



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE POBLACIONES CELULARES POR CITOMETRIA
DE FLUJO, DURANTE EL PROCESAMIENTO DE SANGRE DE
CORDON UMBILICAL, UTILIZANDO UN SISTEMA
AUTOMATIZADO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A

FRANCISCO JAVIER MENDEZ PEREZ



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Javier Méndez Pérez

FECHA: 21 / Sept. / 2009 .

FIRMA: 

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE PROF. RODOLFO PASTELÍN PALACIOS

VOCAL PROF. JOSÉ LUIS DOMÍNGUEZ TORIX

SECRETARIO PROFRA. EVA DELIA CALDERÓN GARCIDUEÑAS

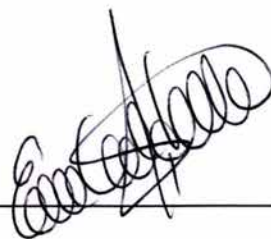
1er. SUPLENTE PROFRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ

2do. SUPLENTE PROFRA. AMALIA GUADALUPE BRAVO LINDORO

El tema aquí presentado se desarrolló en el Banco de Sangre de Cordón Umbilical del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea.

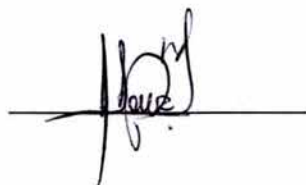
ASESOR DEL TEMA:

EBC. EVA DELIA CALDERON GARCIDUEÑAS



SUSTENTANTE:

FRANCISCO JAVIER MÉNDEZ PÉREZ



Este trabajo fue presentado en el XV Congreso de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea en Valencia España en junio del 2004 en la categoría de trabajo libre; modalidad de cartel.



*ESTUDIO DE POBLACIONES CELULARES POR
CITOMETRÍA DE FLUJO DURANTE EL PROCESAMIENTO
DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL, UTILIZANDO UN
SISTEMA AUTOMATIZADO.*



**Para mis padres:
Susana y Cruz.**

Para mis hermanos.



*A mis padres y hermanos
Gracias por todo su apoyo, comprensión y cariño.
Por soportar las desveladas, el mal humor dando siempre una palabra de aliento.
es por ustedes, por que simplemente soy un reflejo suyo....*

*A Mire
Mi fuerza para renacer cada día.....*

*A mis sobrinos
Gracias, de ustedes aún sigo aprendiendo.....*

*A mi tía Carlota †
Lo prometido es deuda, gracias.....*

*A Dios
Por darme una familia, fuerza, y la capacidad para reconocer mis errores....*

*A la UNAM
Por permitimos cumplir nuestros sueños, por darnos las bases para crecer en
todos los aspectos.*

*Al CNTS
Por brindarnos todas las facilidades para realizar este trabajo y por permitimos
participar en este proyecto.*

*Quiero agradecer tambien a mi asesora Eva Delia Calderón por todos los
consejos, por brindarnos siempre una palabra adecuada y por mostrarnos que la
enseñanza siempre va más allá.... de verdad hemos aprendido mucho.*

*A mis demás asesores por su amistad y apoyo; gracias a Angélica, Fabiola, José,
Celerino, Javier, Sagrario, Edith, Rosa, Genoveva, Eduardo, Cristina, Nancy,
Gaby, Martha, Antonio, Jessica, Polo, por mostrarme que la vida laboral tambien
necesita de un poco de alegría.*



A Miriam, Mario, Jorge, Eduardo, Apolinar, Aarón, Jesús, Oscar, Escarlet, Karina, Magda, Larissa, Sheila, Adriana, Araceli, Ricardo, Genaro, Tayde, Mónica, Liliana, en fin a todos mis amigos de la facultad, gracias por enseñarme que la amistad es el mejor regalo que alguien te puede otorgar.

A Karina, Cecy, Faby, Maribel, Luis, Armando, Ana, por todos los momentos de festejo, risas, lagrimas y simplemente por el hecho de estar juntos de saber que puedo y que cuento con ustedes.

*A la familia Mederos Michel
Por permitirme convivir con ustedes, por todo su apoyo, sus consejos y por enseñarme que la generosidad aún existe....*

*Fabiola
Gracias por enseñarme que todo es todo.*

Un agradecimiento a mis profesores de la facultad en especial a la QFB. Dolores Campos por enseñarme que en la vida hay que ocuparse en lugar de preocuparse.

A la familia Zavala González, por que siempre supe que ahí tenía un segundo hogar, gracias por todo su apoyo.

A mis amigos del Servicio Social: Susana, Viridiana, Sandra, Jesús, Miriam, Mónica, y Mariana Gracias por enseñarme las bases de una amistad, por todas las tardes juntos, los tequilas, y sobre todo gracias por su apoyo en los momentos difíciles.

*A todas las madres que donaron
Gracias por permitir que una nueva vida brinde luz a alguien más.....*

"La vida solo es posible si es reinventada"Cecilia Mireles



Índice

	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	01
CAPÍTULO 1. GENERALIDADES	03
¿CÓMO SURGEN LOS BSCU EN EL MUNDO?	04
1.1 CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS (CPH) Ó CÉLULAS MADRE	06
Historia del Concepto de Célula Madre	06
Características de las CPH de Sangre de Cordón Umbilical	07
1.2 LA IMPORTANCIA DEL ANTÍGENO CD34+	09
1.3 HEMATOPOYÉISIS	11
Hematopoyésis Embrionaria	11
Hematopoyésis en el Adulto	12
1.4 SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL	15
CAPÍTULO 2. LA AUTOMATIZACIÓN DE LOS BSCU	16
2.1 CONCENTRADOR CELULAR SEPAX DE BIOSAFE	19
Descripción General del Proceso Automatizado	21
Principales Componentes y Características del Equipo	23
Ventajas del Equipo Automatizado	23



	PÁGINA
2.2 CITOMETRÍA DE FLUJO (CF)	24
Fundamentos de la CF	25
Fluorocromos Utilizados en CF	28
2.3 DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO CD34+ POR CITOMETRIA DE FLUJO	30
Anticuerpos Monoclonales (AcMo)	32
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS	34
CAPÍTULO 4. DISEÑO DE LA PRUEBA	35
4.1 MATERIAL Y MÉTODOS	36
4.2 METODOLOGÍA.....	38
PROCESAMIENTO DE SCU.....	40
Procesamiento de SCU utilizando el Sistema Sepax de Biosafe	41
Determinación de Poblaciones Celulares por CF	41
CAPÍTULO 5. CÁLCULO DE RESULTADOS	43
CAPÍTULO 6. RESULTADOS	46
CAPÍTULO 7. ANÁLISIS DE RESULTADOS	52
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES	55
CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA	59



INTRODUCCIÓN

oooooooooooooooo

En México, la cultura de los Bancos de Sangre de Cordón Umbilical (BSCU), se puso de manifiesto hasta el año 2002 (10 años después de la creación del primer banco de cordón en el mundo) con la aparición de los primeros bancos de cordón para uso autólogo de origen privado^(5,20) y en el mes de junio del 2003 inició actividades el primer BSCU de carácter gubernamental, perteneciente a la Secretaría de Salud a cargo del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea (CNTS).⁽⁵⁾ El cual ha decidido mantenerse a la par con otros BSCU europeos como el de Barcelona en España, Leiden en Alemania y Milán entre otros, lo que lo coloca como el primero totalmente automatizado en toda América Latina, que además servirá como una unidad de referencia para los demás BSCU en nuestro país.

Una prueba del trabajo que se está realizando en este BSCU se observó el 16 de marzo del año 2004 cuando se llevo a cabo el primer trasplante de CPH procedentes de sangre de cordón umbilical, recolectadas y procesadas por personal del CNTS en un niño de 10 años de edad con Leucemia Aguda Linfoblástica de Células T, con resultados exitosos hasta el momento.

Esto nos brinda una idea del esfuerzo que se está realizando para consolidar un proyecto que genere beneficios no solo económicos, sino también reconocimiento mundial al lograr la acreditación en NETCORD-FACHT con todo lo que esto representa.

El objetivo del presente trabajo es brindar la información recopilada al evaluar las poblaciones celulares de la SCU por citometría de flujo antes y después de ser procesadas con el nuevo sistema de centrifugación celular Sepax de Biosafe, para contar con referencias acerca de la eficiencia en la obtención de CPH, mediante el protocolo de automatización con el que cuenta el BSCU del CNTS.



Es decir se emplean metodologías que nos permiten la optimización de los procedimientos evitando que sean técnico-dependientes y logrando con ello una mayor trazabilidad en los resultados. Lo cual sin duda, nos ofrece que un proyecto de esta magnitud no se encuentre destinado al fracaso y genere rendimientos en todos los aspectos.



CAPITULO 1

GENERALIDADES.

Las células sanguíneas maduras tienen un tiempo de vida limitado y, con excepción de los linfocitos, son incapaces de reproducirse así mismas. Por ello, el reemplazo de las células hematopoyéticas periféricas muertas es la función de las células más primitivas de la médula ósea, llamadas células progenitoras hematopoyéticas (CPH) o células madre. Los adelantos en la investigación científica aunados a los que se han dado en materia tecnológica durante este siglo nos permite contar ahora con Bancos de Sangre de Cordón Umbilical (BSCU), los cuales son los encargados de realizar los procedimientos de recolección, procesamiento, análisis, almacenamiento, clasificación, selección, y envío de CPH, provenientes de sangre de cordón umbilical (SCU) para trasplante emparentado o no emparentado.



¿CÓMO SURGEN LOS BSCU EN EL MUNDO?

La presencia de las CPH en la SCU, se demostró por primera vez en el año de 1974; lo que originó que se llevaran a cabo diversos estudios biológicos, dando como resultado el primer trasplante de CPH procedentes de cordón umbilical realizado por la Dra. Gluckman en el año 1988, para tratar a un niño con anemia de Fanconi, con células procedentes de su hermano HLA idéntico. Este paciente a la fecha cuenta con 22 años de edad y se encuentra en perfecto estado de salud.^(8,11,19)

El primer BSCU de donadores voluntarios no emparentados fue fundado en Nueva York en 1993 por Pablo Rubinstein en el "New York Blood Center" en ese mismo año suministró la primera unidad de SCU no emparentada para la realización del primer trasplante de este tipo en la "Universidad de Duke" en Durham. En la actualidad este banco cuenta con el inventario más importante de unidades de SCU de EUA.^(5,20)

Mientras tanto, en Europa se fundó el primer BSCU de donadores no emparentados en 1992 en la ciudad de París y en 1995 se fundó el grupo Eurocord, con la finalidad de crear un registro de los trasplantes realizados con SCU, realizando un seguimiento de los pacientes y un foro para el desarrollo de estudios cooperativos.^(5,19)

Paralelamente en la ciudad de Milán Italia, se creó el grupo NETCORD (red de cordón), formado por un grupo de bancos de sangre de cordón umbilical, que buscaban establecer normas de buena práctica y cooperación entre los bancos y centros de trasplante, surgiendo así los estándares internacionales de NETCORD, para asegurar unidades de SCU de alta calidad hematopoyética a cualquier centro de trasplante a nivel mundial que las requiera.^(2,5)



Es por esto que actualmente el programa de acreditación de los BSCU en el mundo está basado en los estándares internacionales de NETCORD-FACHT, de acuerdo a esto los BSCU miembros de NETCORD son: Alemania, España, EUA, Bélgica, Inglaterra, Italia, Francia, Finlandia, Israel, Japón y Sydney^(5,20) y existe un buen grupo de bancos que desean acreditarse y unirse a la red mundial; entre ellos el BSCU del CNTS, razón por la cual se ha dado a la tarea de realizar la validación de sus procedimientos, para cumplir primero con la normativa nacional y posteriormente con los estándares que exige NETCORD-FACHT logrando así su objetivo primordial de alcanzar un inventario de 5000 unidades perfectamente validadas de acuerdo a dichos estándares, de modo que puedan estar disponibles y ser utilizadas en trasplantes por cualquier paciente mexicano que así lo requiera.^(5,39)



1.1 CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS (CPH) O CÉLULAS MADRE.

Historia del concepto de célula madre.

