

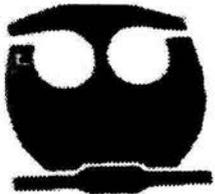


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

FACTORES MATERNOS Y NEONATALES QUE INFLUYEN
EN UNA BUENA RECUPERACION DE CELULAS
PROGENITORAS HEMATOPOYETICAS
PROCEDENTES DE SANGRE DE
CORDON UMBILICAL EN
MUJERES MEXICANAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MONICA PEREZ HUIZAR



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

MEXICO, D.F.

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.



JURADO ASIGNADO:

Presidente Prof. EVA DELIA CALDERÓN GARCIDUEÑAS
Vocal Prof. MA. DEL SOCORRO CECI REYNA RODRIGUEZ
Secretario Prof. AMALIA GUADALUPE BRAVO LINDORO
1er. Suplente Prof. LUZ MARIA DEL ROCIO VALDES GOMEZ
2°. Suplente Prof. ARACELI MENDIETA RERGIS

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea

ASESOR DEL TEMA:

EBC. Eva Delia Calderón Garcidueñas



SUSTENTANTE

Mónica Pérez Huízar



FE DE ERRATAS

En el segundo párrafo de la página 3 de esta TESIS se presenta la siguiente información:

- ❖ Cátedra FERNANDO GONZALEZ VARGAS otorgada por el Colegio de Profesores de la Facultad de Química y la delegación 024 de AAPAUNAM a mejor proyecto de tesis de licenciatura registrada en 2003. Agradecemos el apoyo brindado por dichas asociaciones para la realización de esta tesis.

Y debe aparecer:

- ❖ Cátedra FERNANDO GONZALEZ VARGAS otorgada por el Colegio de Profesores de la Facultad de Química y la delegación 024 de AAPAUNAM. Agradecemos el apoyo brindado por dichas asociaciones para la realización de esta tesis.



Este proyecto de tesis obtuvo las siguientes **DISTINCIONES**:

- ❖ Cátedra FERNANDO GONZALEZ VARGAS otorgada por el Colegio de Profesores de la Facultad de Química y la delegación 024 de AAPAUNAM a mejor proyecto de tesis de licenciatura registrada en 2003. Agradecemos el apoyo brindado por dichas asociaciones para la realización de esta tesis.

- ❖ Participación en modalidad de cartel en el XV congreso de la Sociedad Española de la Transfusión Sanguínea, llevado a cabo en junio del 2004 en Valencia, España.





Agradecimientos:

Al encontrarme en este punto de mi vida no me queda más que dar **GRACIAS...**

... a DIOS por haberme dado el don maravilloso de la vida, por llenarme de sus bendiciones a cada momento y por permitirme estar rodeada de personas que han hecho de esta la mas extraordinaria experiencia.

... a mis padres PEDRO Y QUIRINA que han sido mi ejemplo, mi guía y mi fortaleza; que con su amor, comprensión y paciencia me han apoyado en todos los momentos de mi vida.

... a mis hermanos OSCAR, ANABEL, AZU y mi cuñada ESTHELA que me han orientado, escuchado y en todo momento brindado su apoyo incondicional... los quiero muchísimo.

... a mis padrinos RITA y JOSE MANUEL, LUPE y MANUEL que me han mostrado su cariño.

... a la FAMILIA que tengo, no menciono nombres, pero todos son especiales para mi, es increíble formar parte de esta gran familia.

... a mis **AMIGOS** del grupo 15: LILIANA, BELMAR, VICTOR, BENJAMÍN JONATHAN, YENNY, PAOLA, CESAR, LUIS, OSCAR, a los miembros de la H. Canasta: MAYRA, ALEJANDRA, CECY, REBE, CHUCHO, HUGO ... a los de Servicio Social y Tesis: MIRIAM, PACO, SUSY, SANDRA, MARIANA, GORETY, VIRIDIANA... No se que hubiera sido de la escuela sin ustedes de verdad forman parte muy importante en mi vida LOS QUIERO...





...a la UNAM y a todos mis profesores de la facultad, en especial a EVA CALDERON por todo el apoyo, impulso y aprendizaje brindado a lo largo de este tiempo...

