



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"
DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA

**EFEECTO DE LA CRIOPRESERVACION SOBRE LA CAPACIDAD
CLONOGÉNICA EN CÉLULAS PROGENITORAS
HEMATOPOYÉTICAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL.**

TESIS DE POSTGRADO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
PATOLOGIA CLINICA

PRESENTA:
DRA. LINA IVETTE MEDINA ORTIZ

ASESOR
DR. GAMALIEL BENITEZ ARVIZU

MÉXICO, D.F. 2008



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.

DR. JOSE LUIS MATAMOROS TAPIA
JEFE DE LA DIVISIÓN DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN MÉDICA.
HOSPITAL GENERAL CMN “LA RAZA”

DRA. NOEMI PATRICIA CASTILLO TORRES
TITULAR DEL CURSO DE LA ESPECIALIDAD DE
PATOLOGÍA CLÍNICA
JEFE DE LA DIVISIÓN DE AUXILIARES DIAGNOSTICOS
HOSPITAL DE CARDIOLOGIA CMN SIGLO XXI

DRA. MA. GUADALUPE CARRILLO MONTES
PROFESOR ADJUNTO DEL CURSO DE LA ESPECIALIDAD DE
PATOLOGÍA CLÍNICA CMN LA RAZA
JEFE DE LABORATORIO CLINICO HGO No. 3

DR. GAMALIEL BENITEZ ARVIZU
ASESOR DE TESIS
MEDICO PATOLOGO CLINICO
BANCO CENTRAL DE SANGRE CMN “LA RAZA”

"La ciencia es la progresiva aproximación del hombre al mundo real."

Max Planck

Gracias a todos y cada uno de los que ha compartido

algún momento conmigo:

A todos mis maestros por sus grandes enseñanzas.

A mis papá, digno ejemplo a seguir y que siempre estará en mi corazón.

A mi mamá por su paciencia, apoyo y amor incondicional.

A Mary, Vero y Emilio porque siempre están conmigo.

A Leo, a la nena aun sin nombre y a los que vendrán

que serán un motivo y deseo de superación.

A mis compañeros por su amistad.

A Edgar por su amor.

Al Sr. Wallace y a Miss Mary por su creación.

Al Dr. Gamaliel por su asesoría y amistad en este camino.

Y a todos los que han participado en mi formación personal y

profesional y me han ayudado a ser lo que soy.

Gracias!!

CONTENIDO

I.	Resumen.....	6
II.	Introducción.....	8
III.	Justificación.....	11
IV.	Planteamiento del problema.....	12
V.	Objetivo general.....	13
VI.	Objetivos específicos.....	14
VII.	Material y métodos.....	15
VIII.	Resultado.....	17
IX.	Discusión.....	18
X.	Conclusiones.....	20
XI.	Bibliografía.....	21

I. RESUMEN

TITULO: EFECTO DE LA CRIOPRESERVACION SOBRE LA CAPACIDAD CLONOGÉNICA EN CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL.

La sangre de cordón umbilical (SCU) es sumamente rica en células progenitoras hematopoyéticas o bien, células madre, las cuales tiene un potencial de proliferación muy amplio. Después de múltiples estudios sabemos que recolectando y preservando esas células tenemos la posibilidad de utilizarlas en el tratamiento de una amplia variedad de patologías. La criopreservación en nitrógeno líquido es el método de elección para el almacenamiento de unidades de sangre de cordón umbilical. El procedimiento preserva la integridad celular pero es posible que impacte en su capacidad clonogénica.

Objetivos: Observar el efecto de la criopreservación sobre la capacidad clonogénica en células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical.

Material y métodos: Se trata de un estudio retrospectivo y observacional. Se revisó de manera retrospectiva el registro de los cultivos de 17 unidades de sangre de cordón umbilical utilizadas para trasplante, antes de la criopreservación así como los cultivos posteriores al descongelamiento de las unidades.

Resultados: El efecto de la criopreservación fue estadísticamente significativo con disminución para la serie mieloide (CFU-GM) con una p de 0.027 y de incremento para

la serie eritroide (CFU-E) con una p de 0.027 . No se encuentra efecto estadísticamente significativo para otros linajes celulares.

Conclusiones: El efecto de la criopreservación fue estadísticamente significativo con disminución para la serie mieloide y de incremento para la serie eritroide. No se encuentra efecto estadísticamente significativo para otros linajes celulares.