La teoría monofilética del desarrollo de las células sanguíneas propone un precursor celular común, la célula madre, que bajo la influencia de factores humorales, es capaz de auto reproducirse, proliferar y diferenciarse en todos los tipos de células hematopoyéticas.⁽³²⁾

El volumen de células progenitoras comprende aproximadamente $1-2 \times 10^6$ células madre en médula ósea.^(26,36) A pesar de su baja concentración, éstas células son responsables de la producción de más de 10^8 células por día de manera continua. Sorprendentemente, sólo un pequeño número de células madre se está dividiendo en un momento dado (menos del 5%). La mayor parte están en fase de reposo, el estado G_0 . Para mantener el volumen de células progenitoras y al mismo tiempo seguir produciendo células para reemplazar las células sanguíneas ya diferenciadas envejecidas, las células progenitoras deben ser capaces de mantener un equilibrio respecto a la maduración y diferenciación. Primero, una célula progenitora puede dividirse en dos células hija, una de las cuales se va a diferenciar, mientras que la otra permanece en el compartimiento de células progenitoras; de manera alterna, por cada célula progenitora que produce dos células hija, de las cuales ambas se diferencian, otra célula progenitora produce dos células hija que permanecerán en el compartimiento de células progenitoras. Con esto se logra que las células o el compartimiento de células progenitoras se mantenga constante mientras se produce la progenie que se diferencia y reemplaza a las células envejecidas. Las células hija retienen la habilidad para generar células de todos los tipos hematopoyéticos. Sin embargo, al cabo de un tiempo se limitará a un solo tipo celular. ^(10,38)



Como hemos mencionado, las CPH se encuentran tanto en sangre periférica como en sangre de cordón, teniendo estas últimas mayor interés en el tratamiento de varias enfermedades por sus características, las cuales se mencionan a continuación:

Características de las células progenitoras hematopoyéticas de la sangre del cordón umbilical:⁽²⁶⁾

a) *Número de células progenitoras hematopoyéticas.*

La experiencia clínica ha demostrado que la SCU contiene suficientes células hematopoyéticas como para reconstituir la hematopoyésis en pacientes de hasta 50 kilos de peso. Aunque ya se han realizado con éxito los primeros trasplantes de SCU en pacientes adultos de peso superior⁽⁷⁾, no hay todavía suficiente experiencia en adultos como para asegurar que la eficacia sea la misma en receptores de mayor peso y superficie corporal.

b) *Capacidad proliferativa de las células progenitoras hematopoyéticas.*

Las células progenitoras hematopoyéticas de la SCU contienen una mayor proporción de células CD34+ primitivas con mayor capacidad clonogénica en presencia de factores de crecimiento añadidos y con capacidad mucho mayor de generar colonias secundarias.

c) *Alorreactividad disminuida.*

Si bien, la capacidad de proliferar de los linfocitos T de la SCU frente a estímulos alogénicos primarios es similar a la de la sangre o la médula ósea del adulto, su actividad citotóxica basal es menor. También se han observado niveles inferiores en varias citocinas, inmadurez funcional de las células dendríticas y menor actividad celular NK (natural killer), aunque este último hallazgo no ha sido uniformemente comprobado.



Los citados hallazgos podrían explicar, al menos en parte, la menor intensidad de las reacciones injerto contra huésped (EICH) observadas en los trasplantes con SCU y que permiten emplear unidades con diferencias en el complejo mayor de histocompatibilidad en 1 y hasta 3 antígenos.

d) *Expansión «ex-vivo» de las células progenitoras hematopoyéticas.*

La capacidad de expansión de las células progenitoras hematopoyéticas de la SCU es superior a las de la médula ósea o las de sangre periférica después de movilización. Si bien los resultados más espectaculares se han obtenido con CPH comprometidas, estudios recientes parecen demostrar que también las células progenitoras más primitivas como las CD34+ CD38- pueden ser expandidas. De confirmarse la posibilidad de expandirse las células progenitoras hematopoyéticas primitivas, tendría una importante repercusión en la aplicación de la SCU tanto en el terreno de los trasplantes como en el de la terapia génica.^(1,2)

A partir de análisis sistemáticos se ha encontrado que las células progenitoras hematopoyéticas expresan en su superficie un antígeno en particular que permite su identificación de poblaciones raras altamente enriquecidas de células madre. De acuerdo a lo anterior el antígeno CD34+ es el marcador universal de las CPH por lo que su identificación, purificación y caracterización ha sido posible mediante estudios inmunofenotípicos.^(3,4)



1.2 LA IMPORTANCIA DEL ANTÍGENO CD34+

Antígenos de diferenciación leucocitaria (CD)

Los antígenos leucocitarios se comenzaron a descubrir gracias al desarrollo de los anticuerpos monoclonales (AcMo). Un antígeno leucocitario es una proteína de superficie de algún tipo de leucocito.

Para hacer una nomenclatura sistemática, inmunólogos de todo el mundo concordaron la nomenclatura CD. "CD" ("cluster of differentiation") significa grupo de diferenciación y viene seguido de un número ordinal. Este nombre deriva del hecho de que al madurar las células adquieren y/o eliminan proteínas en su superficie: antígenos leucocitarios. Existen más de 160 proteínas con CD asignado; además existen 3 tipos de proteínas (BCR , TCR , HLA) que marcan el reconocimiento específico del antígeno por el sistema inmune y que no han recibido un número CD de identificación.^(35,38)

El antígeno CD34+ es una glicoproteína única transmembranal entre 105-120Kd ^(4,16,40), fue descubierto a mitad de los 80's por el desarrollo de anticuerpos que reconocieran un subgrupo de células de la médula ósea en estado de inmadurez y es un antígeno leucocitario específico para diferenciación celular cuyo gen se localiza en el cromosoma 1q32.⁽³⁸⁾ Se encuentra presente en las CPH inmaduras, en todas las unidades formadoras de colonias de células hematopoyéticas en médula ósea y sangre e incluye progenitores unipotenciales (CFU-GM, BFU-E) y progenitores pluripotentes (CFU-GEMM, CFUMix y CFU-Blast). También se encuentra en las células endoteliales y aproximadamente 1% de timocitos humanos.⁽¹⁶⁾

La frecuencia de las células CD34+ varía entre la médula ósea, la sangre periférica del adulto, del niño, la SCU y la placenta; sin embargo, las células CD34+ disminuyen rápidamente después del nacimiento, hasta un 30% del valor inicial a las 48 horas. La velocidad de disminución es máxima en las primeras 4 horas de vida.⁽²⁶⁾



La identificación del antígeno CD34+ ha tenido una especial importancia en la evaluación de la capacidad hematopoyética de un injerto, ya que la expresión de ésta molécula corresponde con los estadios más precoces de diferenciación hematopoyética.⁽¹⁶⁾

Existe una relación entre el número de células CD34+ que se infunden y el tiempo transcurrido hasta el injerto, la dosis relativa de CD34+ transplantadas es de 100,000 células/ Kg de peso corporal.

En la actualidad el método de elección para la cuantificación del marcador CD34+ se realiza por citometría de flujo, el procedimiento puede realizarse en menos de 1 hora, lo que lo convierte en una metodología rápida, objetiva y cuantitativa.^(14,23)

De esta forma la expresión en la superficie del antígeno CD34+ ha llegado a ser rápidamente el mecanismo de identificación usado como base para el contaje, aislamiento y manipulación de CPH humanas, y ha tenido especial importancia en la evaluación de la capacidad hematopoyética de un injerto, ya que la expresión de ésta molécula corresponde con los estadios más precoces de diferenciación hematopoyética. ^(3,16)



1.3 HEMATOPOYÉSIS.

La hematopoyésis consiste en la formación y el desarrollo o maduración de todas las células de la sangre.

Hematopoyésis embrionaria.

Durante el desarrollo embrionario, la hematopoyésis ocurre en diferentes sitios. Extraembrionariamente se da después de la implantación del blastocito, con la aparición de las primeras células primitivas eritroides en los islotes sanguíneos del saco vitelino hacia el día décimo octavo después de la gestación^(10,26,38) y se trata de una hematopoyésis exclusivamente eritroide.

El origen de las células hematopoyéticas en mamíferos esta relacionado con el término de la gastrulación y la formación del mesodermo, (una de las tres capas germinales, las cuales darán origen a los órganos y tejidos corporales.)⁽³⁸⁾ Los eritroblastos del saco vitelino aparecen junto con el primer vaso sanguíneo embrionario, lo cual sugiere que las células endoteliales y las células sanguíneas tienen un precursor común.^(26,38)

El desarrollo de los eritroblastos primitivos en el saco vitelino es crítico para la supervivencia del embrión y sus características mas importantes son:

- Presentan una mayor rapidez de maduración
- Una incrementada sensibilidad a la eritropoyetina
- Un periodo de vida mas corto comparado con los eritroblastos fetales y los del adulto y por último,
- Las células son anormalmente grandes, debido a que la maduración nuclear se retrasa en comparación con la maduración citoplasmática sin que esto signifique una formación deficiente.



Los progenitores eritroides primeros formadores de unidades eritroides (BFU-E) y las unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E), se encuentran presentes en el saco vitelino a las 4 semanas de gestación y su detección es difícil a partir de la 7ª semana; sin embargo se sabe que permanecen en la circulación hasta las 12 semanas de gestación.⁽²⁶⁾

La formación leucocitaria y plaquetaria (mielopoyesis y megacariopoyesis) se inicia en el hígado fetal, ya que ahí se encuentran la CFU-GEMM y la CFU-GM, pero la producción de éstas células no se considera significativa hasta el inicio de la hematopoyesis en la médula ósea.

A partir de la semana 16, aparece la hematopoyesis mieloide y linfoide. Es así como la médula ofrece el mayor sitio de hematopoyesis después de las 24 semanas de gestación. En definitiva, se observa que prácticamente desde el establecimiento de la circulación en el embrión se pueden detectar precursores celulares.^(32,38)

Hematopoyesis en el adulto

En el adulto, la hematopoyesis se desarrolla en la médula ósea, el tejido que da origen a todas las células de la sangre se conoce como tejido hematopoyético. Desde el momento que tienen la capacidad de autorrenovarse, las células progenitoras hematopoyéticas mantienen un nivel estable de multiplicaciones durante toda la vida.

La hematopoyesis se encuentra regulada y en una persona sana, por lo general, la cantidad de células nuevas que se forman son proporcionales a la cantidad de células viejas que se pierden o mueren. Es conveniente tener en cuenta que el tiempo de vida de las diferentes células sanguíneas es muy variable y puede ir desde horas (neutrófilos) o días (eritrocitos) hasta 20-30 años para algunos linfocitos.



Los mecanismos que regulan la hematopoyésis dependen de varios factores; el primero es el control en la producción de las diferentes citocinas que estimulan la médula y que son producidas por las células del estroma; el segundo es el control simultáneo en la producción de las citocinas estimulantes de la médula que son de origen exógeno y derivan de macrófagos y linfocitos T activados; el tercero consiste en la regulación en la expresión de los receptores para las citocinas hematopoyéticas, tanto en las CPH como en las unipotentes que van madurando; finalmente, el cuarto es el control de las poblaciones de células maduras mediante la estimulación de la muerte celular programada y el inicio de la apoptosis.

Sin embargo, en diversas circunstancias fisiológicas y/o patológicas, la hematopoyésis puede disminuir o bien tiene que incrementarse para aumentar los números de algunas poblaciones de células sanguíneas. En este último caso, las CPH pueden mostrar una extraordinaria capacidad proliferativa.