...al CNTS y en especial a los integrantes del departamento de investigación desarrollo y control de calidad FABIS, JAVIER, ANGIE, INGE, PEPE, LILI, ROSY...

...a los médicos, enfermeras y personas que colaboran en área de teco cirugía del Hospital Juárez de México, Hospital de la mujer y Hospital General de México en especial al Dr. Gregorio Magaña por su confianza y apoyo.

...y a todas las personas que de una u otra manera han estado presentes en mi vida y han sido parte de este gran sueño...

GRACIAS





**FACTORES MATERNOS Y NEONATALES QUE INFLUYEN EN
UNA BUENA RECUPERACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS
HEMATOPOYÉTICAS PROCEDENTES DE SANGRE DE
CORDÓN UMBILICAL EN MUJERES MEXICANAS**





ÍNDICE

Siglas y su significado.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
I. GENERALIDADES.....	13
1.0 Un poco de historia.....	13
2.0 Hematopoyesis.....	18
2.1 Desarrollo de la hematopoyesis.....	19
2.2 El proceso hematopoyético.....	21
2.2.1 CPH como elementos funcionales de la hematopoyesis.....	22
2.2.2 Secuencia del proceso hematopoyético.....	25
3.0 Células progenitoras hematopoyéticas (CPH).....	28
3.1 Importancia de las CPH.....	28
3.2 Características de las CPH.....	31
4.0 Obtención de las CPH.....	34
4.1 Obtención de CPH a partir de médula ósea.....	34
4.2 Obtención de CPH a partir de sangre periférica.....	36
4.3 Obtención de CPH a partir de SCU.....	37
5.0 Sangre de cordón umbilical como fuente de CPH.....	43





6.0	Procedencia de la SCU.....	47
7.0	Relación entre factores maternos, neonatales y CPH.....	50
II.	OBJETIVOS.....	55
III.	HIPOTESIS.....	56
IV.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	57
V.	RESULTADOS.....	64
VI.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	68
VII.	CONCLUSIONES.....	70
VIII.	REFERENCIAS.....	72



Siglas utilizadas y su significado

BSCU-CNTS	Banco de Sangre de Cordón Umbilical del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea
CD34+	Marcador característico de las células progenitoras hematopoyéticas
CD34T	Células CD34+ totales en la unidad de SCU
CD34V	Células CD34+ viables en la unidad de SCU
CFC	Células formadoras de colonias
CPH	Células Progenitoras Hematopoyéticas
CNT	Células nucleadas totales
FAHCT	(Foundation for the Accreditation of Hematopoietic Cell Therapy) Fundación para la acreditación de terapia con células hematopoyéticas
GBTF	Glóbulos blancos totales finales en la unidad de SCU
GBTI	Glóbulos blancos totales iniciales en la unidad de SCU
Hb	Hemoglobina
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
kD	Kilodaltones
MLSCU	Mililitros de sangre de cordón umbilical recolectados
MO	Médula ósea
NETCORD	Red internacional de bancos de unidades de sangre de cordón umbilical
PCCD34T	Porcentaje de células CD34+ totales en la unidad de SCU
PCCD34V	Porcentaje de células CD34+ viables en la unidad de SCU
PNO	Procedimientos normalizados de operación
PRN	Peso del recién nacido
SCU	Sangre de Cordón Umbilical
SDG	Semanas de gestación
SEPAX-BIOSAFE	Sistema automatizado basado en la separación de células por centrifugación de acuerdo a la densidad y tamaño de las partículas sanguíneas
SRN	Sexo del recién nacido
TH	Tiempo transcurrido desde la recolección de la unidad de SCU hasta su procesamiento en horas
UFC-E	Unidad formadora de colonias de eritrocitos
UFC-G	Unidad formadora de colonias de granulocitos
UFC-GEMM	Unidad formadora de colonias de granulocitos, eritrocitos, monocitos y megacariocitos
UFC-L	Unidad formadora de colonias de linfocitos
UFC-M	Unidad formadora de colonias de monocitos
UFC-Meg	Unidad formadora de colonias de megacariocitos
UH	Unidad hospitalaria





INTRODUCCIÓN

El avance en los descubrimientos científicos y tecnológicos, promueve en la actualidad, la posibilidad de que una mujer embarazada tenga el privilegio de dar luz a más de una vida; ya que se ha comprobado que la sangre que queda atrapada en la placenta y el cordón umbilical (productos que generalmente son desechados después del nacimiento), contiene células progenitoras hematopoyéticas (CPH) en número suficiente para reconstituir la función medular tanto a corto como a largo plazo¹; este es un producto biológico fácil de obtener al momento del parto o de la cesárea, sin que se ponga en riesgo la salud de la madre o del recién nacido.