Consideramos es necesario aumentar el número de estas mediciones, ya que el tamaño de nuestra muestra es pequeño por lo que deberá corroborarse esta tendencia conforme aumente la experiencia en este tema ya que un aspecto de mayor interés con implicaciones clínicas y motivo de otro estudio, es el efecto que los resultados pudieran tener sobre el éxito o fracaso del injerto.

II. INTRODUCCION

Las células progenitoras hematopoyéticas (CPH), también denominadas células madre o células tallo son células con un potencial de proliferación muy amplio, a la vez que tienen una capacidad multipotencial, es decir, tiene la capacidad de originar a células sanguíneas de los tres linajes: mieloide, eritroide y linfoide. ⁽¹⁾

La necesidad de buscar fuentes para obtener CPH diferentes a la médula ósea ha llevado al desarrollo de numerosas investigaciones, entre ellos, Broxmeyer y colaboradores quienes demostraron en la década de los 80 la presencia de células madre hematopoyéticas en la sangre del cordón umbilical. ⁽²⁾

Los estudios realizados en 1993 por Mayani ⁽³⁾ y Piacibello ⁽⁴⁾ demuestran que la sangre de cordón umbilical contiene una elevada cantidad de células progenitoras hemopoyéticas circulantes desde la semana 14 de embarazo, con un mayor potencial para formar colonias de granulocitos, eritroides, monocitos y megacariocitos in vitro que la sangre periférica de adultos. ⁽⁵⁾ (La frecuencia de progenitores clonogénicos en sangre de cordón umbilical es del 0,1% al 0,5% de las células mononucleares (MNC), mientras que en la sangre periférica de adultos es del 0,001% al 0,025% de las células MNC.) ⁽⁶⁾ Esta condición es permanente hasta el momento del parto en que su número es condicionado a ciertas condiciones ginecoobstétricas, ^(7,8) estas células tienen la capacidad de repoblación medular a largo plazo. Como consecuencia, dicho tejido se ha convertido en alternativa para trasplante, ⁽⁹⁾ ya que hoy sabemos que recolectando y criopreservando estas CPH tenemos la posibilidad de utilizarlas en el tratamiento de una amplia variedad de patologías tales como leucemias agudas y crónicas, anemia

aplásica severa, hemoglobinopatías y déficits inmunológicos congénitos, entre otros.^(10,11)

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas, este no es un proceso exento de problemas ya que puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas las cuales pueden alterar las membranas celulares, los organelos y la delicada interacción célula-célula inherente en las células y tejidos a criopreservar en la mayoría de los casos.⁽¹²⁾

Un adecuado proceso de criopreservación es dependiente del conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de la célula y o el tejido, puesto que este proceso está afectado por diferentes variables como especie, tipo y estadio de la célula a congelar.⁽¹³⁾

Bioquímicamente es posible distinguir tres tipos de crioprotectores, los alcoholes (metanol, etanol, propanol, 1-2 propanediol y glicerol), azúcares (glucosa, lactosa, sucrosa, sacarosa) y el dimetil sulfóxido, los crioprotectores pueden clasificarse también en agentes penetrantes y no penetrantes de acuerdo a la permeabilidad celular.^(14,15)

Los crioprotectores penetrantes son de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular. Son utilizados: el glicerol, el dimetilsulfoxido (DMSO) y propanediol (PROH).

El dimetil sulfóxido es un solvente bipolar hidrosoluble, de bajo peso molecular; desde el descubrimiento de sus propiedades crioprotectoras por Lovelock en 1959.⁽¹⁶⁾ Su

acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana, su bajo peso molecular permite la entrada rápida través de la membrana celular, modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos, así como también afecta los procesos de solvatación de agua. Se han sugerido las interacciones electrostáticas de DMSO con fosfolípidos lo cual parece ser crítico para la crioprotección de la membrana.

Los métodos de criopreservación podemos clasificarlos de acuerdo a la velocidad de congelamiento y descongelamiento en protocolos de congelación lenta-descongelación lenta, congelación lenta-descongelación rápida en las cuales la adición del crioprotector suele hacerse por pasos el descenso de la temperatura se realiza lentamente en un congelador programable. La descongelación rápida se hace rápidamente a temperatura ambiente o en un baño de agua a 30°C para evitar la recristalización. La congelación ultrarrápida fue originalmente descrita para la congelación de embriones, por Trouson en 1986. Implica la rápida deshidratación celular, utilizando altas concentraciones de crioprotector, usualmente DMSO y sacarosa, seguida de inmersión en nitrógeno líquido. Según recientes investigaciones en criobiología, el almacenaje en nitrógeno líquido es el método de criopreservación más adecuado para la conservación funcional de unidades de sangre de cordón umbilical (SCU) para fines de trasplante. ^(18,19) El procedimiento —dependiendo del buen manejo de la unidad— tiende a preservar mayormente la viabilidad celular de las CPH, no obstante es posible que impacte en su capacidad proliferativa ^(20,21,22).