Numerosas circunstancias comunes, como la desnutrición, la prematuridad o el envejecimiento, pueden modificar la tasa de producción de las células sanguíneas y, al variar alguno de los cuatro factores mencionados, provocan cambios en las cantidades de tejido linfoide disponible.

El sistema hematopoyético incluye órganos y tejidos que desempeñan una función en la proliferación, maduración y destrucción de células sanguíneas. Estos tejidos y órganos comprenden el sistema mononuclear fagocito, bazo, ganglios linfáticos, timo, médula ósea y el hígado. La médula ósea es el principal sitio de producción celular sanguínea después del nacimiento.

El bazo es importante para seleccionar eritrocitos y extraer inclusiones eritrocitarias. El hígado también remueve eritrocitos envejecidos o dañados, leucocitos y plaquetas, pero no es un filtro tan discriminatorio como el bazo.^(30,35)



Las CPH se estimulan para proliferar y diferenciarse mediante factores de crecimiento hematopoyéticos, estos factores incluyen factores estimulantes de colonia e interleucinas, que interactúan con su célula blanco mediante receptores celulares transmembranales únicos.

Después de la adhesión del factor de crecimiento a su receptor, su señal se envía a lo largo de la membrana celular al citoplasma y por último al núcleo.

Estos factores tienden a ejercer su función en el microambiente de la medula. Las células del estroma en la medula también desempeñan una función vital en la proliferación y diferenciación celular.

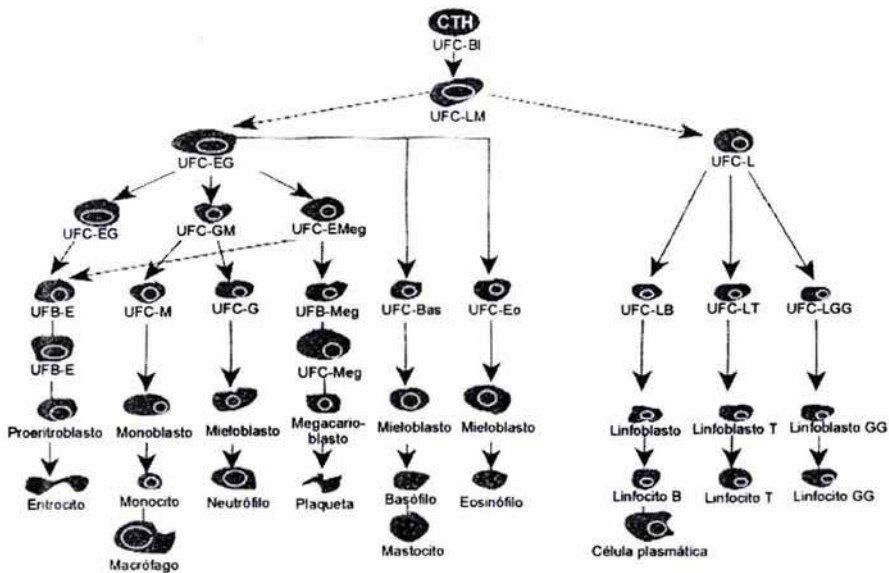


Fig. 1 Esquema de la Hematopoyesis. CHT = célula totipotencial hematopoyética. UFC= unidad formadora de colonias. UFB = unidad formadora de brotes. BI= blastos. LM = linfocito mielocito. GEMM = granulocitos, eritrocitos, monocitos, megacariocitos. L = linfocito. EG = eritrocitos y granulocitos, megacariocitos. M = monocitos. G = granulocitos. Meg = megacariocitos. Bas = basófilos. Eo = eosinófilos. LB = linfocitos B. LT = linfocitos T. LGG = linfocitos grandes granulares.



1.4 SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

El desarrollo de nuevas posibilidades de estudio fenotípico y funcional de las CPH hizo que, durante los ochenta, numerosos investigadores volvieran a profundizar en el estudio de la ontogenia hematopoyética. Descubriendo entre otras cosas, que la sangre de la placenta, fácilmente accesible a través de la punción de la vena umbilical, posee unas cualidades diferentes de la sangre adulta, e incluso de la sangre de recién nacidos varios días después del parto. (26)

Dos de estas cualidades son de especial relevancia:

a) la sangre placentaria posee una concentración relativamente elevada de CPH de gran capacidad proliferativa y b) casi no existen células responsables de la respuesta inmune: esto puede ser debido a la tolerancia entre el bebé y la madre y la falta de contactos previos con antígenos externos. Estas características convirtieron la sangre de cordón umbilical (SCU), habitualmente desechada, en una fuente de progenitores hematopoyéticos potencialmente útil en trasplantes. (1,21)

Una vez demostrada la capacidad de implante de los progenitores de la SCU entre familiares histocompatibles, la mayor permisividad inmunológica de las células inmunocompetentes de la SCU y contando, además, con la experiencia previa del desarrollo estratégico de los registros de donantes no emparentados de médula ósea, se propuso la utilización de donaciones no emparentadas con el objetivo de completar el abanico de posibles para donantes alternativos de progenitores hematopoyéticos. Ello podía mejorar las expectativas (y de hecho así ha sucedido) del 60/70% de los pacientes que carecen de un donante familiar idóneo. Cabe recordar que los trasplantes de médula ósea requieren una compatibilidad del 100%. En la actualidad hay más de 70.000 unidades de SCU disponibles, de las cuales aproximadamente la mitad están en BSCU Europeos y se han realizado más de 1500 trasplantes alrededor del mundo. (11) Además se ha venido dando un desarrollo tecnológico que les permite a los BSCU en el mundo automatizar los procedimientos de recolección de CPH.



CAPITULO 2

LA AUTOMATIZACIÓN DE LOS BSCU

Hoy en día, los BSCU a nivel mundial buscan continuamente la automatización, que los procesos no sean técnico dependientes y que tengan una trazabilidad comprobable.⁽²⁰⁾ Por ello hacen uso de los adelantos científicos y tecnológicos que les permitan contar con equipos de vanguardia. En este capítulo, revisaremos el uso y funcionamiento del Procesador celular Sepax de Biosafe®; los fundamentos básicos de la citometría de flujo, la química de los fluorocromos; los AcMo, sus aplicaciones en hematología, propiamente en el procesamiento de SCU y la determinación de las células CD34+.



Los BSCU, cuentan con una gran responsabilidad en la terapéutica actual; si bien, el procesamiento de SCU consta de diferentes etapas, las cuales se pueden dividir de manera general en:

- Fase de donación del producto.
- Fase de transporte de la unidad de SCU al BSCU.
- Fase de procesamiento de la unidad.
- Fase de envío de la unidad al centro de trasplante.

No es posible aislar cada una de ellas de manera individual, por ello surge la necesidad de mantener controles para asegurar que las propiedades del producto se conservarán al término de cada etapa logrando así que solamente las CPH funcionales se encuentren en la circulación del receptor.

Sin duda, esto es prioritario para el BSCU del CNTS, por ello ha implementado controles de calidad, para las CPH al momento de su obtención, (calidad trasfusional) y al momento de ser trasfundidas (calidad hematopoyética).

Los primeros involucran todos los criterios de inclusión (los cuales se resumen en el capítulo 4 de este trabajo), la información brindada y recopilada del donador misma que será tratada con la más estricta confidencialidad, estudios serológicos reportados para los marcadores de infectividad en la historia clínica, siempre tomando en cuenta el carácter altruista del proceso.

Dentro de los controles de calidad hematopoyéticos encontramos a aquellos propios de la caracterización del producto, contenido celular, viabilidad celular, contenido de CPH, mediante citometría de flujo, grupo ABO/Rh y el HLA; procesamiento de la unidad en sistemas cerrados y automáticos como el Sepax de Biosafe; el sistema de congelación controlada con almacenamiento final en nitrógeno líquido Bioarchive System TG3626, una tecnología que emplea un sistema de código de barras para almacenar cada una de las unidades mediante un brazo robótico.



Por último, se cuenta con otros controles como las hojas de reportes de incidencias durante el traslado de la unidad al BSCU, la identificación del personal encargado del traslado de la misma, fecha, hora y firma de la recepción de la unidad de SCU en el BSCU, en el ámbito del trasplante se cuenta con técnicas validadas de descongelación para comprobar nuevamente la caracterización y viabilidad celular antes de la transfusión. Y la implementación de los cultivos clonogénicos para evaluar la funcionalidad de las mismas in vitro.

Así mismo son importantes los estudios que demuestren la esterilidad del producto después del procesamiento de la unidad.

Todo esto nos permite obtener una trazabilidad óptima reduciendo al máximo los posibles errores y generando un interacción entre todos los participantes destacando siempre la importancia que cada uno de ellos tiene y la necesidad de cumplir con los criterios para ofrecer unidades de calidad tanto trasfusional como hematopoyética.



2.1 CONCENTRADOR CELULAR SEPAX DE BIOSAFE

El almacenamiento de las unidades de SCU una vez que se habían procesado requería de un espacio demasiado amplio; además de los efectos tóxicos de la administración del DMSO como agente crioprotector por ello se realizaron muchos estudios con el fin de establecer técnicas de reducción de volumen de la unidad de SCU,⁽¹¹⁾ evitando al máximo la pérdida significativa de las células nucleadas.

De esta manera surge un sistema de bombeo y centrifugación celular, que trabaja como un pequeño separador de células sanguíneas, capaz de procesar bajos volúmenes de sangre de forma automatizada en un ambiente cerrado y estéril, el Sepax Biosafe® (Figura 2).



Figura 2. Equipo Sepax-Biosafe

El sistema está basado en la separación por centrifugación de acuerdo a la densidad y tamaño de las partículas sanguíneas lo que permite que las células progenitoras hematopoyéticas puedan ser separadas de la sangre de cordón, reduciendo el volumen inicial colectado (120-140ml) hasta 20ml^(11,12) recolectados en bolsas individuales en un volumen estandarizado para que después puedan ser sometidas al proceso de criopreservación, expansión celular o infusión al paciente que lo necesite. ⁽¹⁹⁾



El equipo utiliza un kit de separación (Sepax-CS 530) para procesar la sangre de cordón umbilical el cual se describe en la siguiente figura:

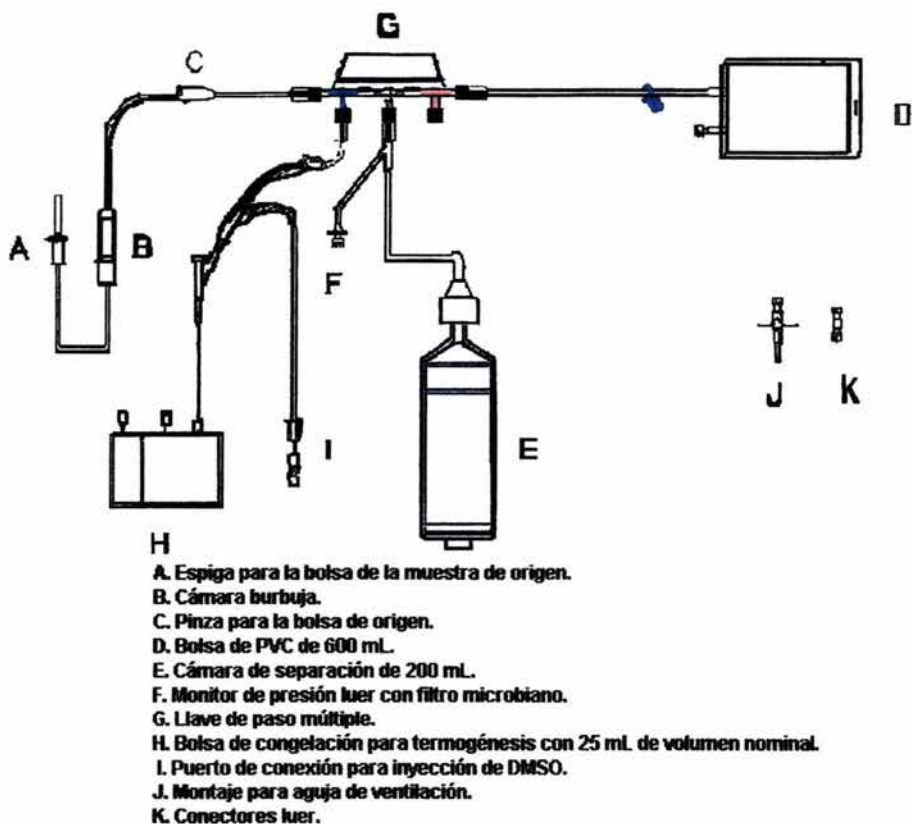


Figura 3. Kit de separación Sepax CS-530

A continuación se describirá más detalladamente el proceso de reducción de volumen utilizando este sistema.