El trasplante de CPH se ha venido utilizando en estas tres últimas décadas para reconstituir la hematopoyesis² y también es utilizado para tratar una extensa variedad de enfermedades hematológicas y no hematológicas, habiéndose establecido como terapia para muchas patologías congénitas o adquiridas del sistema hematopoyético.

Un banco de células progenitoras hematopoyéticas de cordón umbilical, es un centro dedicado a la recolección, procesamiento, estudio y criopreservación de Sangre de Cordón Umbilical (SCU) para ser utilizada en uso clínico, principalmente en trasplante para restaurar la médula ósea.^{3,4}





La Secretaría de Salud en México cuenta con un Banco de Sangre de Cordón Umbilical ubicado en el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea (BSCU - CNTS). Este BSCU esta conformado por la unidad materna, la unidad de procesamiento, la unidad de criopreservación, la unidad de búsqueda y gestión así como el banco paralelo. Sus actividades siguen los criterios establecidos por los estándares internacionales de NETCORD-FAHCT, lo que asegura una validación del proceso en forma global y trazabilidad del mismo.⁵

Los factores maternos y neonatales que influyen en una buena recuperación de CPH procedentes de SCU varían de acuerdo a la población estudiada. La finalidad de este protocolo es obtener datos que nos indiquen como influyen estos factores maternos y neonatales en la población de mujeres mexicanas, para la obtención de unidades de SCU de alta calidad hematopoyética que puedan ser utilizadas en transplante de médula ósea.

El estudio se realizó en una muestra de 157 unidades de SCU, recolectadas en tres hospitales de la Secretaría de Salud, las cuales fueron procesadas y criopreservadas en el BSCU - CNTS. Estas unidades de SCU cumplen con todos los criterios y parámetros de aceptación referidos en los estándares internacionales de NETCORD-FAHCT.





A partir de los datos que aportan estas unidades, se realizarán estudios estadísticos pertinentes que nos permitan proponer un modelo de donador que cuente con características específicas que favorezcan la captación, procesamiento y criopreservación de unidades de SCU de alta calidad procedentes de mujeres mexicanas, con la finalidad de ser utilizadas en trasplante hematopoyético.





I . GENERALIDADES

1.0 Un poco de historia

La historia de cualquier acontecimiento inicia siempre por la aparición de una idea, que algunos pueden, en su momento, considerar como absurda o ilógica, pero en realidad, es esta idea la que marca el inicio de un camino que puede ser corto o largo, y que, en algún momento, lleva a alcanzar un objetivo propuesto. Es por lo anterior que, gracias a las personas que perseveran en lo que creen y que luchan contra cualquier barrera impuesta, se tienen los avances científicos y tecnológicos que permiten a la humanidad situarse en el lugar donde se encuentra.



En los primeros años de la década de los 50 Jacobson y Lorenz, entre otros, observaron que ratones sometidos a altas dosis de radioterapia sobrevivían si se les administraban células de médula ósea de otro ratón por vía intravenosa.





La radioprotección era debida a la formación, en la médula ósea y bazo de estos animales, de colonias de células hematopoyéticas compuestas por precursores eritroblásticos, granulocíticos y megacariocíticos.

Utilizando marcadores cromosómicos pudo probarse el origen clonal de las colonias hematopoyéticas, ya que todas las células de la misma llevaban el mismo marcador cromosómico y, por tanto, las colonias tenían un origen unicelular. Parecía evidente, la existencia de **una célula germinal pluripotencial**.