III JUSTIFICACION

Para poder garantizar unidades de SCU poscongelación con un número adecuado de células progenitoras hematopoyéticas es necesario conocer el efecto de la criopreservación sobre la capacidad clonogénica en ellas.

IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuáles son los efectos de la criopreservación sobre la capacidad clonogénica en células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical. ?

V. OBJETIVO GENERAL

Observar el efecto de la criopreservación sobre la capacidad clonogénica en células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical.

VI. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Observar el efecto de la criopreservación en células progenitoras hematopoyéticas en base al número de unidades formadoras de colonias granulocíticas (CFU-G).
2. Observar el efecto de la criopreservación en células progenitoras hematopoyéticas en base al número de unidades formadoras de colonias monocíticas (CFU-M).
3. Observar el efecto de la criopreservación en células progenitoras hematopoyéticas en base al número de unidades formadoras de colonias granulomonocíticas (CFU-GM).
4. Observar el efecto de la criopreservación en células progenitoras hematopoyéticas en base al número de unidades formadoras de colonias eritroides tempranas y tardías (BFU-E y CFU-E).
5. Observar el efecto de la criopreservación en células progenitoras hematopoyéticas en base al número de unidades formadoras de colonias mixtas (CFU-MIX).
6. Observar el efecto de la criopreservación en células progenitoras hematopoyéticas en base al número de unidades formadoras de colonias de células hematopoyéticas pluripotenciales (HPP-CFC).

VII. MATERIAL Y METODOS

Se trata de un estudio descriptivo y retrospectivo llevado a cabo en el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional la Raza (BCS CMNR). Las unidades utilizadas son las ya recolectadas de febrero de 2006 hasta febrero del 2008 y que han sido descongeladas y reconstituidas para utilizar en trasplante de acuerdo al manual de procedimiento clave 2430-003- 006 del IMSS.

Se estudiaron 17 unidades de SCU utilizadas para trasplante y obtenidas por donación altruista, previo a su almacenaje en bioarchivo, se realizó en gabinete de seguridad biológica tipo II-A, el cultivo de 100,000 células MNC de las unidades de SCU en un medio semisólido hecho a base de metilcelulosa adicionado con factores de crecimiento celular (SCF, GM-CSF, IL3, Epo). Los cultivos se mantuvieron por 28 días en incubadoras a 37°C, con una atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad. La cuantificación se realizó al microscopio invertido con objetivo 10x, cuantificando el número de unidades formadoras de colonias desarrolladas esto es: granulocíticas (CFU-G), monocíticas (CFU-M), granulomonocíticas (CFU-GM), eritroides tempranas (BFU-E) y eritroides tardías (CFU-E), mixtas (CFU-MIX) y células hematopoyéticas pluripotenciales (HPP-CFC).

Una vez descongelada cada una de las unidades y reconstituidas en el gabinete de seguridad, con una solución de albúmina al 5% en dextran (PM 40,000) (PISA), se

tomaron nuevamente alícuotas de 100,000 células MNC para realizar el cultivo de colonias. Todas en las mismas condiciones postcongelación.

Para cada una de las unidades de SCU se contaba por tanto con la cuenta de progenitores antes y después de criopreservación determinándose el rango de variación entre ellas.

Dado que el proceso de recolección, mantenimiento y trasplante de SCU está incluido dentro de un programa institucional, ya cuenta con consentimiento informado y se apega a las normas y leyes que rigen la donación de órganos y tejidos en donde se aclara que la información obtenida puede ser usada para investigación.

El análisis estadístico se realizó mediante estadística descriptiva y t de student para muestras pareadas.

VIII. RESULTADOS

CUADRO 1. Numero de colonias antes y después del proceso de crio preservación.