Descripción general del proceso automatizado.

El procedimiento inicia con el llenado de la cámara de separación. La SCU de la bolsa de origen, es aspirada dentro de la cámara por un movimiento descendiente del pistón. La fase de llenado termina cuando el sensor óptico detecta que el tubo de abastecimiento se encuentra vacío o bien, cuando detecta que la cámara esta llena.

Al inicio del periodo de sedimentación , la cámara empieza a girar a lo largo de su eje. La centrifugación dura algunos minutos dando como resultado una óptima separación de los componentes sanguíneos.

Finalmente, en la fase de extracción y recolección, los componentes sanguíneos separados son distribuidos dentro de sus respectivas bolsas de recolección. La SCU ahora separada en plasma, buffy coat y células rojas, es empujada fuera de la cámara de separación, los primeros 4mL de plasma son recolectados en la bolsa para células blancas (criobolsa) esto para recuperar el remanente de SCU que se encuentra en las tuberías y otros 8mL de plasma son dirigidos a la bolsa de recolección de células rojas para limpiar la tubería, el plasma sobrante es recolectado en la bolsa correspondiente hasta que el sensor óptico detecta la primera célula. Esta detección inicia el cambio automático de las válvulas y la recolección del buffy coat en la bolsa de recolección de células blancas, una vez que se ha recolectado el volumen establecido de buffy coat la posición de las válvulas cambia automáticamente para recolectar las células rojas en la bolsa correspondiente; el procedimiento termina cuando el pistón llega al tope de la cámara de separación. (11,31)



El equipo, realiza la separación de las CPH (Buffy coat), el plasma y las células rojas a partir de un sensor integrado, produce una concentración de las CPH en un volumen final de 26.3 ± 11.6 mL, el producto final es recolectado directamente en la bolsa de congelación y se encuentra listo para la adición del DMSO (crioprotector) sin ninguna manipulación (11). (Figura 4). La media de recuperación celular mediante esta técnica es mayor al 80%, por lo que se acepta una recuperación entre un 80 y 90%.

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

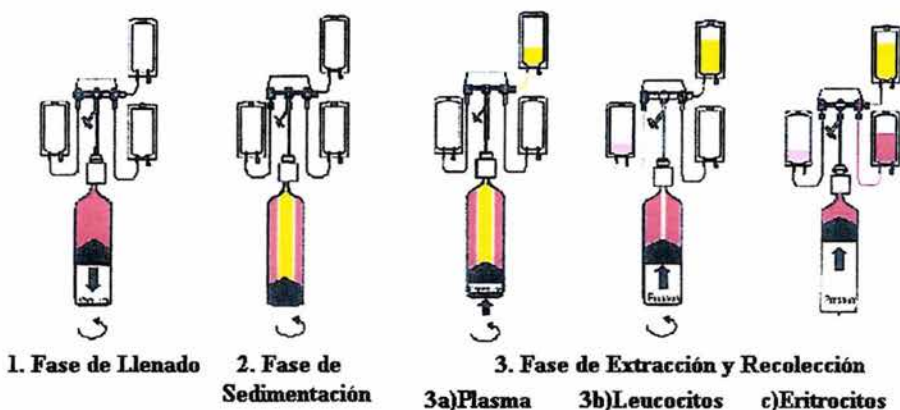


Figura 4. Protocolo de Separación



Principales componentes y características del equipo.

- Motor centrífugo y gabinete adaptado para recibir una cámara desechable (Kit de separación), centrifuga con un rango de velocidad de 1700 a 8000 rpm.
- Sistema neumático de bombeo con capacidad de vacío y presión para llenar y vaciar la cámara de separación, el flujo puede ser ajustado entre 10-180 ml/min
- Dispositivo detector integrado (CCD) para medición del volumen en la cámara de separación (detección de acuerdo a la absorbancia de los componentes)
- Espigas giratorias para la selección de la llave de paso para controlar la dirección del flujo en el kit de separación.
- Detector óptico de la línea para supervisar los diferentes componentes que atraviesan por la tubería.⁽³¹⁾

Ventajas del Equipo Automatizado. ⁽¹¹⁾

- Separación de los componentes sanguíneos de forma automatizada
- Unidades de Sangre de Cordón umbilical constantes con una reproducibilidad del 100%
- Reducción del tiempo de procesamiento
- Ausencia de contaminación por ser un sistema cerrado
- Además las células obtenidas se pueden almacenar por años usando un volumen menor del agente crioprotector, y conservando buena viabilidad.
- Este sistema puede ser configurado por el operador, de tal forma que se obtengan productos estandarizados con respecto al volumen final.



Otra herramienta útil en el procesamiento de SCU es la citometría de flujo la cual constituye un método reciente e innovador de análisis celular mediante el estudio de diversas propiedades fisicoquímicas y biológicas de la célula incluida en un flujo líquido isotónico.

El desarrollo de esta rama ha sido impulsado de forma importante por los avances de los últimos años en campos tan diversos como la producción de anticuerpos monoclonales (AcMo), la química de los fluorocromos, la tecnología láser, las tinciones histoquímicas y la cibernética, entre otros. Así, su empleo como herramienta analítica ha sufrido una importante difusión en el conjunto de especialidades biomédicas como la inmunología, hematología, oncología, biología celular. Probablemente y por diversas razones, la hematología ha sido de las primeras y más beneficiadas por el uso de esta tecnología.

2.2 CITOMETRÍA DE FLUJO (CF)

Las células son unidades extraordinariamente complejas, capaces de exhibir cambios moleculares sutiles asociados a estados fisiológicos o patológicos bien definidos. El análisis de moléculas en distintos compartimentos celulares ha permitido la identificación de marcadores biológicos de utilidad diagnóstica y pronóstica con la capacidad de modificar de manera sustancial las prácticas médicas encaminadas a preservar o restaurar la salud. La CF es así, una herramienta que posibilita el análisis de grandes cantidades de células individuales a una velocidad alta, haciéndolas pasar en un fluido isotónico a través de una columna y bajo la acción de un rayo láser, lo cual origina una dispersión de la luz y emisión de fluorescencia, que es recolectada y transformada en valores digitales almacenados en un computadora.^(23,24)



FUNDAMENTOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO.

Desde un punto de vista práctico y de forma semejante con la microscopia, la CF desarrolla sus aplicaciones a través de un soporte físico: el citómetro de flujo. En él pueden llevarse a cabo básicamente dos funciones distintas, Por un lado, el análisis de células u otras partículas y por otro su separación física por fenómenos electrostáticos, por esta razón el citómetro de flujo se divide en tres compartimentos funcionales: hidráulico, óptico y electrónico.⁽²⁹⁾

El primero consiste en un sistema complejo de fluidos con diferentes presiones que obligan a las células a pasar, en un arreglo constante y secuencial, a través de un pequeño orificio hacia un punto espacial conocido como "de intersección" o "de interrogación"^(22,27) ; en este, las células son iluminadas por una frecuencia de luz muy intensa, y sus diversas reacciones son detectadas por un sistema complejo de lentes, filtros y espejos que conducen a las señales luminosas hacia fotodiodos y fotomultiplicadores. Estas señales son digitalizadas y colectadas por un ordenador electrónico que integra la información recibida de cada una de las células en su paso por el punto de intersección. Los instrumentos pueden analizar así desde una centena hasta millares de células en unos cuantos segundos.

La fuente luminosa de la que están provistos la mayoría de los citómetros de flujo es un rayo láser, habitualmente de Argón, enfriado ya sea por aire o por agua. La intercepción del flujo con la fuente luminosa genera información sobre distintas características morfológicas, estructurales y funcionales de las partículas.

En términos generales dicha información posee un valor relativo y se engloba en dos tipos de parámetros:⁽²⁴⁾

- Los derivados de la dispersión de la luz y
- Aquellos que están relacionados con la emisión de luz por fluorocromos presentes en la partícula al ser excitados por la luz del láser



El paso de una célula delante de la fuente luminosa hace que la luz incidente se disperse en todas direcciones lo que nos arroja la siguiente información acerca de la partícula.

- La luz dispersada en la dirección frontal, perpendicular al láser, se llama forward scatter light (FSC), ésta es cuantificada por un detector situado delante de la fuente luminosa y es proporcional al tamaño de la célula.
- Otra característica analizada es la luz reflejada y dispersada en un ángulo de 90° , en este caso la magnitud de la dispersión de la luz depende de la combinación de un conjunto de factores entre los que se incluyen las membranas y las estructuras internas de la célula, está se conoce como side scatter light (SSC) y es proporcional a la complejidad interna de la célula.

Al ser colectadas las diferentes emisiones fluorescentes a 90° es necesario disponer de un sistema óptico que, mediante la combinación adecuada de espejos dicróicos, lentes y filtros separen la información originada por la luz dispersada lateralmente y por cada uno de los distintos fluorocromos presentes en la célula para finalmente enviarla al fotomultiplicador correspondiente .

Por ultimo, todas las señales luminosas FSC y SSC son convertidas en impulsos eléctricos amplificados y transformados en códigos digitales para poder ser analizados en una computadora, de esto se encarga el sistema electrónico.

De acuerdo con las necesidades del operador, el procesador elabora histogramas con información sobre parámetros diferentes. Además nos brinda la posibilidad de seleccionar distintas subpoblaciones celulares y analizar sus características individualmente, permitiendo un análisis multidimensional de gran sensibilidad y objetividad.



A modo de ejemplo se muestra la Figura 5, un primer histograma de dos parámetros el cual se construye con la intensidad de dispersión de la luz en sentido frontal (FSC) y en sentido lateral (SSC). Si se analizan leucocitos de sangre periférica (SP), en este histograma se agruparan las células pequeñas y no granulares (linfocitos) en un lugar cercano al origen de ambos ejes; mientras que las células grandes y granulares (polimorfonucleares) se ubicaran por el contrario, lejos del origen de ambos ejes; una tercera población de tamaño y granularidad intermedia (monocitos) se localiza entre las dos poblaciones anteriores. Además podemos observar que sin preparar poblaciones enriquecidas en linfocitos, es posible crear una ventana electrónica que aisle esta población leucocitaria y condicionar que la detección de fluorocromos se limite a ella y de esta manera obtener información en otros histogramas referentes únicamente a los eventos contenidos en la ventana de linfocitos.

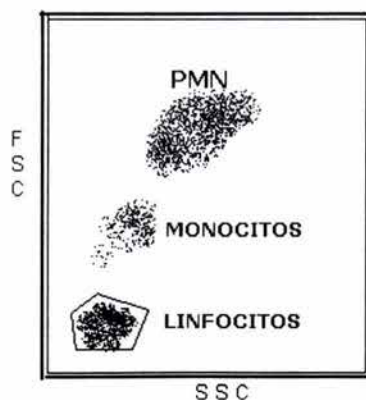


Figura 5. Histograma para el análisis de subpoblaciones linfocitarias



FLUOROCROMOS UTILIZADOS EN CITOMETRÍA DE FLUJO.

