cultivo no será adecuada para sustentar las células localizadas en colonias únicas. En este caso, ni siquiera el manejo controlado de la caja causa el rompimiento del *cluster* en fragmentos o serán separados como torrentes de células. Si esto ocurre, la identificación individual de colonias resulta imposible. Si, por otro lado, el medio de metilcelulosa es muy viscoso, el movimiento de las células es inhibido y también el desarrollo de las colonias. ⁽¹¹⁾



El resultado es que las colonias son de diferente tamaño, particularmente aquellas que contienen células eritroides son más difíciles de identificar y parecerá que la proporción de progenitores capaz de generar los distintos tipos de células es reducido. ⁽¹¹⁾

2.4.5.3 Colonias en el borde de la caja

Es importante recordar que un volumen desproporcionado del cultivo será ubicado exactamente al borde de la caja debido a la formación de un menisco. Cuidados extra son requeridos al visualizar las colonias contenidas en esta región. Esto implicaría un gran trabajo para enfocarlas correctamente. ⁽¹¹⁾

2.4.5.4 Cambios en la humedad

Un adecuado nivel de humedad, tanto en el medio como en la atmósfera, es imprescindible para el buen desarrollo de las células. Hay que prever el mantenimiento de estas condiciones en la incubadora de cultivo (37°C) proporcionando una fuente adecuada de agua que mantenga la humedad necesaria para el crecimiento de los cultivos y evitar así que se deshidrate el medio. Por otro lado el exceso de humedad puede impedir o afectar el crecimiento de las colonias ya que se afectaría la viscosidad del medio. ⁽²²⁾



2.4.5.5 Contaminación

Uno de los problemas más frecuentes en el cultivo es el de las contaminaciones. Las células en cultivo crecen lentamente, con tiempos de duplicación superiores en muchos casos a las 24 horas. Sin embargo, tanto las bacterias como las levaduras tienen una tasa de crecimiento superior. Los medios de cultivo proporcionan un medio ideal para el crecimiento de los contaminantes microbianos, y los procedimientos habituales de manipulación (apertura de recipientes, pipeteado, etc.) son susceptibles de provocar contaminación por bacterias y levaduras. Si se da el caso de una contaminación por estos organismos pueden impedir el conteo de las colonias o provocar la muerte del cultivo en poco tiempo. Para evitarlo se utilizan una serie de técnicas de trabajo que suponen la máxima asepsia, así como la esterilización del material y el trabajo en ambientes estériles (gabinete de bioseguridad). Asimismo se utilizan sustancias antimicrobianas y antifúngicas en el medio aunque en ocasiones no son suficientes para prevenir la aparición de dichos microorganismos. ⁽¹⁹⁾

2.4.6 Factores de crecimiento celular

Los factores de crecimiento hematopoyéticos son citocinas indispensables en el proceso de formación de las células sanguíneas influyendo en: ⁽¹⁵⁾

- supervivencia
- multiplicación
- diferenciación
- maduración



Hay varios tipos de factores de crecimiento los cuales son:

- Factores estimuladores de formación de colonias (FSC)
- Interleucinas (IL)
- Eritropoyetina (EPO)

2.4.6.1 Factores estimulantes de colonias

Los factores estimuladores de formación de colonias (FSC), pertenecientes a la familia de las glucoproteínas ácidas. Ejemplos: FSC-multi; FSC-GM (estimulador de la línea granulocito-macrófago); FSC-M (de la línea que conduce al monocito-macrófago); FSC-G (de la línea que desemboca en los granulocitos). ⁽¹⁴⁾

Los factores estimulantes de colonias son los siguientes:

2.4.6.1.1 Factor Estimulante de Colonias (FSC)

El factor estimulante de colonias (FSC) es una proteína, cuyo peso aproximado va de 30 a 45 kDa. Como su nombre lo indica, el FSC tiene efecto estimulante en las células progenitoras hematopoyéticas; que son las precursoras de las células sanguíneas e inmunológicas. Posee una capacidad para interactuar con otros factores de crecimiento, y con esto producir *in vitro* progenie, tanto mieloide como eritroide, como ocurre con IL-3, IL-6, IL-11, FSC-G y eritropoyetina. El FSC aumenta el tamaño y el número de grupos de eritrocitos, y su presencia es necesaria para el paso hacia unidades formadoras de colonias eritroides (UFC-E).

(14)



2.4.6.1.2 Factor Estimulador de Crecimiento de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (FSC-GM)

El Factor Estimulador de Crecimiento de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (FSC-GM) fue uno de los primeros factores de crecimiento hematopoyéticos en ser descrito y molecularmente clonado. Es una proteína glicosilada con un peso molecular aproximado de 23 KDa. El FSC-GM actúa como un potente factor de crecimiento tanto *in vitro* como *in vivo*, estimulando la proliferación y diferenciación de precursores mieloides y dando origen a granulocitos neutrófilos, eosinófilos y monocitos. Su principal célula blanco es una célula bipotencial que es la unidad formadora de colonias de granulocitos y macrófagos (UFC-GM), la cual da origen a células macrofágicas y granulocíticas. Cuando las CPH o líneas celulares dependientes de FSC-GM son cultivadas *in vitro* sin una fuente de FSC-GM, las células pierden viabilidad con un tiempo de vida media que varía de 6 a 24 horas. Además, el FSC-GM también muestra efectos aditivos sinérgicos con otros factores de crecimiento hematopoyéticos como FSC, IL-6, FSC-M Y FSC-G que permiten una completa diferenciación a células maduras. El FSC-GM puede comenzar la proliferación de las células precursoras eritroides tempranas BFU, las cuales después requieren eritropoyetina para su completa diferenciación. (14,16)

2.4.6.1.3 Factor Estimulante de Crecimiento de Colonias de Granulocitos (FSC-G)

El Factor Estimulante de Crecimiento de Colonias de Granulocitos es una proteína producida por linfocitos T y fagocitos mononucleares activados por interleucinas, factores de necrosis tumoral, endotoxinas bacterianas y células endoteliales vasculares. Esta diversidad en las fuentes celulares productoras del factor y su grado de glicosilación conducen a una variabilidad en su peso molecular que oscila alrededor de 23 KDa. Actúa junto con la IL-3 apoyando la proliferación de CPH. En progenitores mieloides baja la proliferación de linaje neutrofilo. (14, 16)



2.4.6.1.4 Factor Estimulante de Crecimiento de Colonias de Macrófagos (FSC-M)

La FSC-M, también conocida como FSC-1 o MGI-1M, promueve la sobrevivencia, proliferación y diferenciación de leucocitos de linaje monocito-macrófago y sus precursores. El FSC-M es producido por varios tipos de células normales pero principalmente por fibroblastos y células de cordón umbilical. ⁽¹⁴⁾

2.4.6.2 Interleucinas

Las interleucinas son un conjunto de glucoproteínas de bajo peso molecular que va desde 5 hasta 70 KDa que actúan como transmisores o mediadores de la comunicación intracelular en múltiples procesos fisiológicos, principalmente los relacionados con el crecimiento y la diferenciación celular. Representan el grupo más amplio y diverso de las citocinas. Hasta ahora han sido identificadas 16 clases diferentes ⁽¹⁵⁾