	CFU-G		CFU-M		CFU-GM		CFU -E		BFU- E		CFU-MIX		HPP-CFC	
	Pre cong	Pos cong												
PROMEDIO	49.5	41.2	37.4	40.9	8.4	3.7	46.9	100.6	124.7	158.1	4.7	3.7	6.3	4.5
DESVIACIÓN ESTANDAR	20.3	29.8	18.1	27.5	9.6	2.8	45.1	80.7	57.0	78.9	2.5	2.0	2.1	1.7
SIGNIFICANCIA ESTADISTICA	0.392		0.867		0.027		0.027		0.179		0.912		0.320	

CFU-G: unidades formadoras de colonias granulocíticas.

CFU-M: unidades formadoras de colonias monocíticas.

CFU-GM: unidades formadoras de colonias granulomonocíticas.

BFU-E: unidades formadoras de colonias eritroides tempranas.

CFU-E: unidades formadoras de colonias eritroides tardias.

CFU-MIX: unidades formadoras de colonias mixtas.

HPP-CFC: unidades formadoras de colonias de células hematopoyéticas pluripotenciales.

IX. DISCUSION

Las posibilidades actuales y futuras de tratar con células progenitoras hematoyéticas de sangre de cordón umbilical enfermedades, tanto hematológicas, neurodegenerativas entre otras entidades, ha llevado a la investigación de los factores que pudieran influenciar para obtener una mejor calidad en la toma, almacenamiento y aplicación de SCU.

El potencial hematopoyético de la SCU es definido por el número de células $34+$, así como de las unidades formadoras de colonias, por lo que el éxito del trasplante se ha asociado con el número de células nucleadas totales y las unidades formadoras de colonias.⁽²³⁾

Algunos autores ya han estudiado el impacto de los factores obstétricos, neonatales y de la toma de SCU que pudieran influenciar en el número de UFC GM tales como raza de los padres, peso del producto, edad gestacional, sexo y peso encontrando que el peso del producto y la raza de los padres pudiera estar influyendo en la cantidad de unidades formadoras de colonias.^(24, 25) En cuanto a la forma de la toma ya sea intra o extrauterino no se ha encontrado influencia en el número de unidades formadas de colonias, aunque aún existe controversia en todos estos factores.⁽²⁶⁾

Es este trabajo se ha estudiado si el factor de almacenamiento o, mejor dicho de criopreservación influye en la cantidad de unidades formadoras de colonias viables que se obtienen para trasplante, encontrando que el efecto de la criopreservación fue estadísticamente significativo con disminución para la serie mieloide (CFU-GM) y de incremento para la serie eritroide (BFU-E y CFU-E). No se encuentra efecto estadísticamente significativo para otros linajes celulares. Consideramos que una explicación de ello pudiera ser el hecho de que las colonias más susceptibles no resistieron los cambios del medio dejando a otras colonias menos susceptibles los nutrientes y factores de crecimiento, incrementándose su número; aunque también pudiera estar relacionado con la forma en que realizo el cultivo y la experiencia del personal, en este caso no es un factor a considerar debido que el personal que realizo todo el procedimiento tiene amplia experiencia en el campo sin intervenciones de otro participante. (Opinión personal).

Un punto importante a considerar es que en los pacientes trasplantados las primeras colonias que nos indican el éxito o fracaso de un injertado de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas es la presencia de monocitos en sangre periférica, esto debido probablemente a que son tengan una tasa mayor de actividad clono génica, por lo que podríamos pensar que los hace más susceptibles a los cambios ambientales, llámese sustrato y crio preservación. Es probable que posterior a la crio preservación las colonias de UFC GM cambien de estado de G0 a G1 aumentando su actividad metabólica y por lo tanto susceptible a las influencias ambientales, lo que propiciaría una disminución de estas colonias al ser sometidas a estrés.

X. CONCLUSIONES

El efecto de la criopreservación fue estadísticamente significativo con disminución para la serie mieloide (CFU-GM) con una p de 0.027 y de incremento para la serie eritroide (CFU-E) con una p de 0.027. No se encuentra efecto estadísticamente significativo para otros linajes celulares aunque es necesario aumentar el número de estas mediciones, ya que el tamaño de nuestra muestra es pequeño por lo que deberá corroborarse esta tendencia conforme aumente la experiencia en este tema.

Consideramos que es necesario continuar estudiando el efecto de la criopresevación en estas colonias y ampliar los estudios hacia los efectos en el ciclo celular, disponibilidad de sustrato y su interacción entre ambos.

Un aspecto de mayor interés con implicaciones clínicas y motivo de otro estudio, es el efecto que los resultados pudieran tener sobre el éxito o fracaso del injerto y que algunos autores ya lo han empezado a estudiar como factor predictor de injerto.