En la mayor parte de los casos, las células deben tratarse con moléculas bifuncionales que, por un lado identifican la presencia de una determinada estructura celular y por el otro, emiten señales fluorescentes al ser excitadas por la fuente de luz. Los más populares de este tipo de moléculas son los AcMo conjugados con fluorocromos, Estos se mezclan con las células y, a la vez que se unen a sus antígenos específicos "marcan" a la célula con el fluorocromo al que están conjugados, siendo la intensidad de fluorescencia detectada por el citómetro directamente proporcional al número de moléculas unidas al antígeno.⁽²¹⁾

Los fluorocromos son moléculas químicas que absorben luz a una determinada longitud de onda y emiten a otra diferente. Se caracterizan por sus espectros de excitación y de emisión, por lo que su utilización está condicionada por el tipo de láser del que disponga el citómetro y de la longitud de onda a la que se exciten ellos mismos. El espectro de excitación y emisión varía con los diferentes fluorocromos. Si disponemos de una láser con una longitud de onda de 488 nm los fluorocromos que utilizemos deberán ser capaces de ser excitados a esta longitud de onda y además emitir en longitudes lo más lejanas posibles entre ellas.⁽⁷⁾

La intensidad de fluorescencia también depende del fluorocromo utilizado, ya que hay fluorocromos que emiten con mayor intensidad que otros.



La tabla 1 nos muestra los Fluorocromos más utilizados en la citometría de flujo (23)

Fluorocromos mas utilizados en citometria de flujo.				
Tipo de Fluorocromo	Máximo de excitación	Máximo de emisión	Unión	
Reactivos de Unión covalente (unión a proteínas, Igs, lectinas, etc.):				
	FITC, FDA	490nm	520nm	
	Ficoeritrina B	480-565 nm	578nm	
	Rojo-Texas	596 nm	620nm	
	TRITC	554 nm	573nm	
	XRITC	580-582nm	601-604nm	
	Alofocianina	650nm	660nm	
	PerCP	488nm	675nm	
ADN/ARN:	Yoduro de propidio	536nm	623nm	ADN
	Bromuro de etidio	510nm	595nm	ADN
	Naranja de acridina	480nm	520nm	ADN
		440-470nm	650nm	ARN
	DAPI	350nm	470nm	ADN-AT
	Hoechst 33342	340nm	450nm	ADN-AT
	Pironina Y	549-561nm	567-574nm	ADNdc
		560-562nm	565-574nm	ADNdc
		497nm	563nm	ADNdc
	Naranja de tiazol	453nm	480nm	ARN
	Mitramicina	450nm	560nm	ADN-GC
	Cromomicina A3	450nm	555nm	ADN-GC
Potencial de membrana:				
	Rodamina 123	511nm		
	DiO-Cn	485nm	505nm	
	Dil-Cn	548nm	567nm	
	di-Cn	646nm	668nm	
	di-Ba Isopr.	493nm	668nm	
pH:	6-Carboxifluoresceína	495nm	520nm	
		450nm (pH bajo)		
	BCECF	505nm	530nm	
		460nm (pH bajo)		
	DCDHB	340-360nm	500-580nm	
		340-360 (pH bajo)	420-440nm	
Calcio:	Fura3	335nm	512-518nm	
		360nm (Ca bajo)	505-510nm	
	Indo 1	330nm	390-410nm	
		350nm (Ca bajo)	482-485nm	
	Flo-3	506nm	526nm	
-BCECF = 2',7'-bis (2-carboxietil)-5(y6) carboxifluoresceína. -DCDHB = 2,3,-diciano-1,4,-dihidroxibenzeno -FITC: Isotiocianato de fluoresceína. -PE: Ficoeritrina. -PerCP: Proteína Clorofila Peridina. -TRITC: Isocianato de Tetrametil Rodamina				



El desarrollo de fluorocromos cuyos espectros de absorción son semejantes, pero los de emisión son discriminables, permiten que una misma preparación celular sea tratada en forma simultánea con múltiples anticuerpos, cada uno de ellos conjugado con un fluorocromo diferente. Al ser introducidos en el citómetro de flujo, la computadora es capaz de coleccionar la intensidad de cada señal fluorescente en cada una de las células que son analizadas permitiendo así definir diversas poblaciones celulares normales o anormales con base en la expresión y/o intensidad de expresión de múltiples antígenos.

En algunas ocasiones ciertos fluorocromos producen el llamado fenómeno Quenching, referido como la transferencia de energía entre dos moléculas marcadas con el mismo fluorocromo, y que están suficientemente cercanas. Debido a ello una molécula puede ser excitada por la luz del láser y por la luz que emite la otra molécula.⁽³⁸⁾

2.3 DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO CD34 POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

En la actualidad la cuantificación del marcador CD34 se realiza por citometría de flujo, el método recomendado para la validación de CPH de cordón umbilical es el de la Sociedad Internacional de Hemoterapia e Ingeniería de Injertos (International Society of Hemotherapy and Graft Engineering ISHAGE) por citometría de flujo en plataforma única, que permite obtener el contenido de CD34+ por unidad de volumen.⁽⁴⁾

La ISHAGE inicialmente diseñó una serie de pautas para la cuantificación de células CD34+ basado en cuatro parámetros de la citometría de flujo usando el anticuerpo monoclonal antiCD45 conjugado con la FITC y el anti CD34 conjugado con el PE.



Con este procedimiento, una cuenta absoluta de CD34+ es generada incorporando la cuenta de leucocitos procedentes de un analizador automatizado de células conocido como método de la doble plataforma.^(15,17)

Más tarde el método de la ISHAGE fue modificado, agregándose un número conocido de microesferas fluorescentes, también se incorporó cloruro de amonio para eliminar los requerimientos de lavado-centrifugado de la muestra y el uso de fijadores; esto convirtió a el citómetro de flujo en un instrumento único para la cuantificación absoluta de células CD34+.⁽⁴⁾

En un experimento por separado, se incorporó un tinte de viabilidad en el protocolo para determinar la cantidad de células CD34+ viables en forma absoluta. Estas modificaciones convirtieron el protocolo básico, en un método de plataforma única para determinar la cuenta absoluta de células CD34+ así como su viabilidad, utilizando directamente el citómetro de flujo.⁽⁴⁾ disminuyendo así, los problemas originados al hacer uso de la metodología manual, y convirtiéndolo en un procedimiento sumamente sensible que contribuye a la automatización del procesamiento de SCU.



Figura 6. Citómetro de Flujo *FacsCalibur BD San José California*



Continuando con las aportaciones de otras áreas en la citometría de flujo revisaremos brevemente que son y que utilidad tienen los anticuerpos monoclonales.

ANTICUERPOS MONOCLONALES (AcMo)

Los anticuerpos son Inmunoglobulinas producidas por las células plasmáticas (linfocitos B activados y totalmente diferenciados) capaces de combinarse específicamente con el antígeno que causó su producción. Las Inmunoglobulinas están presentes en el suero y fluidos tisulares, pudiéndose encontrar en forma soluble como anticuerpos, o sobre la superficie de los linfocitos B como receptores de antígeno. Constan de dos cadenas pesadas y dos ligeras cada una de las cuales contiene una región variable en un extremo. La gran diversidad en la secuencia de aminoácidos de las tres regiones da cuenta de las diferentes especificidades de unión al antígeno de cada anticuerpo. ⁽³⁸⁾ (Figura 7).

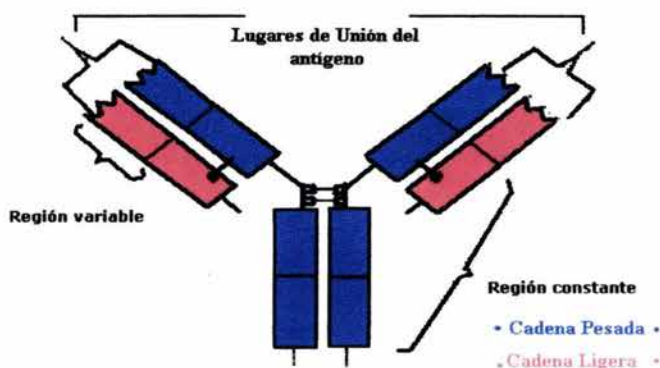


Figura 7. Esquema de una Inmunoglobulina



Los AM fueron producidos por vez primera en 1975.

Son anticuerpos específicos para un solo antígeno. Y son el principal reactivo utilizado en CF al estar conjugados con fluorocromos, permitiendo en una forma rápida, sencilla y objetiva diferenciar poblaciones y subpoblaciones celulares con distinta actividad funcional.⁽¹³⁾

La técnica clásica utilizada para producir anticuerpos monoclonales consiste en inyectar un animal (en general ratones, ratas o conejos) con la sustancia contra la que se desea obtener anticuerpos. La presencia de la sustancia extraña induce a los linfocitos B a fabricar anticuerpos. Estas células son extraídas y fusionadas con una línea celular de mieloma. Las células no fusionadas se eliminan. Llegados a este punto, cada célula fusionada - llamada hibridoma - fabrica un único tipo de anticuerpo, un anticuerpo monoclonal. El hibridoma que produce el AcMo deseado se identifica y esta nueva línea celular se utiliza para producir grandes cantidades del anticuerpo.

En los últimos años, gracias al conocimiento de la genética de la formación de los anticuerpos, podemos clonar los genes que codifican para el anticuerpo y producirlo en algún organismo, sin necesidad de generar el hibridoma.⁽³⁸⁾



CAPITULO 3

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el desempeño de una metodología de separación celular automatizada asociada a la obtención de células progenitoras hematopoyéticas en un banco de sangre de cordón umbilical utilizando la citometria de flujo.

OBJETIVO PARTICULAR.

Comprobar que la automatización es una opción adecuada para la obtención de Células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical verificando la presencia de éstas células por citometria de flujo antes y después de ser separadas con el equipo Sepax de Biosafe.



CAPITULO 4

DISEÑO DE LA PRUEBA

Planteamiento del problema

El BSCU del CNTS es el primero en México que cuenta con una metodología completamente automatizada para la obtención de CPH procedentes de la SCU, por ello tiene que comprobar la eficiencia de este procedimiento; por lo que hace uso de las herramientas disponibles como la citometría de flujo para evaluar el desempeño de los demás equipos incluidos en sus procesos.



JUSTIFICACIÓN.

El BSCU del CNTS, opera siguiendo los estándares internacionales establecidos por NETCORD-FACHT para ofrecer CPH de alta calidad hematopoyética, para ello cuenta con un procedimiento completamente automatizado. Razón por la cual se lleva a cabo este estudio para evaluar la eficiencia en la separación celular del equipo Sepax de Biosafe® analizando las poblaciones celulares presentes en la SCU al inicio y al término del procesamiento, utilizando la citometría de flujo.

Este estudio se dividió en diferentes etapas:

1. La recolección de la SCU en hospitales pertenecientes a la Secretaría de Salud.
2. El envío de dichas unidades al BSCU para su procesamiento.
3. La recolección y procesamiento de las unidades.
4. La criopreservación de las mismas en el BSCU.

Cada una de éstas se describe de manera general a continuación.

4.1 MATERIAL Y MÉTODOS

Para la obtención de CPH procedentes de SCU se utilizó un procesamiento completamente automatizado, utilizando el sistema de separación y concentración celular Sepax de Biosafe®. La criopreservación de CPH se realizó mediante el sistema de congelación controlada con almacenamiento final en nitrógeno líquido Bioarchive System TG3626. Las unidades de CPH contenían 10% de DMSO, 1% de Dextran 40 y 0.8% de Hespan como criopreservante.