2.4.6.2.1 Interleucina IL-1

La IL-1 es un elemento muy importante para el mantenimiento de la homeostasis, primero, por el gran número de células sobre las que actúa y seguido, que se encuentra implicada en una amplia variedad de procesos metabólicos. Dentro de sus principales efectos dentro de la hematopoyesis que induce la producción de FSC-GM, FSC-G, FSC-M e IL-3 por células estromales de la médula ósea al estabilizar o inducir la síntesis de mRNA para estos factores; Sinergiza con IL-3, IL-6, FSC-G y FSC-M para regular la proliferación y diferenciación de células madre hasta colonias específicas de un linaje determinado; induce la expresión de factor de células madre; estimula directamente la producción de plaquetas. ^(14, 15)



2.4.6.2.2 Interleucina IL-2

La IL-2 es una glicoproteína de 15.5 kDa con una marcada hidrofobicidad, por medio de estas técnicas se ha determinado que un número limitado de células producen IL-2, entre ellas se pueden mencionar a los linfocitos T, a las células asesinas naturales, así como a las células tumorales *In vitro* se observa que la producción de IL-2 aumenta en presencia de mitógenos como PHA, esteres de forbol, ionoforos de calcio, anti CD28 (común en células T activas), análogos de diacilglicerol, IL-1, IL-7; que *in vivo* se incrementa durante el embarazo.

La IL-2 tiene un efecto sobre un amplio rango de células linfoides que expresan el receptor. Puede inducir la diferenciación de precursores de medula ósea con fenotipo CD34+ (15, 14)

2.4.6.2.3 Interleucina IL-3

Es una citocina inicialmente descrita con la capacidad de estimular la producción de células hematopoyéticas de múltiples linajes incluyendo neutrófilos, eosinófilos, monocitos, megacariocitos, células eritroides, basófilos y células B.

Pertenece a una gran familia de glicoproteínas de bajo peso molecular conocidas genéricamente como factores estimulantes de colonias (FSC). La IL-3 es una proteína heterogéneamente glicosilada, lo que ocasiona que existan moléculas con diferentes pesos moleculares dentro de los 15 a 25 KDa.

Aunque la IL-3 posee un amplio efecto sobre la proliferación, maduración y activación en células hematopoyéticas, cuando se combinan con otros factores como la IL-1, IL-6, FSC y FCS-G, que inciden principalmente en niveles tempranos de la hematopoyesis, provocando una elevada proliferación en CPH.



Sin embargo, este efecto sinérgico no es suficiente para inducir la maduración y diferenciación completa de esas células progenitoras multipotentes en células de linaje específico, ya que esto solo se logra cuando actúan otros factores hematopoyéticos que completan el proceso de diferenciación de linajes específicos, como el FSC-GM, IL-5, FSC-M y la Eritropoyetina. (14, 15)

2.4.6.2.4 Interleucina IL-4

Es un importante regulador del desarrollo de timocitos; *in vitro* potencializa la proliferación de BFU-E en presencia de la eritropoyetina, aumenta la formación de granulocitos en presencia de FSC-G. (14,15)

2.4.6.2.5 Interleucina IL-6

Es producida por una amplia variedad de células: células T, B, monocitos, fibroblastos, células estromales de médula ósea. Interviene estimulando la formación de colonias granulocitos-macrófagos y macrófagos. Es producido por células de médula ósea en cooperación con la IL-3, FSC-GM o FSC-G y junto con la FSC estimula la proliferación de progenitores. (14, 15)

2.4.6.2.6 Interleucina IL-7

Es un polipéptido de 17 aminoácidos con peso molecular aproximado a 17.4 kDa. La IL-7 es un factor con la capacidad de inducir *in vitro* la proliferación de células pre-B. (14, 15)



2.4.6.3 Eritropoyetina (EPO)

La Eritropoyetina o EPO es una hormona glicoproteica producida en la corteza renal. También ha sido aislada en el hígado, (sobre todo en fetos) cerebro y útero. La eritropoyetina actúa cuando se une a un receptor celular específico (EpoR).

La producción de eritropoyetina se estimula por la reducción de oxígeno en las arterias renales. La eritropoyetina producida en el riñón y la médula ósea estimula a las células madre de la médula ósea para que aumente la producción de eritrocitos o glóbulos rojos. (15,16)



3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Realizar la estandarización y validación de los cultivos clonogénicos como un método para asegurar la calidad hematopoyética de las unidades de SCU criopreservadas.

3.2 OBJETIVOS RELACIONADOS

- Implementar la técnica de cultivos clonogénicos dentro de la Unidad del Banco de Cordón del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea como prueba de rutina para las unidades que van a ser transplantadas.
- Realizar el análisis estadístico que permita conocer la variabilidad del método, estandarizarlo y utilizar los cultivos clonogénicos como una prueba viable para la determinación del potencial proliferativo de las células almacenadas.