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Szilvassy Stephen J. The biology of hematopoietic stem cells. Archives of Medical Research 2003; 34: 446–460.
2. Broxmeyer HA, Auerbach AD. , Hematopoyetic reconstitution in a patient with Fanconi’s anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med 1989, Oct 26; 321(17):1174-8.
3. Mayani Hector., Lansdorp Peter M., Dragowska Wieslawa, Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. Journal Of Experimental Medicine 1993; 178: 787-791.
4. Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Severino A, Bergandi D, Ferrario J *et al.* Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. Blood 1997; 89: 2644-53.
5. Rubinstein P., Stevens CE. Placental blood for bone marrow replacement: The New York Blood Center’S Program and Clinical Results. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol 2000; 13:565-84.
6. Horwitz Edwin M. Stem Cell Plasticity: The growing potential of cellular therapy. Archives of Medical Research 2003; 34: 600–606.

7. Ryuji Nakagawa, Tsutomu Watanabe, Yoshifumi Kawano, Sachiyo Kanai. Analysis of maternal and neonatal factors that influence the nucleated and CD34+ cell yield for cord blood banking. *Transfusion* 2004; 44:262-267.
8. Craig Donaldson, W. John Armitage, Val Laundry, Clive Barron. Impact of obstetric factors on cord blood donation for transplantation. *British Journal of Haematology*, 1999, 106, 128±132.
9. Tse William and Laughli Mary J. Umbilical cord blood transplantation: A new alternative option. *Hematology* 2005 . 377-383.
10. Wagner Barker Davies. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 2002; 100: 5-10.
11. Kurtz James, Seetharaman Shalini, Greco Nicholas, and Moroff Gary. Assessment of cord blood hematopoietic cell parameters before and after cryopreservation. *Transfusion* 2007;47:1578-1587.
12. Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 2004; 48:146-56.
13. Boiso I. Criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 2001;18(4).
14. García JV. Criopreservadores concepto y manejo. *Biol Clin Hematol* 1984;6(219).

15. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Porcu E. Oocyte Criopreservation. En: Shoham Z (eds). Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives. London, UK: Martin Dunitz Ltd; 2001.
16. Lovelock JE. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta*. 1953;10:414-26.
17. Trounson A. Preservation of human eggs and embryos. *Fertil Steril* 1986;46:1-12.
18. Itoh, Minegishi. A simple controlled-rate freezing method without a rate-controlled programmed freezer provides optimal conditions for both large-scale and small-scale cryopreservation of umbilical cord blood cells. *Transfusion* 2003;43:1303-1308.
19. Foss Abrahamsen Jenny, Bakken Anne M., and Bruserud Oystein. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells with 5-percent rather than 10-percent DMSO results in less apoptosis and necrosis in CD34+ cells. *Transfusion* 2005;45:1208-1213.
20. Hubel Allison. E d i t o r i a l. Cryopreservation of HPCs for clinical use. *Transfusion* 2001. Volume 41.
21. Zhang et al. Trehalose amiorates the cryopreservation of coord blood in a preclinical system and increase the recovery of CFUs. *Transfusion* 2003; 43: 265 – 272.
22. Woods E. J.; Pollok K. E.; Byers M. A.; Perry B. C. cord blood stem cell cryopreservation. *Transfus Med Hemother* 2007; 34:276-285.

23. Lim F., Beckhoven J.M., Brand A., Kluin-Nelemans J.C., Hermans J. M., Willemze R. The number of nucleated cells reflects the hematopoietic content of umbilical cord blood for transplantation. *Bone Marrow Transplantation*; 1999; 24: 965–970.
24. Aroviita P., Teramo K., Hiilesmaa V. , and Kekomäki R. Cord blood hematopoietic progenitor cell concentration and infant sex. *Transfusion* 2005; 45:613-621.
25. Mancinelli F., Tamburini A., Spagnoli A., Malerba C., Suppo G., Lasorella R., Optimizing umbilical cord blood collection: impact of obstetric factors versus quality of cord blood units. *Transplantation Proceedings*; 2006 38: 1174–1176.
26. N. Tsagias, K. Kouzi-Koliakos, D. Hamidi-Alamdari, V. Karagiannis, E. Kostidou, and G. Koliakos. Cell recovery sufficient for adult transplantation by additional cord blood collection from placenta. *Transplantation Proceedings*; 2007; 39: 3380–3384.