Los estudios de validación incluyeron:

- cuenta de células nucleadas iniciales y finales,
- determinación de CD34+ y viabilidad celular por citometría de flujo (Facscalibur, BD), al momento de recibir la unidad y al término de su procesamiento.
- estudios serológicos,
- estudios microbiológicos y,
- tipificación del sistema ABO/Rh y HLA.

De manera general los criterios de inclusión para cada unidad se muestran en la tabla 2.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA LAS UNIDADES DE SCU RECOLECTADAS.	
EDAD MINIMA DE LA DONANTE	18 AÑOS
SEMANAS DE GESTACIÓN	>34 SEMANAS
TIEMPO DE MANIPULACION	<48 HORAS
VOLUMEN DE SANGRE NETA	>80 mL
CÉLULAS NUCLEADAS / mL	5-30X10 ⁶
CÉLULAS NUCLEADAS TOTALES AL INICIO	>8X10 ⁸
RECUPERACIÓN DE CÉLULAS NUCLEADAS POSTMANIPULACION	> 60%

TABLA 2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA LAS UNIDADES DE SCU



4.2 METODOLOGIA

Donadores.

La selección de las donadoras y la toma de muestra fue realizada siguiendo los protocolos establecidos por NETCORD-FACHT. Se analizaron 30 muestras de SCU, recolectadas al momento del parto y previo consentimiento informado a la madre, en la Unidad de Tococirugía de hospitales pertenecientes a la Secretaria de Salud. Todas las donadoras completaron un cuestionario estandarizado para documentar su historia médica y su posible exclusión por factores de riesgo para la transmisión de algunas enfermedades, así mismo, todos firmaron la hoja de consentimiento antes de realizar la donación.

RECOLECCIÓN DE SCU

La técnica de recolección de las 30 muestras se llevó a cabo inmediatamente después del nacimiento del producto, ya sea en parto eutócico o cesárea, cuando la placenta se encontraba aún dentro del útero, realizando un doble pinzaje (venoclusión) a 10cm del ombligo, y se cortó el vínculo del recién nacido con la placenta, localizando la zona en donde se realiza la punción de la vena (lugar más distante posible) con previa asepsia de la zona con solución de yodo, se hizo la punción de la vena umbilical (figura 8) con la aguja de la bolsa estéril de recolección (B.S. CORD CPD Grifols), la cual contenía 25mL de citrato fosfato dextrosa (CPD) y la SCU fue recolectada por gravedad agitando la bolsa de recolección en forma circular para evitar la formación de coágulos y favorecer el flujo hacia la bolsa de recolección, se pudo realizar también una segunda punción con previa asepsia de la zona a fin de recolectar el mayor volumen posible de sangre; el volumen aproximado de la recolección se encontró entre 80-150 ml.



Todo el material recolectado junto con los documentos referentes a la donación se colocaron dentro de la bolsa hermética (Figura 9) y se depositaron en un contenedor especial a temperatura ambiente para ser enviados al laboratorio de procesamiento y almacenamiento del BSCU dentro de las 24 horas siguientes a su recolección.



Figura 8. Toma de SCU

El tiempo máximo de procesamiento de las unidades fue de 40 horas a partir de su obtención.

De cada muestra de SCU se realizó la cuantificación de las células nucleadas utilizando un citómetro de flujo de la casa comercial Becton Dickinson al recibir la muestra en el BSCU del CNTS (muestra inicial). Posteriormente se volvió a realizar la determinación de las células nucleadas al término del procesamiento, es decir, una vez que se concentraron las células nucleadas utilizando el equipo Sepax (muestra final).



Figura 9. Bolsa hermética con el material recolectado

PROCESAMIENTO DE SCU.

Se procesaron 30 muestras de SCU, provenientes de hospitales pertenecientes a la Secretaría de Salud utilizando el procesador celular Sepax S-100 (Biosafe) y realizando el conteo de las poblaciones celulares mediante citometría de flujo al inicio y al término del proceso, utilizando un citómetro de Flujo (FACScalibur BD), empleando el método de plataforma simple ISHAGE. Para cada población o grupo celular se calcularon sus intervalos de confianza y se evaluó mediante un modelo lineal sobre la concentración final de cada uno, el papel que tuvieron las concentraciones iniciales y el volumen de muestra recolectada.

Además se evaluó la eficiencia del proceso ponderando el número de células/ μL de los grupos celulares finales en función de los valores iniciales.

Así mismo, para cada población o grupo celular se calcularon sus intervalos de confianza y se evaluó mediante un modelo lineal sobre la concentración final de cada uno, el papel que tuvieron las concentraciones iniciales y el volumen de muestra recolectada de SCU.



PROCESAMIENTO DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL UTILIZANDO EL SISTEMA SEPAX DE BIOSAFE®

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Se utilizó Hidroxi-etil almidón (HES). El HES es un coloide artificial derivado del almidón y compuesto principalmente por amilopectina. Las propiedades coloidales del HES en solución 60 g/l (6%) son muy similares a los de la albúmina humana. La adición de HES a la sangre aumenta la velocidad de sedimentación de los eritrocitos; fue por esta razón que se utilizó, para mejorar la eficacia en la separación de las células nucleadas, mediante centrifugación.

La gran reducción de eritrocitos y plaquetas también contribuyó de manera importante para la viabilidad post-descongelación. El proceso permitió una reducción de volumen de SCU en un volumen fijo predeterminado.

DETERMINACIÓN DE POBLACIONES CELULARES POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Los anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos dirigidos contra la molécula CD34+ se pueden usar para identificar las células CD34+ por citometría de flujo. En éste ensayo se obtuvo la tinción de las muestras de sangre cuando fueron agregados los reactivos. Los anticuerpos marcados con el fluorocromo en el reactivo se unen específicamente a los antígenos de superficie de la célula, mientras que el colorante para ácidos nucleicos tiñe al ADN y ARN de todas las células nucleadas. El sedimento liofilizado en el tubo TruCOUNT se disolvió liberando un número conocido de micro esferas fluorescentes.

Se agregó cloruro de amonio para lisar los eritrocitos antes de adquirir la muestra en el citómetro de flujo. Durante el análisis el número absoluto de células CD34+ fueron determinadas dividiendo el número de eventos celulares de CD34+ entre el número de eventos de micro esferas fluorescentes y el resultado se multiplicó por la concentración de micro esferas. (ver capítulo 5)



Para evaluar la viabilidad de las células se agregó el colorante 7-amino-actinomycin D (7-AAD). Ya que todas aquellas células 7 -AAD positivas (es decir, aquellas células que absorben el colorante por daño en la membrana celular), no son viables.

REACTIVOS

- *Anticuerpo monoclonal anti-CD45 marcado con fluoresceína (FITC) clona 2D1*, Becton Dickinson and Company Becton Dickinson immunocytometry. USA
- *Anticuerpo monoclonal anti-CD34+ marcado con PE, clona My10 y clona 8G12*. Becton Dickinson and Company Becton Dickinson immunocytometry. USA
- *Tubos TruCOUNT^{MR}* conteniendo una pastilla liofilizada con un número conocido de perlas fluorescentes de 4.2mm. Becton Dickinson and Company Becton Dickinson immunocytometry. USA
- *Colorante 7 -amino-actinomicina D (7 -AAD) BD VIA-PROBETM*. Becton Dickinson and Company Becton Dickinson immunocytometry. USA
- *Solución de lisis de cloruro de amonio, PharM LyseTM*. Becton Dickinson and Company Becton Dickinson immunocytometry. Becton Dickinson and Company Becton Dickinson immunocytometry. USA
- *Líquido de revestimiento, FACSTFlowTM* Becton Dickinson and Company Becton Dickinson immunocytometry. USA
- *Solución de pentalmidón Hestar® al 6%*. México
- *Kit de calibración, CaliBRITETM3*, perlas de calibración 3. Becton Dickinson and Company Becton Dickinson immunocytometry. USA
- *Centrifuga clínica*
- *Agitador vortex*
- *Sistema de procesamiento celular Sepax Biosafe*,



CAPITULO 5

CÁLCULO DE RESULTADOS



Se utilizó la siguiente ecuación para determinar la concentración de células CD34+ totales y viables en la muestra de SCU al recibir la unidad y al término del procesamiento de ésta con el equipo Sepax de Biosafe® también se empleo para determinar los valores en cel/ μ L de las células monucleares (MNCs), de las células blancas (WBC) y de los leucocitos.

Los datos requeridos se obtienen del cuadro de resultados que se encuentra en la hoja de reporte correspondiente (Figura. 10)

$$\text{CD34+ Totales} = \frac{\text{No. Células Totales (eventos)}}{\text{No. De Perlas* (eventos)}} \times \frac{\text{No. Perlas prueba*}}{\text{Volumen de Muestra}} \times \text{Factor de Dilución}$$

$$= \text{Células Totales CD34+}/\mu\text{L}$$

$$\text{CD34+ Viables} = \frac{\text{No. Células Viables (eventos)}}{\text{No. De Perlas* (eventos)}} \times \frac{\text{No. Perlas de prueba**}}{\text{Volumen de Muestra}} \times \text{Factor de Dilución}$$

$$= \text{Células Viables CD34+}/\mu\text{L}$$

*El número de Perlas se encuentra marcado en la bolsa de tubos BD TruCOUNT usados para la prueba.

** El número de perlas es el que se obtiene de la hoja de datos del citómetro de flujo.

Posteriormente se realizó el análisis estadístico empleando el software "R Statistic®", desarrollado por laboratorios Bell, dicho programa nos permitió realizar las graficas y el análisis de regresión, ya que es adecuado dado el número de muestras incluidas en nuestro estudio n=30 utilizando además el sistema operativo Linux®.

El modelo para evaluar el análisis de regresión fue el siguiente:

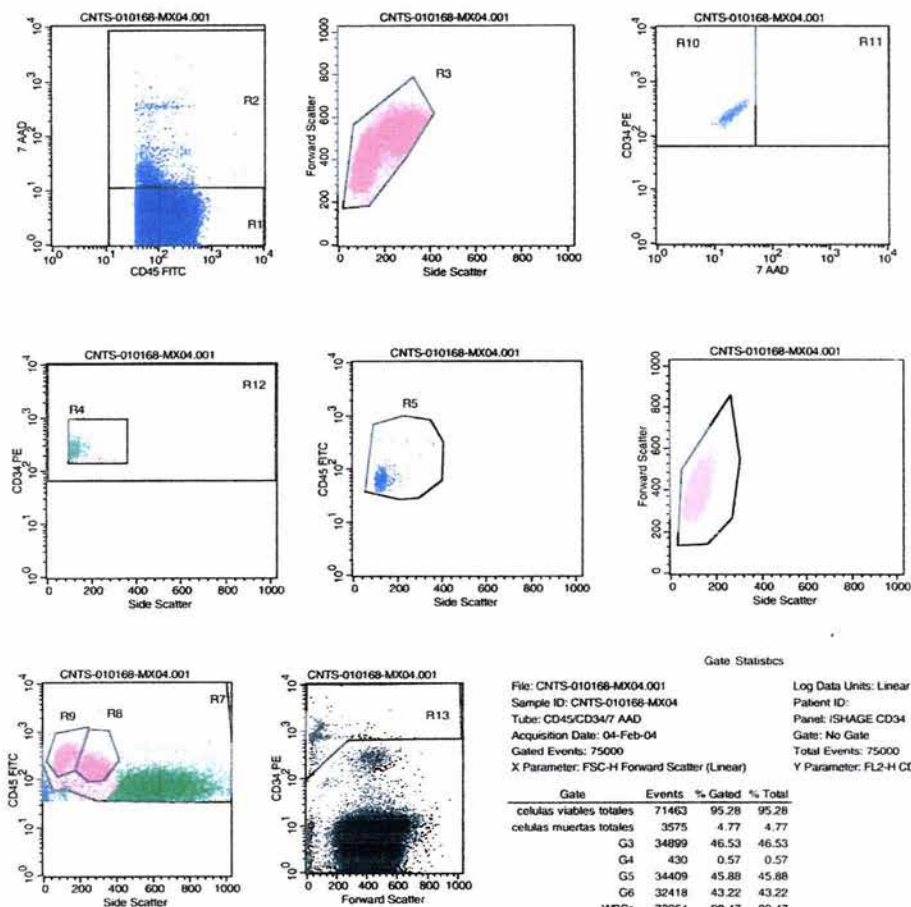
$$\boxed{\text{Conc. Final}} = \alpha \boxed{I} + \beta \text{ volumen}$$



CENTRO NACIONAL DE LA TRANSFUSION SANGUINEA

INVESTIGACION, DESARROLLO Y CONTROL DE CALIDAD

REPORTE
CELULAS CD34+ EN SANGRE DE CORDON UMBILICAL



ANALIZO : QBP ANGELICA GÓMEZ ROMERO
SUPERVISO : QFB SAGRARIO ROMERO ESTRELLA
AUTORIZO : EBC EVA D. CALDERON GARCIDUEÑAS

Valores de referencia: 0.15 - 0.6 % CD34+ viables
Valor promedio: 0.2 - 0.3 % CD34+ viables

Figura 10. Hoja de reporte del citómetro de flujo.