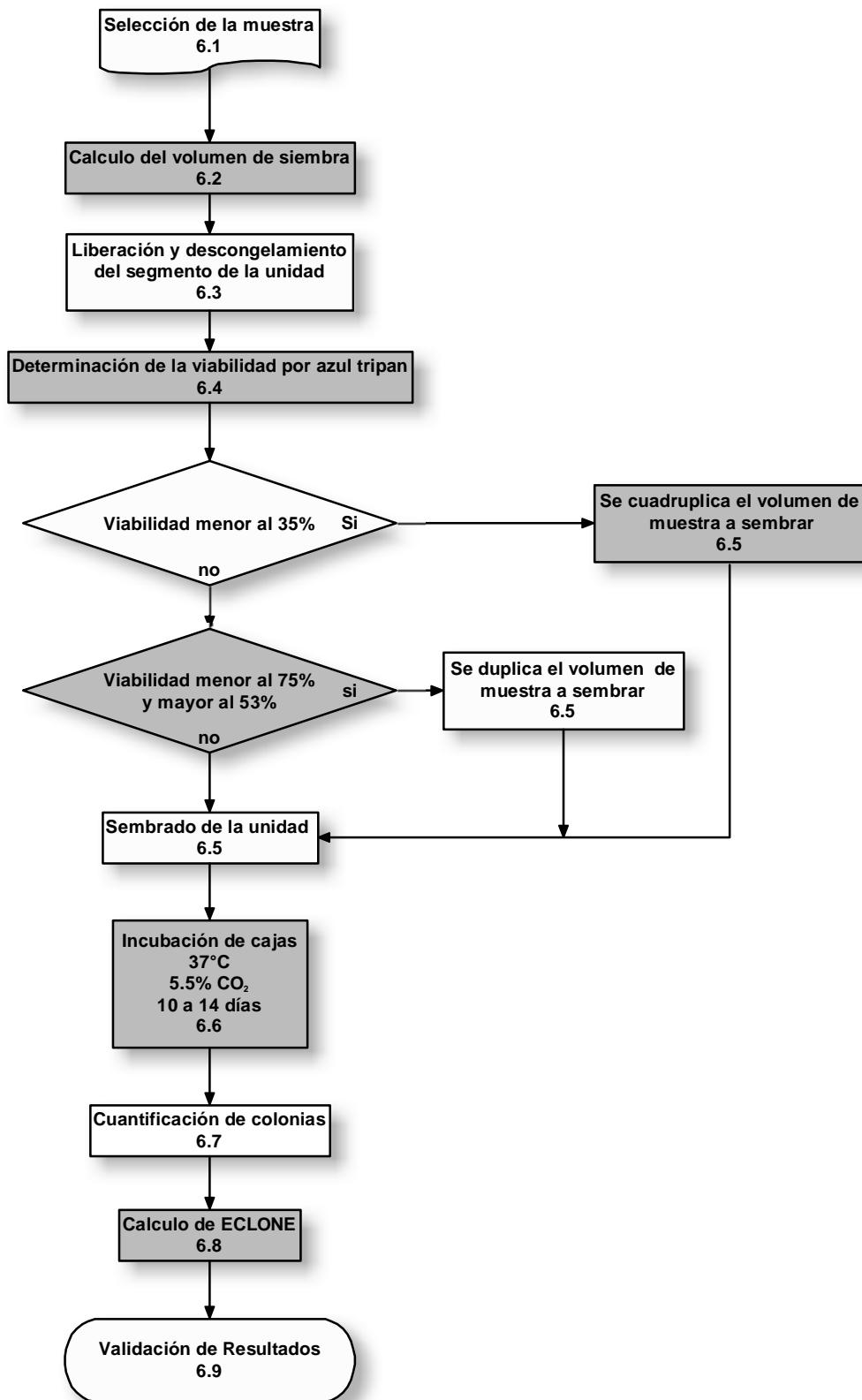


4. PLANTEAMIENTO DEL EXPERIMENTO

El propósito de este estudio fue usar los cultivos clonogénicos como una herramienta para evaluar el potencial proliferativo de las CPH después de ser sometidas al procedimiento de criopreservación y de esta forma garantizar la calidad de cada unidad antes de ser usada en un trasplante. Para lograr esto, se estandarizó la técnica seleccionando 4 unidades ya criopreservadas, con características similares y consideradas óptimas en caso de ser necesarias para un trasplante ya que cumplen con los estándares internacionales marcados por NETCORD-FACT. De cada unidad se tomaron alícuotas a fin de realizar 10 cultivos en metilcelulosa, manteniéndolos en incubación por 14 días a 37°C y 5.5% de CO₂, al término de este período se procedió a realizar la identificación y cuantificación de las colonias. Una vez realizada la estandarización, se aplicó la técnica como un método de validación de las unidades que serán usadas en trasplantes.



5. DIAGRAMA DE FLUJO





6. METODOLOGÍA

6.1 SELECCIÓN DE MUESTRAS

Para el desarrollo experimental se seleccionaron 10 unidades criopreservadas dentro del sistema bioarchivo (Thermogenesis). Todas estas unidades guardan características muy similares a fin de ser consideradas como óptimas para realizar un trasplante en caso de ser requeridas.

Estas características son:

- Un buen estado de salud de la madre como del bebé.
- Tiempo de gestación mayor a 34 semanas.
- Tiempo máximo desde la toma de muestra hasta el fin del proceso no mayor a 48 horas.
- Volumen de la muestra recolectada al momento del parto mayor 80 mL.
- Número de Células Nucleadas (CN) totales iniciales mayor a 8×10^8
- El porcentaje de recuperación de CN debe ser mayor al 60%.
- Resultados negativos para microbiología y serología.

6.2 CÁLCULO DEL VOLUMEN DE SIEMBRA

Una vez seleccionadas las unidades se procedió a la realización del cálculo del volumen de siembra, este cálculo se realiza a fin de tratar de obtener un mínimo de 50 colonias por cada caja para lo cual se toma en cuenta la concentración, la viabilidad celular y el porcentaje de células CD34+ en la muestra, estos valores ya habían sido determinados al momento de llevarse a cabo la criopreservación.

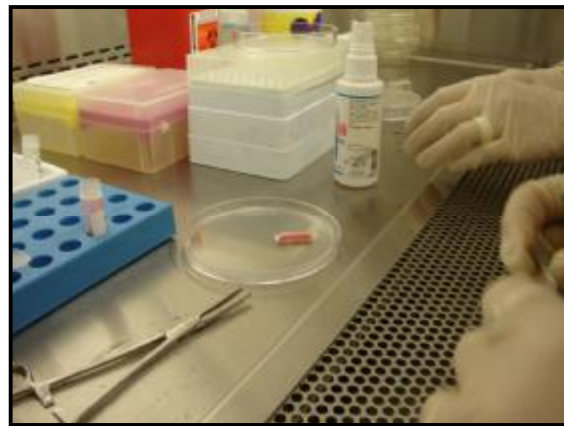


6.3 LIBERACIÓN Y DESCONGELAMIENTO DE LA UNIDAD

Una vez que la muestra fue seleccionada se le dió salida del sistema bioarchivo por medio del equipo de computo. Al salir se le colocó dentro de un contenedor con N₂ líquido. Se retiró el canister y la bolsa de cuarentena. Se procedió a cortar el segmento, el cual se colocó dentro de una caja de Petri y se llevó al gabinete de bioseguridad donde se desinfectó, descongeló y extrajo el contenido a un criotubo estéril.



A



B

Figura 3. **A** Liberación de la unidad
B Descongelamiento del
fragmento



6.4 Determinación de la viabilidad por azul tripano

La determinación de la viabilidad resulta importante a fin de garantizar que al realizar los cultivos exista un número abundante de células para poder observar una cantidad suficiente de colonias. Esta determinación se realiza usando azul de tripano, coloide que se introduce en el interior de las células que presentan alteración en su membrana. Por tanto una célula viva en perfecto estado se observará incolora mientras que una célula muerta o muy alterada se observará azul.

En el ensayo, para determinar la viabilidad de la muestra se utilizó el mismo volumen que se determino para realizar la siembra. Este volumen de muestra se colocó en un tubo eppendorf con 50 μ L de azul tripano. Se homogenizó y se observó al microscopio hasta contar 100 células y se determinó la viabilidad. En el caso de las unidades que presentaron una viabilidad entre el 70% y el 35% se sembró el doble del volumen calculado en la fórmula, y en el caso de unidades con viabilidad menor de 35% se sembró el cuádruplo del volumen calculado.

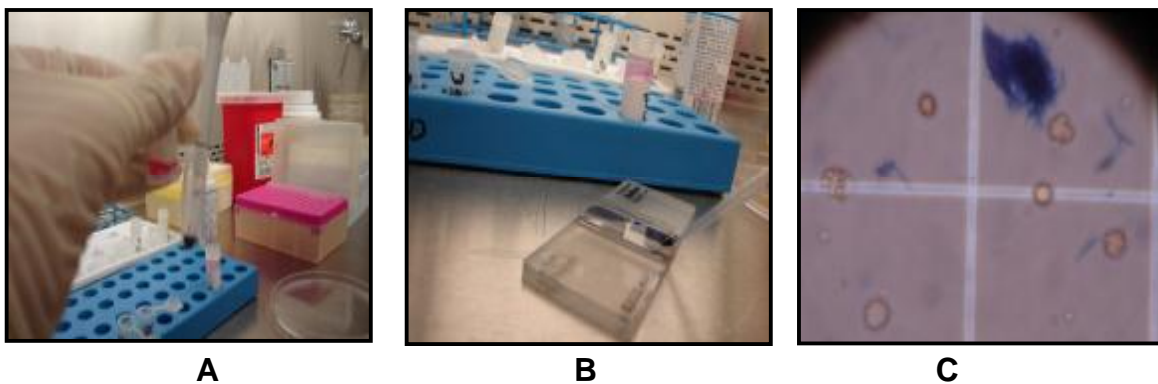
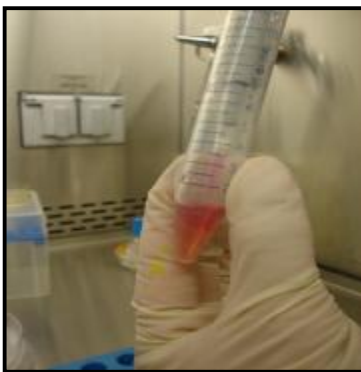


Figura 4. **A** Preparado de la muestra para determinar la viabilidad. **B** Llenado de la cámara de Neubauer. **C** Lectura bajo el microscopio



6.5 SEMBRADO DE LA UNIDAD

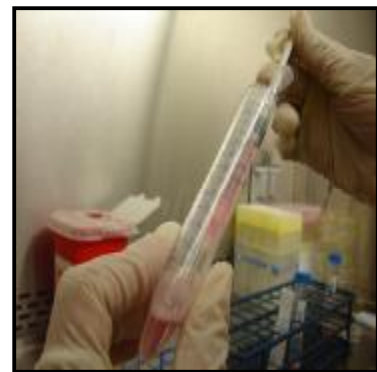
El medio de cultivo se preparó adicionando metilcelulosa (MethoCult) y medio de dulbecco modificado de iscove (IMDM), se colocó el volumen calculado de la muestra y se homogenizó todo el contenido. Se vació el medio preparado en una caja petri de 33 mm y además se colocó una caja de petri de las mismas dimensiones con 1 mL de agua inyectable para evitar que el medio se deshidratara. Las cajas petri se incubó a 37°C /5.5%CO₂ por 14 días.



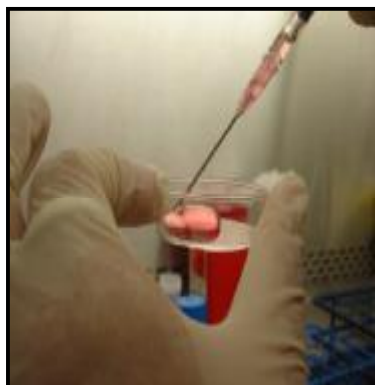
A



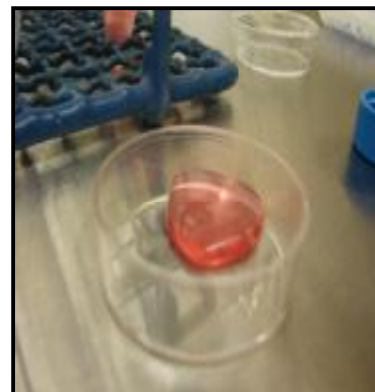
B



C



D



F

Figura 5. **A, B, C** Preparado del medio de cultivo con la muestra a sembrar. **D, F** Llenado de las cajas Petri.



6.5.1 Metilcelulosa (MethoCult)

Para la siembra de los cultivos clonogenicos se utilizó el kit de MCHC4434 de Stem Cells Thecnologies. Este kit consta de: metilcelulosa, suero bovino fetal, albúmina bovina, eritropoyetina, factores de crecimiento humano. Estos componentes permiten un crecimiento optimo para las colonias de granulocitos (CFU-GM), colonias de eritrocitos, (CFU-E) ; BFU-E y las colonias multi línea CFU-GEMM (CFU-Mix). Los componentes están en las concentraciones siguientes (según especificaciones del fabricante):

0-9% MC

30% FBS

1% BSA

3U/mL EPO

10^{-4} M 2-mercaptoetanol

2mM L-glutamina

50ng/mL rh SCF

10ng/mL rh GM-SFC

10ng/mL rh IL-3



6.5.2 IMDM (Medio de Dulbecco Modificado de Iscove)

El Medio de Dulbecco Modificado de Iscove (IMDM) es un medio estándar muy completo que incluye en su formulación albúmina bovina, vitaminas, aminoácidos, y sales. Esta combinación de componentes favorece el desarrollo de las células en el medio.

6.6 INCUBACIÓN DE LAS CAJAS

Una vez sembradas las cajas se colocaron dentro de una cámara de incubación a 37°C y con un 5.5% de CO₂, por un periodo de 14 días aproximadamente.



A



B

Figura 6.- **A** Cajas Petri en el interior de la incubadora. **B** Incubadora y microscopio de objetivos invertidos.



6.7 CUANTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS

Una vez que han trascurrieron 10 días de incubación, se inició el conteo, esto con el fin de lograr una mejor identificación debido a que en varios estadios del desarrollo de las colonias estas presentan características muy semejantes.

Antes de realizar el conteo de las UFC, se realizó un escrutinio de las cajas a fin de determinar que cada cultivo fuera valorable, para lo cual se determinó que:

- No existiera contaminación en la placa.
- No hubiera entrada de agua dentro de los cultivos.
- Crecimiento uniforme en toda la placa.
- No existiera exceso de crecimiento.
- La densidad de la metilcelulosa fuera adecuada.

Si la caja es valorable, es posible pasar a cuantificar el número de colonias: CFU-GM, BFU-E Y CFU-MIX.

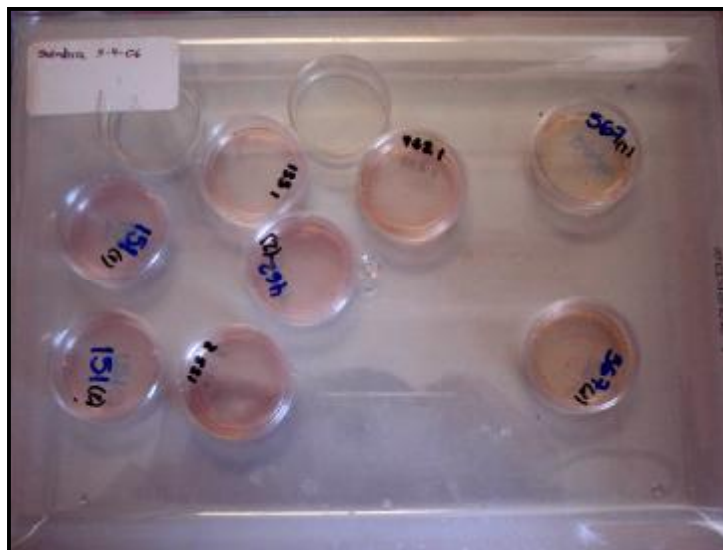


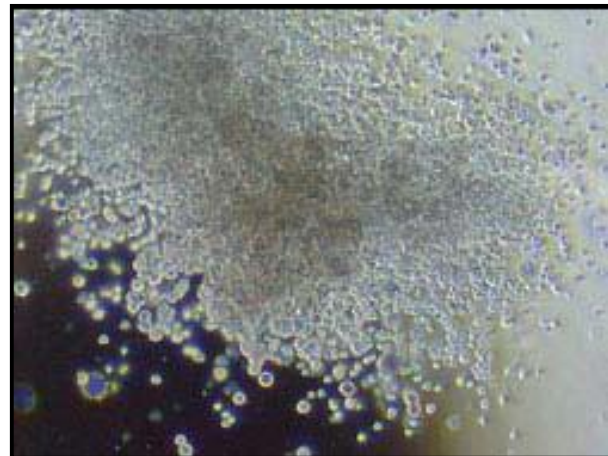
Figura 7. Cajas Petri listas para ser observadas al microscopio.