CAPITULO 6

RESULTADOS



Los intervalos de confianza al 95% de los diferentes grupos celulares, y la eficiencia en la recolección de las células al término de su procesamiento con el equipo SEPAX luego del análisis por citometría de flujo se muestran en la tabla 3.

Intervalos de confianza y promedio de las unidades iniciales y finales para las poblaciones celulares					
Volumen SCU inicial (mL)	CD34+ TOTALES (cel/ μ L)	linfocitos (cel/ μ L)	MNCs (cel/ μ L)	WBCs (cel/ μ L)	CD34+ VIABLES (cel/ μ L)
102.05< 110.36< 118.67	inicio 24.7< 30.76< 36.83	Inicio 3150.2< 3555.4< 3960.42	Inicio 974.6< 1227.01< 1479.4	Inicio 11617.21< 12439.56< 13261.61	Inicio 23.95< 29.94< 35.93
	Final 93.42< 124.24< 155.0	final 11166.37< 12800.1< 14463.8	Final 3744.35< 4511.77< 5279.19	Final 32316.44< 37336.16< 42355.87	Final 92.34< 123.15< 153.97
Eficiencia (%)	301.2	260.02	267.70	200.1	311.32

TABLA 3. INTERVALOS DE CONFIANZA AL 95% PARA CADA SUBPOBLACION CELULAR ANALIZADA Y % DE EFICIENCIA EN LA RECUPERACIÓN CELULAR.

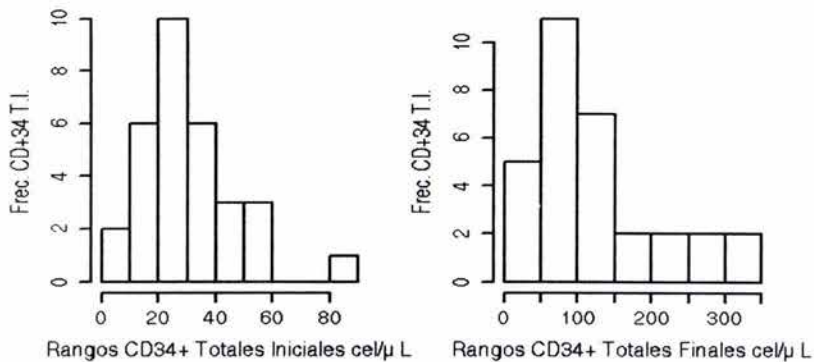
Las eficiencias en la concentración de las subpoblaciones leucocitarias al término del procesamiento con el Sepax, se muestran en la tabla 4 de acuerdo a los coeficientes en relación a la concentración inicial y al volumen inicial, las cuales son diferentes de cero. El modelo explica la cantidad de variación de acuerdo a la R^2 ajustada.

	Concentración inicial	Volumen	R^2
CD34+ TOTALES	0.417	0.022	0.47
CD34+ VIABLES	0.416	0.021	0.47
LINFOCITOS	0.756	No significativa	0.55
MNCs	0.625	No significativa	0.35
WBCs	0.582	0.0154	0.37

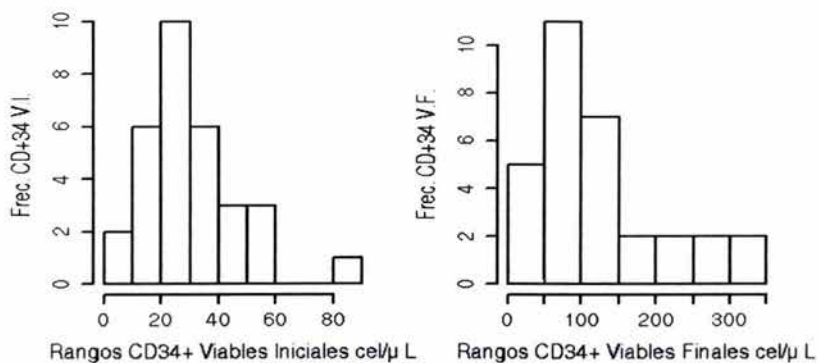
TABLA 4. COEFICIENTES DE REGRESIÓN LINEAL RELACIONANDO CONCENTRACIÓN FINAL VS CONCENTRACION INICIAL Y VOLUMEN.



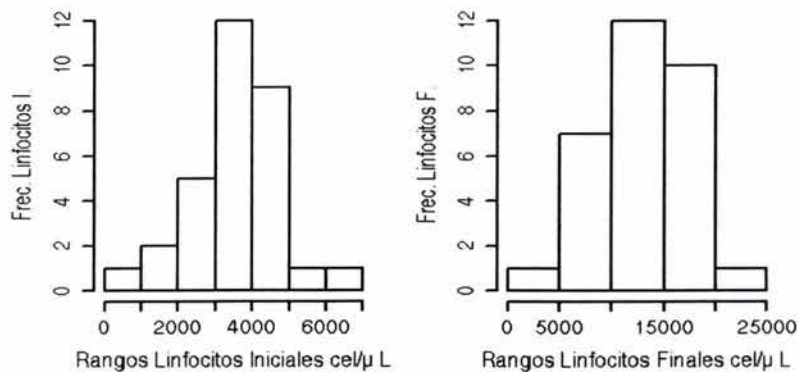
En los siguientes histogramas se muestran los rangos obtenidos para cada una de las subpoblaciones leucocitarias presentes en la SCU en cel/ μ L realizando el conteo mediante citometría de flujo al momento de recibir la muestra (muestra inicial) y al término del procesamiento de las unidades de SCU utilizando el Equipo Sepax de Biosafe (muestra final).



Histograma 1. Rangos encontrados para las células CD34+ totales en cel/ μ L en las muestras de SCU iniciales y finales.



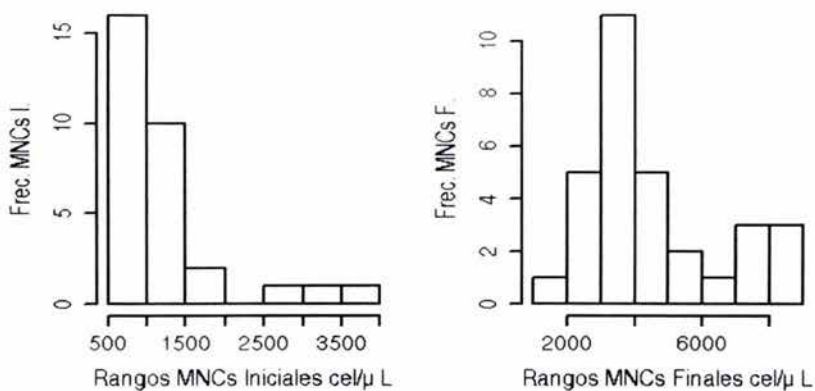
Histograma 2. Rangos encontrados para las células CD34+ viables en cel/uL en las muestras de SCU iniciales v finales.



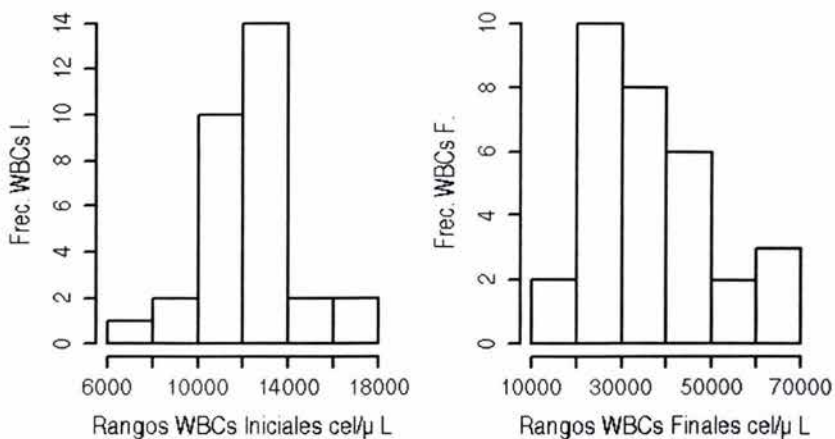
Histograma 3. Rangos encontrados para los linfocitos en cel/uL presentes en las muestras de SCU iniciales y finales.



RESULTADOS



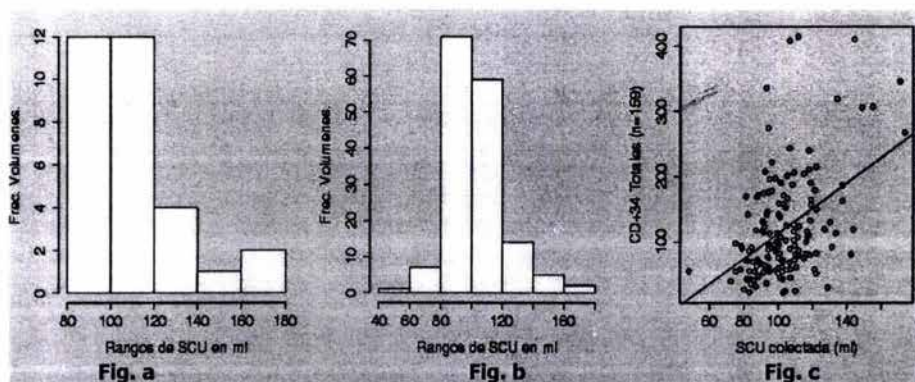
Histograma 4. Rangos encontrados para las MNCs en cel/μL presentes en las muestras de SCU iniciales y finales.



Histograma 5. Rangos encontrados para los WBCs en cel/μL presentes en las muestras de SCU iniciales y finales.



Por último se muestra la relación entre el volumen inicial y las muestras procesadas durante el presente trabajo, además la misma relación pero tomando el total de las unidades de SCU aceptadas para su criopreservación en el BSCU del CNTS al mes de enero del 2004. (Histograma 6)



Histograma 6. Relación entre el número de células CD34+ totales y el volumen recolectado de SCU en 159 muestras criopreservadas en el BSCU.(fig. b y c) Rangos de volumen de SCU en mL de las muestras recolectadas durante el presente trabajo (Fig. a)



CAPITULO 7

ANÁLISIS DE RESULTADOS.