El conteo se realizó usando un microscopio de objetivos invertidos. Las características que se evaluaron para identificar las colonias fueron:

§ CFU-GM. Son colonias blancas, que presentan un centro más o menos compacto con una radiación periférica. Tienen como un mínimo, 50 células. Si el número es menor a 50 células, se denomina “cluster”. Si se presentaban más de una colonia en un mismo nivel, formando un conglomerado, se contó como una colonia única. Si estaban en diferentes niveles se contaron como individuales. En general, las colonias blancas que coinciden con la anterior definición son los neutrófilos y macrófagos, que sean bastante homogéneas, con un centro más denso y una periferia más laxa.

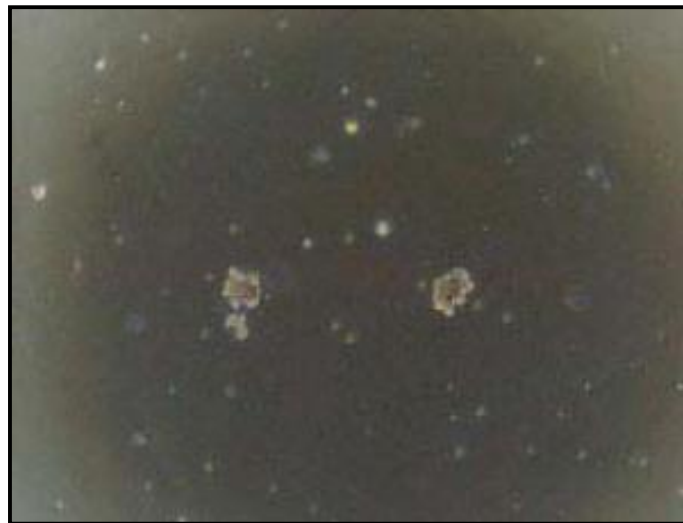
Figura 8. Colonia de granulocitos-macrófagos (125X)





- CFU-E: Son colonias formadas por una o dos agrupaciones. Contienen un máximo de 100 y 200 eritroblastos. Cada *cluster* tiene, como un mínimo, 8 eritroblastos. Los eritroblastos en cultivo con MC solo se distinguen cuando adquieren una coloración rojo-anaranjada, según sea el contenido en hemoglobina. Las CFU presentes en el cultivo estarán maduras al cabo de 10 a 12 días de cultivo. Después de lo cual, involucionan y se lisan. En esta investigación estas colonias no se cuantificaron.

Figura 9. Colonia de células eritroides (50X)



- BFU-E: Estas colonias son más inmaduras que las anteriores (CFU-E). Las BFU-E se definen como una colonia formada por 9 o más *clusters* que contienen, como mínimo, 500 células. Al día 14, a menudo estas células tienen una leve coloración roja. Ambas presentan *clusters* o clonas compactas que pueden crecer en diferentes niveles.

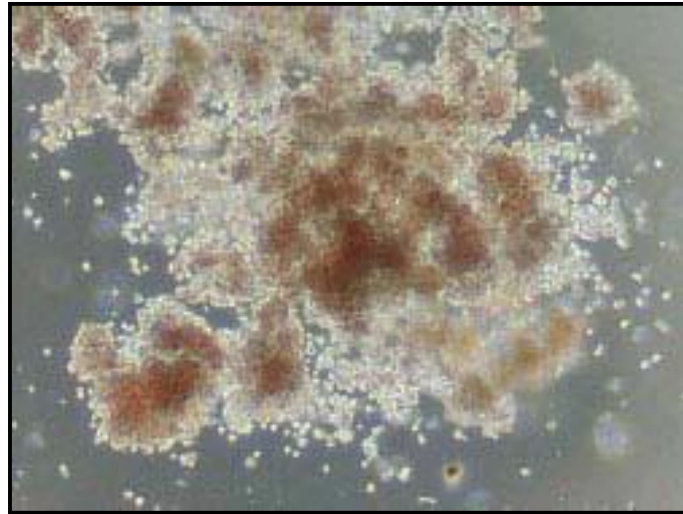
Figura 10. Colonia de brotes eritroides (125X)





- CFU-MIX: Son colonias multilinaje; se visualizaron siempre elementos de la línea eritroide y de la línea blanca para contabilizarlas como mixtas. Suelen ser multiclonias, dispersas en muchos casos, con una coloración no muy bien definida.

Figura 11. Colonia mixta
(125X)



6.8 CÁLCULO DE LA EFICIENCIA CLONOGENICA (E-clone)

E-clone es un parámetro que se mantiene constante después de una mínima manipulación durante el proceso de criopreservación y representa el potencial proliferativo de las CPH. La eficiencia clonogénica (E-clone) es el porcentaje de unidades formadoras de colonias desarrolladas respecto a la proporción de CD34+. De acuerdo al manual “El cultivo clonogénico como control en un laboratorio de terapia celular”, una ECLONE igual o superior al 6% indica que la unidad de sangre de cordón es “Aceptada” para realizar un trasplante, mientras que la que presenten un valor de ECLONE menor al 6% son “Excluidas” o descartadas para su uso.



6.9 VALIDACIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo con los lineamientos de la guía del EURACHEM para la validación de un método (ver sección de bibliografía) la validación de este método en base a su naturaleza corresponde a la evaluación de la Presición (repetibilidad y reproducibilidad).

6.9.1 Repetibilidad (r):

$$r = S_r \times \sqrt{2} \times t_{\infty}$$

$$r = S_r \times \sqrt{2} \times 1.96$$

$$r \leq | D |$$

Donde:

S_r = desviación estándar de los resultados entre los duplicados (entre las cajas de la misma muestra)

$| D |$ = valor de la diferencia absoluta entre el valor de los duplicados.

Interpretación:

Si el valor de repetibilidad (r) es menor o igual a la diferencia del valor absoluto de la diferencia de los duplicados, entonces existe repetibilidad entre los datos.

6.9.2 Reproducibilidad (R):

$$R = S_R \times \sqrt{2} \times t_{\infty}$$

$$R = S_R \times \sqrt{2} \times 1.96$$

$$R \leq | D |$$

Donde:

S_r = desviación estándar de todos los resultados.

$| D |$ = Rango = valor de la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de todos los resultados.



Interpretación:

Si el valor de reproducibilidad (R) es menor o igual a el rango, entonces existe reproducibilidad entre los datos.



7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

7.1 Eficiencia clonogénica.

Se estudiaron 4 muestras correspondientes a las unidades criopreservadas 203, 503, 517y 40; las cuales están reservadas para su uso en trasplante de CPH, de estas se realizaron 10 cultivos por cada una.

En la tabla No. 1 se muestran los resultados obtenidos del número y tipo de las unidades formadoras de colonias por unidad, así como los valores obtenidos de eficiencia clonogénica. Estos resultados fueron utilizados para la validación del método, como puede observarse, los valores de eficiencia clonogénica son variables, tanto mayores al 6% de E-clone como menores a dicho valor. Para realizar la validación se tomaron todos los valores ya que representan tanto a las unidades aceptadas como a las rechazadas para un transplante de células hematopoyéticas bajo el criterio marcado en el manual “El cultivo clonogénico como control en un laboratorio de terapia celular”.

Tabla No. 1 Resultados del número de UFC y Eficiencia Clonogénica.

Unidad	Caja	CFU-GM	BFU	CFU-MIX	Total UFC	ECLONE
203	1	27	16	24	67	20.74
	2	30	19	28	77	23.83
	3	21	23	30	74	22.90
	4	22	35	9	66	20.43
	5	29	41	16	86	26.62
	6	20	8	21	49	15.17
	7	33	28	20	81	25.07
	8	22	15	26	63	19.50
	9	31	23	22	76	23.52
	10	29	19	32	80	24.76
503	1	7	8	7	22	11.07
	2	9	8	2	19	9.56
	3	6	10	3	19	9.56
	4	6	6	5	17	8.55
	5	10	14	2	26	13.08
	6	3	11	4	18	9.06
	7	5	1	2	8	4.03
	8	6	12	5	23	11.57
	9	10	12	3	25	12.58
	10	1	6	1	8	4.03
517	1	0	0	0	0	0.00
	2	0	1	0	1	0.26
	3	0	0	0	0	0.00
	4	0	0	1	1	0.26
	5	0	0	0	0	0.00
	6	0	0	0	0	0.00
	7	0	2	0	2	0.51
	8	0	1	0	1	0.26
	9	0	0	0	0	0.00
	10	0	2	0	2	0.51
40	1	1	6	0	7	5.11
	2	0	1	0	1	0.73
	3	0	1	5	6	4.38
	4	0	4	1	5	3.65
	5	1	0	1	2	1.46
	6	1	1	0	2	1.46
	7	0	3	1	4	2.92
	8	0	3	0	3	2.19
	9	0	1	0	1	0.73
	10	0	4	0	4	2.92



7.2 Validación del método.

Tabla No. 2 Precisión del método (repetibilidad y reproducibilidad)

REPETIBILIDAD				
Muestra	203	503	517	40
Rango	11.45	9.06	0.51	4.38
S	3.35	3.16	0.21	1.51
Media	22.25	9.31	0.18	2.55
r	6.64	6.25	0.42	2.99
Decisión	Repetible	Repetible	Repetible	Repetible
REPRODUCIBILIDAD				
S	9.40			
Media	8.57			
Rango	22.07			
R	18.61			
Decisión	REPRODUCIBLE			

En la tabla No. 2 se muestran los resultados de repetibilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos para la validación del método. Para ambos casos los resultados demuestran que la técnica es tanto repetible como reproducible, es decir, el método es preciso.

Con estos valores se estableció una variación promedio de 2.06 para el método y se calcularon límites de variabilidad con los cuales se elaboró una gráfica control. Con esta grafica se podrá observar la variabilidad de los resultados de unidades estudiadas posteriormente. Se tomaron los valores de desviación estándar ya que se esta analizando la variabilidad del método y no los resultados de eficiencia clonogénica.

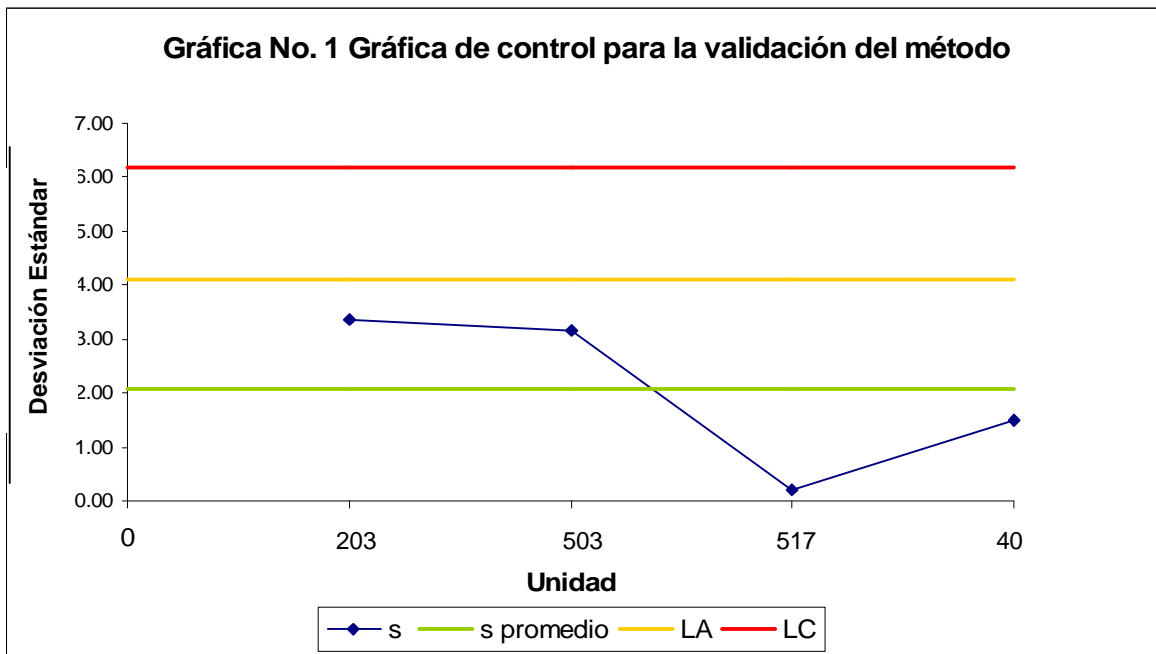
Tabla No. 3 Límites de variabilidad para la Gráfica No. 1

Límites de variabilidad		
S promedio	Desvest promedio	2.06
Límite de Alerta (LA)	2 * Desvest	4.17
Límite de Control (LC)	3 * Desvest	6.17

Desvest = Desviación estándar



Gráfica No. 1 Gráfica de control para la validación del método



S= desviación estándar

S promedio= desviación estándar promedio de las 4 unidades y sus 10 repeticiones.

LA= Límite de Alarma

LC = Límite de control

Como se puede observar en la Gráfica No. 1 los valores que caen por debajo del límite de desviación estándar promedio (S promedio) indican una baja variabilidad y por lo tanto son valores de alta precisión, los valores que se encuentran por debajo del límite de alerta (LA) y por arriba de la S promedio, indican que se tiene un buen control de todo el sistema del método, los valores que se encuentren fuera del límite de control (LC) indican que diversos factores influyeron en los resultados provocando una alta variabilidad con respecto a la S promedio, si solo se encuentra un punto o algunos puntos dispersos fuera de este límite fue debido a un error aleatorio, sin embargo si son varios y continuos los puntos que se encuentran fuera de este control se demuestra que es un factor constante el que esta influyendo sobre la técnica. Se espera que las unidades posteriormente analizadas dentro de una gráfica con estos límites, den una variación cercana a la S promedio.



7.3 Validación de las unidades

Para la validación del método se seleccionaron 18 unidades de CPH almacenadas en el Banco de Sangre de Cordón Umbilical del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea para realizarles cultivos clonogénicos en un fragmento representativo del mismo. Las unidades se fueron seleccionando conforme el centro de transplante las reservaba para su uso en pacientes.

En la Tabla No. 4 se presentan los resultados obtenidos en las 18 unidades analizadas, en cada una se realizó la siembra de los cultivos por duplicado. Se muestran los valores de E-clone así como la desviación estándar de dichos resultados.