La tabla número 3 nos muestra que al término del procesamiento de las unidades de SCU en el equipo Sepax de Biosafe, existe un incremento significativo en los valores para cada grupo celular; lo cual nos indica que el proceso es altamente confiable, en la medida que se encuentran valores mayores en todos los casos en uno o dos ordenes de magnitud, de modo que muestra medidas de eficiencia, ponderando los valores antes y después en los grupos, nos indican valores entre un 200 y 300 por ciento.

Para poder explorar la eficiencia en la separación de los diferentes grupos celulares mediante el Sepax se planteo el siguiente modelo de regresión lineal $[Conc. Final] = \alpha [I] + \beta \text{ volumen}$; este modelo involucra la concentración final en función de la concentración inicial de las diferentes subpoblaciones leucocitarias en el volumen de la unidad de SCU. Por ello la tabla 4 muestra que los grupos celulares están en todos los casos definidos en gran medida por las estimaciones iniciales y además, el volumen es importante para explicar los valores obtenidos en la concentración de las poblaciones finales de CD34+ totales, CD34+ viables y WBCs.

Los histogramas nos muestran que existen un incremento en los rangos para todas las poblaciones, los resultados de la citometria de flujo al momento de recibir las unidades en el BSCU nos indica que existen esas subpoblaciones leucocitarias en la SCU y una vez que la unidad es procesada por el Sepax se da una concentración real de la capa leucocitaria obteniendo para las células CD34+ totales y viables los incrementos mayores en su conteo final.



Por otro lado, en algunos de los análisis, el volumen de SCU resultó ser una variable relevante para explicar los valores finales, de modo que se muestra cual es el comportamiento de las muestras de este estudio, tomando el total de las muestras aceptadas hasta el mes de enero del 2004 (n=159) para su criopresevación el BSCU del CNTS y su relación con los valores de CD34+ totales reportados para las mismas. (histograma 6 figura c). Y se observa que la tendencia puede ser lineal y arrojar un volumen óptimo para una eficiencia mayor del equipo Sepax alrededor de los 120 mL; con lo cual se corrobora las especificaciones dadas por el fabricante.

Es posible observar que existe una dispersión real de los datos, por ello se muestran las figuras a y b del histograma 6, en donde se muestran los valores obtenidos de SCU en mL para las unidades, primero mostramos la relación en las unidades involucradas en este estudio y posteriormente el resultado del total de las unidades, encontramos que desafortunadamente las muestras cercanas al volumen óptimo 120 mL son pocas, sin embargo a pesar de esto los resultados en cuando a celularidad son alentadores, ya que como se menciona en el capítulo 5 se exige un porcentaje de recuperación celular mayor al 60% para validar las unidades. Por lo que sabemos que el Sepax nos arroja rendimientos óptimos a pesar de trabajar con volúmenes diferentes de SCU en cada unidad recolectada.

CONCLUSIONES



CAPITULO 8

CONCLUSIONES



- El desarrollo de nuevos instrumentos, sistemas cibernéticos de análisis, reactivos, anticuerpos monoclonales, fluorocromos y sondas moleculares aplicables a la citometría de flujo, indican que el crecimiento de ésta tecnología apenas se ha iniciado, por ello es importante que los centros privados o públicos de atención médica o en nuestro caso, de aquellos centros dedicados al transplante de CPH procedentes de SCU hagan esfuerzos por implementarla como una metodología de rutina para el procesamiento de las unidades.

- La citometría de flujo permite explorar sistemas donde están en juego relaciones de grupos celulares y una serie de factores propios de procedimientos operativos, que en nuestro caso son el punto de partida para evaluar el desempeño de un procedimiento automatizado de concentración celular utilizando el equipo Sepax de Biosafe® y demostrar que dicho procedimiento genera rendimientos significativos en la separación de los leucocitos de los demás grupos celulares.

- Todas las subpoblaciones leucocitarias presentes en la SCU muestran incrementos significativos al término de su concentración utilizando el equipo Sepax de Biosafe®, teniendo para las células CD34+ totales y CD34+ viables las eficiencias mayores en promedio, y se observa también que éstos grupos dependen del volumen presente en la muestra de SCU inicial pero con pendientes menores, lo que nos podría indicar que el volumen óptimo para obtener un mayor número de células CD34+ será de 120 mL, sin embargo no es posible observarlo realmente debido al número de muestras que se analizaron.



- Así encontramos que las ventajas que nos ofrece este sistema de concentración celular son: la estandarización del procedimiento con una recuperación de varios ordenes de magnitud entre las estimaciones finales e iniciales, una reducción significativa de los tiempos del procesamiento, desarrollo del mismo dentro de un sistema cerrado, lo cual disminuye el riesgo de contaminación bacteriana y otros problemas asociados al trabajo de las unidades en sistemas abiertos.

- Aunado a esto la adición de la citometria de flujo, nos permite asegurar para el protocolo de trasplante, una medición exacta de células CD34+ presentes en la unidad de SCU criopreservada. Lo cual será importante para el éxito del trasplante.

- Por otro lado, se sugiere repetir este análisis con un mayor numero de muestras con la finalidad de determinar una relación lineal para obtener un volumen de recolección ideal.



El futuro

Claramente, los avances tecnológicos de las metodologías empleadas para llevar a cabo los procedimientos de recolección, procesamiento y almacenaje de Células Progenitoras Hematopoyéticas procedentes de Sangre de Cordón Umbilical nos permiten contar con procesos automatizados que aseguran la calidad hematopoyética y trasfusional de las unidades empleadas en los trasplantes, sin dejar de lado la concientización de médicos y pacientes de la necesidad de la donación, del compromiso que se adquiere y del trabajo en equipo para maximizar los progresos siguiendo los estándares de calidad.



CAPITULO 9

BIBLIOGRAFÍA.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



1. Alexander J. Indrikovs. **Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical.** Gac Méd Méx Vol.138 Suplemento No. 1, 2002 S130-S132
2. Amat LI., Querol S., Molina C., Salvador C., **Umbilical cord blood, a new source of hematopoeitic progenitors for transplantation. Analysis of our experience in recollection and process.** Prog Obst Gin 1996; 39: 571-579
3. Bonnet D. **Haematopoietic stem cells.** J. Pathol 2002; 197: 430-440
4. Brocklebank AM. Sparrow RL. **Enumeration of CD34+ cell in cord blood: a variation on a single- Platform flow cytometric method based on the -ISHAGE gating Strategy.**Cytometry (communications in clynical cytometry) 2001; 46:254-261
5. Calderón E.D., **Los bancos de sangre de cordón umbilical, la normativa internacional y su situación actual en la República Mexicana.** Gac Méd Méx 2003 139;3 S101.
6. Garcia J; "**News NETCORD letter**"; Vol 1; 2003; págs 1-4
7. Garcia J, Querol S; "**Los bancos de sangre de cordón umbilical: una nueva contribución al tratamiento de las enfermedades hematológicas**"; Acta científica y tecnológica; vol 3; 2001; Págs. 10-13
8. Gluckman E. Broxmeyer HE, Auerbach AD, et al. **Haematopoietic reconstitution in patient with Fanconi anemia from an HLA sibling.**
9. Gratama J. **Flow cytometric enumeration and immunophenotyping of hematopoietic stem and progenitor cells.** Journal of biological Regulators. 2001; 15: 14-22.
10. Hernández Nieto L, Brito L. **hematopoyesis. Estudio de la médula ósea.** Medicine 1999; vol. 6 No 11, pags. 415-423
11. Jurgen Zingsem, Erwing Strasser, et al. **Cord blood processing with an automated and functionally closed system.** Engl J Med; 321;1174-1178



12. <http://www.biosafe.ch/cms/includes/pbsct.pdf>
13. <http://www.facmed.unam.mx/amp/eventos.html>
14. <http://www.stemcells.nih.gov/stemcell/scireport.asp>
15. Keeney M., Chin-Yee I., Weir K., Popma J., et al. **Single Platform Flow Cytometric Absolute CD34+ Cell Counts Based on the ISHAGE Guidelines.** Cytometry (communications in clinical cytometry) 1998; 34:61-70.
16. Lanza F., Healy L., Sutherland D.R., **structural and functional features of the CD34 antigen: an update.** Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents. 2001 february (1): 01-13.
17. LARRY C, LASKY; **Marrow and stem cell processing for transplantation;** American Association of blood banks; Bethesda Maryland; 1995; págs 51-64
18. Long GD., Laughlin M., Madan B., Kurtzberg J., et al. **Unrelated umbilical cord blood transplantation in adult patients.** Biol Blood Marrow Transplant. 2003 Dec; 9(12): 772-80.
19. Martínez Carlos; **El Banco de células madre hematopoyéticas de cordón umbilical para trasplante** Gac Med Mex Vol 139 suplemento N 3, 2003 Págs. s93-s98
20. Marín-López R.A., Calderón E. **Células de Cordón Umbilical: Estado de arte.** Memorias del XLV Congreso Anual para el Estudio de la Hematología
21. MacNiece Ian., Briddell Robert. **Ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells and mature cells.** Experimental Hematology 29 (2001) 3-11.
22. Miale, John B. **"Hematología, medicina de laboratorio"** 6ª edición, Editorial Reverté, Barcelona, España. 1985 pp. 1-39.



23. Orfao A, González M, Ciudad J, López-Berges M, López A, San Miguel J., Lopez Borrasca A. **Aplicaciones de la Citometría de Flujo en el diagnóstico hematológico.** *Biología y Clínica Hematológica*, 14: 193-203, 1992.
24. Orfao A, Ruiz-Arguelles A. **Citometría de flujo y su aplicación en hematología.** En "Citometría de flujo", *Enciclopedia Iberoamericana de Hematología*. Ediciones Universales de Salamanca: 161-175, 1993
25. Protocolo de referencia para *CD45/CD34* de Becton Dickinson. Catalogo No.341 071
26. Querol S, **Expansion ex vivo de Progenitores Hematopoyeticos de Sangre de Cordon Umbilical para Trasplante.** Tesis Doctoral.
27. Querol S., **Indicadores de calidad en el Banco de Corden.** *Gac. Méd. Méx.* 203; 139, suplemento No.3, S98-S101
28. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, et al., "**Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution.**" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 ; 92 (22): 10119–10122.
29. Ruiz-Arguelles A. **La citometria de flujo en la medicina del trasplante.** *Medicina Universitaria* 2001; 3(12): 153-62.
30. Ruiz-Arguelles G. **Fundamentos de Hematología** Editorial Médica Panamericana, México 1994 pp. 15-24.
31. SEPAX "**Sistema de procesamiento celular Manual de operación**"
32. Shirlyn B. McKenzie **Hematología Clínica** 2º Edición, *El Manual Moderno*, México DF. pp.3-9 y23-26.



33. Shpall EJ, Jones RB, Bearman SI. Et al. **Transplantation of enriched CD+34 autologous marrow into breast cancer patients following high-dose chemotherapy; influence of CD+34 peripheral blood progenitors and growth factors on engraftment.** J Clin Oncology, 1994;12:28-36.
34. Torrico-León C., **El proceso del Banco de Sangre de Cordón Umbilical.** Gac. Méd. Méx. 2003; 139, suplemento No.3, S96-S98.
35. Ulloa Arteaga César ., **"Hematología Básica"** 2ª Edición. Ciencia y cultura Latinoamericana. México 1989 pp 1-6.
36. Verfaillie M. Catherine **Hematopoietic stem cells for transplantation.** Nature immunology vol 3 No. 4 april 2002.
37. Wiley JM, Kuller JA. **Clinical commentary: storage of newborn stem cells for future use.** Obstetrics and Gynecology. 1997, 89. 300-3006.
38. Williams **hematology** sixth edition Mc Graw Hill 2002 NY: pp 77-82; 141-150 and 153-160
39. **www.salud.gob.mx/unidades/cnts/indexcnts.htm.**
40. Zandar AR, Lyding J Bielack S **Transplantation with blood stem cells** Blood Cells 1991; 17. 301-309.