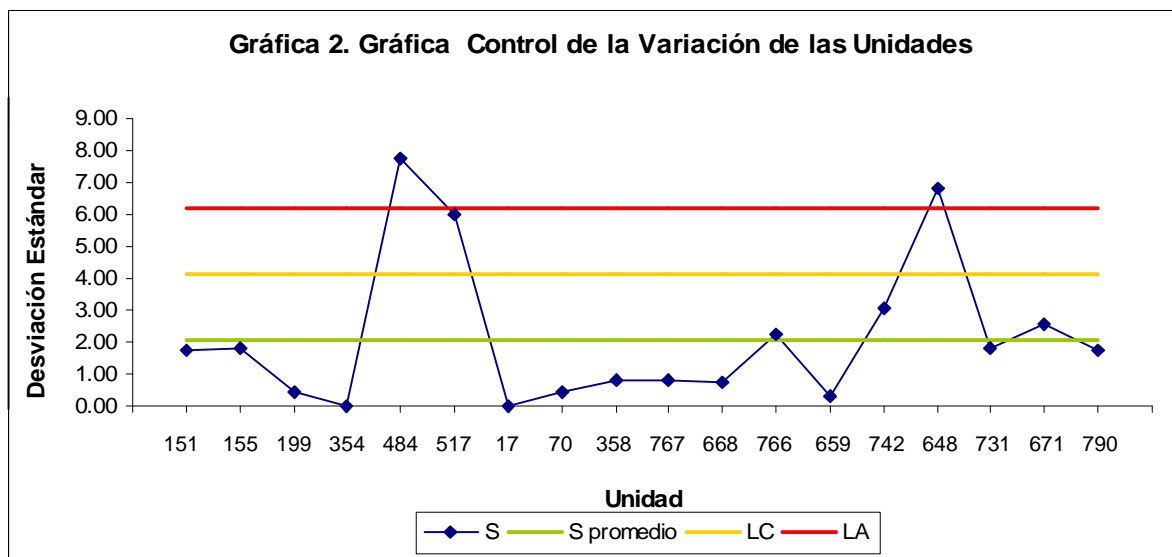


Tabla No. 4 Resultados de UFC y E-clone de las unidades por duplicado.

Unidad	Caja	UFC-GM	BFU-E	UFC-MIX	Total UFC	ECLONE*	Media*	S*
151	1	14	0	8	22	13.55	12.32	1.74
	2	13	0	5	18	11.09		
155	1	13	7	8	28	18.00	19.29	1.82
	2	15	8	9	32	20.58		
199	1	20	0	7	27	16.9	17.21	0.45
	2	16	0	12	28	17.5		
354	1	2	0	0	2	0.56	0.56	0
	2	2	0	0	2	0.56		
484	1	30	10	21	61	27.89	33.38	7.76
	2	36	31	18	85	38.87		
517	1	32	15	20	67	17.19	12.95	5.99
	2	14	3	17	34	8.72		
17	1	14	5	14	33	15.00	15.00	0
	2	16	1	16	33	15.00		
70	1	9	6	6	21	13.43	13.76	0.44
	2	12	2	8	22	14.07		
358	1	23	8	19	50	14.76	14.17	0.83
	2	21	2	23	46	13.58		
767	1	23	7	15	45	26.10	26.68	0.82
	2	19	2	26	47	27.26		
668	1	20	10	13	43	23.42	23.97	0.77
	2	25	4	16	45	24.51		
766	1	23	6	18	47	24.59	23.02	2.22
	2	23	2	16	45	21.45		
659	1	37	5	23	65	29.40	29.17	0.32
	2	40	0	24	64	28.94		
742	1	28	1	19	48	23.05	25.21	3.06
	2	31	3	23	57	27.37		
648	1	26	7	13	46	27.59	32.39	6.79
	2	31	4	28	62	37.19		
731	1	14	1	7	22	9.42	10.71	1.82
	2	18	1	9	28	11.99		
671	1	18	1	22	41	13.46	11.65	2.55
	2	28	2	10	40	9.85		
790	1	31	5	18	54	26.60	25.37	1.74
	2	33	1	15	49	24.14		



Gráfica No. 2 Gráfica Control de la variación de las unidades



S= desviación estándar

*S promedio= desviación estándar promedio de las 4 unidades y sus 10 repeticiones.

*LA= 2 veces la desviación estándar promedio= Límite de Alarma

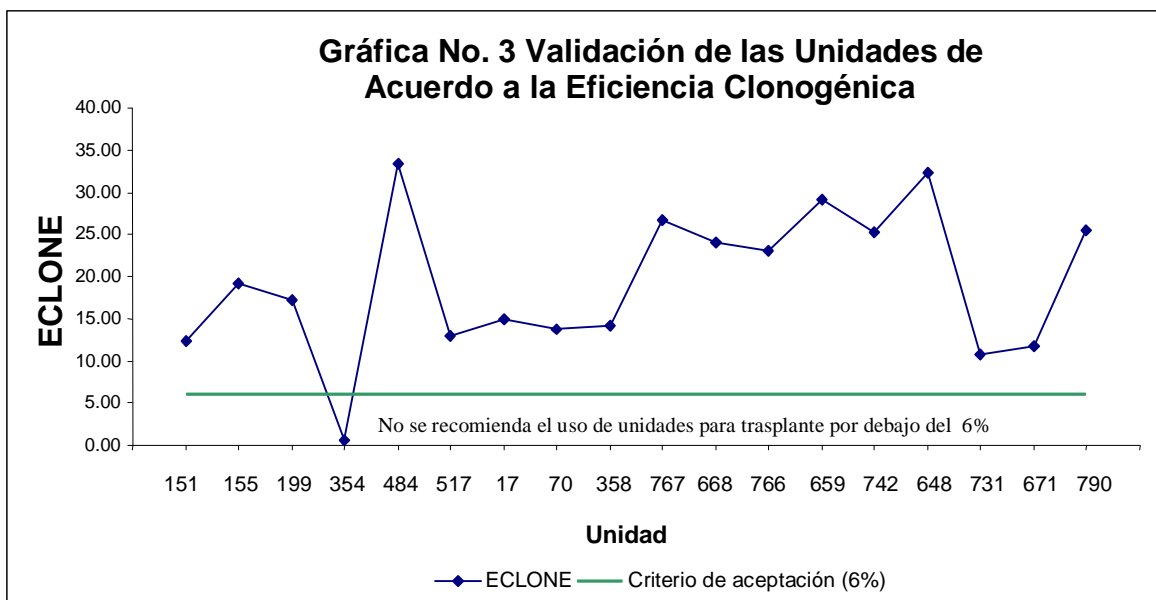
*LC= 3 veces la desviación estándar promedio= Límite de Control

* Valores tomados de la validación del método

Con estos resultados de la tabla No. 4 y con los límites de variación obtenidos en la misma tabla y la Gráfica No. 1 se elaboró una Gráfica con las anteriores unidades empleando la desviación estándar (Gráfica No. 2). En la cual se puede observar 12 unidades por debajo del Límite de S promedio, 3 unidades por debajo del Límite de Alerta, 1 unidad por debajo de Límite de Control y 2 unidades fuera del Límite de Control. Esta gráfica demuestra que el sistema de análisis está bajo control, ya que la mayoría de las unidades están cercanas a la S promedio y las dos unidades que se encuentran por arriba del Límite de Control y que no se presentan en forma continua se provocaron por factores aleatorios.



Gráfica No. 3 Validación de las unidades de acuerdo a la eficiencia clonogénica



Usando los valores de eficiencia clonogénica mostrados en la tabla No. 4, se realizó una gráfica para la validación de las unidades (Gráfica No. 3) tomando en cuenta un valor del %6 de E-clone mencionado en el manual “El cultivo clonogénico como control en un laboratorio de terapia celular” para aceptar o rechazar una unidad cuando se desea trasplantarla. Como se puede observar, de las 18 unidades solo una está por debajo de este criterio, la unidad 354, lo que indica que es una unidad no apta para su uso en un trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, por lo tanto se descarta su uso para este fin. Dado a que previamente se validó el método se demostró que este tiene precisión y por lo tanto los resultados son confiables, con lo cual se afirma que el método se encuentra ESTANDARIZADO



8. CONCLUSIONES.

- Se validó el método realizando un análisis estadístico, determinando que es repetible y reproducible, lo que refleja que es PRECISO.
- Usando estos resultados estadísticos se estableció la variación del método con una desviación estándar promedio de 2.06 y se calcularon límites de control (límite de alarma = 4.12; límite de control = 6.17).
- El comportamiento de las unidades posteriormente analizadas, muestran un comportamiento estable del método, ya que la mayoría de los valores de variación se mantienen cercanos a la S promedio, en base a esto se puede afirmar que el método esta ESTANDARIZADO.
- Una vez validado el método, se deben utilizar los resultados de E-clone para aceptar o rechazar el uso de una unidad para un posible trasplante, debido a que se cuenta con el soporte estadístico de que dichos resultados son confiables.



- Los cultivos clonogénicos resultan ser una herramienta de vital importancia. Gracias a ellos se puede garantizar que las células que serán usadas en un trasplante de CPH tienen un potencial proliferativo suficiente y así producir todos los distintos linajes de células sanguíneas para reconstituir la función hematopoyética del paciente, el cual, ha sido sometido a terapias para eliminar las células de su médula ósea y que por lo tanto su vida depende de las CPH que le serán transplantadas.
- Los cultivos clonogénicos, por lo tanto, se consideran un punto crítico de control para decidir si se emplea o no una unidad criopreservada y de esta forma no comprometer una vida humana, minimizando los riesgos inherentes al trasplante de las CPH.
- Se logró estandarizar, validar e implementar los cultivos clonogénicos dentro de la unidad del Banco de Cordón Umbilical del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea como prueba de rutina para validar las unidades de Sangre de Cordón Umbilical que serán transplantadas.



9. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Martínez M. C., Bautista J. J. **El banco de células Hematopoyéticas de Cordón Umbilical**, Revista de Hematología, Vol. 4. No. 2. 2003, pp 87-90
- 2.- Mayani V. H. **Las múltiples facetas en la investigación de la salud**, caracterización y expansión *in vitro* de las células hematopoyéticas humanas presentes en la sangre de cordón umbilical, Capitulo 2, México, 2005, ISBN 0-521-54380-0
- 3.- Mayani H., Alvarado-Moreno A., Flores-Guzmán P., **Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation**. Archives of Medical Reseach, 34(2003)476-488
- 4.- Quesenberry, P. **Williams hematology**. Hematopoietic stem cells, progenitor cells and cytokines. Chapter 14. Ed Mc Graw Hill, 6° Edición, 2001. ISBN 0-07-116293-3
- 5.- Ruiz A. G. **Fundamentos de Hematología**, Hematopoyesis, Capitulo 1, Ed Panamericana, 3° edición, México, 1995. ISBN 84-7903-838-1
- 6.- Segel George. **Williams Hematology**, Hematology of The Newborn, Chapter 7, Ed Mc Graw Hill, 6° Edición, 2001. ISBN 0-07-116293-3
- 7.-Pérez M. **Factores maternos y neonatales que influyen en una buena recuperación de células progenitoras hematopoyéticas procedentes de sangre de cordón umbilical en mujeres mexicanas**, Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México, 2004, pp 34-37



- 8.- Miñana Ma. **Clonación y Trasplantes**, Sangre de cordón umbilical como fuente de células madre hematopoyéticas para trasplante, Capitulo 6, España, 2000, ISBN 3-12517959-9
- 9.- Querol S., *et-al*, **La sangre de cordón umbilical, una nueva fuente de progenitores hematopoyéticos para trasplante. análisis de nuestra experiencia en la recolección y procesamiento**, Progresos de Obstetricia y Ginecología, Vol 39, Numero 8, Octubre 1996.
- 10.- Eaves C., **Atlas of human hematopoietic colonies**, Published by StemCell Technologies Inc., 1995
- 11.- Technical Bulletin, MethoCult™ for Rat Hematopoietic Colony Assays, Stem Cells Technologies
- 12.- Technical Manual. **Human colony-forming cells assay using MethocultÒ**. Stem Cells Technologies
- 13.- Soto C. I. **Las citocinas en la hematopoyesis y el sistema inmunológico: mecanismos celulares y moleculares**. Plaza y Valdés Editores. México D.F. pp 39-221, 1999, ISBN 968-36-5171-2
- 14.- Garcia Tamayo F. **Fundamentos de inmunología**, Las citocinas, Capitulo 10, Universidad Nacional Autónoma de México, Dirección General de Publicaciones, México, 1997, ISBN 968-36-5171-2
- 15.- Bociek G., Armitage J. O., **Hematopoietic grow factors**, California cancer journal clinical, 1996, 46, 165-184



- 16.- Carlos Martínez-Murillo. **El banco de células madre hematopoyéticas de cordón umbilical para trasplante**, Gaceta Médica de México, Volumen 139, Suplemento 3, Septiembre-Octubre, 2003, pp 93-95
- 17.- Sergi Querol **Indicadores de calidad en el banco de cordón** Gaceta Médica de México, Volumen 139, Suplemento 3, Septiembre-Octubre, 2003, pp 98-101
- 18.- Madigan M., Brook P., **Biología de los microorganismos**, Ed. Prentice Hall, Madrid, 2004., pp 14-16, ISBNn84-89660-36-0
- 19.- Moore M., **Umbilical cord blood: an expandable resource**, The journal of clinical investigation, April, 2000, Volumen 105, Number 7, pag 855-856
- 20.- Chaiperson. **Cord blood banking for potential future transplantation: subject review**, Pediatrics 1999, 104, 116-118
- 21.- <http://www.qb.fcen.uba.ar/microinmuno/SeminarioMedios.htm>
- 22.- Bievre P. **The fitness for porpouse of analytical methods. A laboratory guide to method validationand related topics**. Eurachem Secretariats. 1998
- 23.- Wayne W. D. **Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud**, Capitulo 6, Pruebas de hipótesis, Limusa Noriega Editores, Tercera Edición. México. 1987, ISBN 968-419-982-1
- 24.- Molofsky A., Pardal R., Morrison S., **Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal**. Current Opinion in Cell Biology, 16:700-707, 2004
- 25.- Nieto., **Principios universales en hematología**, Ed Cronolab, México, 2004, pp 10-15, ISBN 3-905337-60-6