En 1956 C.E. Ford introdujo el término “**quimera**” para designar la situación en la que un animal llega a poseer un sistema hematopoyético extraño a él, como resultado de un trasplante de células procedentes de otro. Se estableció así mismo que la administración intravenosa de células progenitoras de médula ósea en suspensión era el procedimiento más eficaz para la obtención de la “quimera”.

Observaciones posteriores demostraron que si bien la mayoría de animales de experimentación sometidos a trasplante medular sobrevivían más de 30 días tras la infusión, casi todos morían antes de 100 días a causa de una afección caracterizada por diarrea intensa, pérdida acusada de peso y lesiones





cutáneas. Van Bekkum y De Vries sugirieron en 1967 que este cuadro era una **"enfermedad del injerto contra el huésped"**, que posteriormente se atribuyó a los linfocitos inmunocompetentes del donante, inoculados con sus células hematopoyéticas en el organismo del receptor.

A mediados de los años 60 los estudios de Dausset y otros investigadores permitieron establecer que en el ser humano existe un **sistema de histocompatibilidad** enormemente polimorfo, denominado HLA (antígeno leucocitario humano), con múltiples "loci" que contienen numerosos alelos. Las investigaciones posteriores se orientaron lógicamente a localizar y utilizar en la clínica donantes HLA idénticos para los trasplantes medulares, tratando así de evitar o al menos aminorar estas complicaciones.

Fue Boyse quien a inicios de los años 80 propuso la utilización de la sangre de cordón umbilical (SCU) como fuente de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) con fines de trasplante hematopoyético.¹

El primer trasplante de CPH de SCU, fue realizado en Paris por E. Gluckman en octubre de 1988, en un niño con Anemia de Fanconi utilizando SCU de su hermana.^{1,9}





Basados en el éxito de este trasplante, y en la duración del injerto, otras instituciones empezaron a investigar la posibilidad de usar CPH para trasplantar pacientes relacionados y no-relacionados con el donante.⁹

Aunque si bien la mayoría de los trasplantes de CPH procedentes de sangre de cordón umbilical han ocurrido en niños, las unidades de SCU de donadores no emparentados son capaces también de restablecer la hematopoyesis en adultos.⁷

Desde 1998 y hasta mayo del 2004, alrededor de 2772 pacientes han recibido trasplante de CPH para una variedad de enfermedades malignas y no malignas.^{6,22}

En México el BSCU - CNTS realizó en marzo del 2004 el primer trasplante de CPH no emparentado procedente de SCU de población mexicana, en un niño de 10 años con leucemia aguda linfoblástica de células T, el cual respondió favorablemente al trasplante realizado y en este momento se encuentra en muy buenas condiciones de salud.





Dentro de los antecedentes históricos antes mencionados, se pone de manifiesto la existencia de enfermedades concernientes a la médula ósea, además de que se hace alusión a las opciones terapéuticas encontradas a lo largo del tiempo para el restablecimiento de la función hematopoyética, pero es importante involucrarnos en este tema para tener conocimiento del proceso conocido como hematopoyesis y de las condiciones que se encuentran involucradas dentro de este sistema.





2.0 Hematopoyesis

Antes de 1850 se consideraba que las células sanguíneas formadas en la vida fetal eran viables hasta la muerte del individuo y que no había necesidad de una fuente constante de nuevos elementos.¹⁷ Posteriormente se descubrió que la formación de la sangre es un proceso continuo, y fue entonces cuando se definió a este proceso como hematopoyesis; este término deriva de las raíces *hemat*= sangre y *poyesis*= formación, y es utilizado para describir la formación y desarrollo de las células sanguíneas.



La hematopoyesis se define como la serie de fenómenos entrelazados que se inician a nivel unicelular con la autoduplicación de células indiferenciadas, seguida de la diferenciación y la maduración de estas, para culminar con la producción de células de la sangre.¹⁰⁻¹²

La **autoduplicación** se refiere a la capacidad que tienen las CPH para generar progenies con las mismas características de la CPH primitiva¹²⁻¹³.





La **diferenciación** consiste en la secuencia de hechos genéticos que permiten a una célula sintetizar productos específicos, que le confieren potencialidad para determinada función, mientras que la **maduración** se define como la secuencia de fenómenos bioquímicos y morfológicos iniciados por la diferenciación y que confieren capacidad funcional a la célula.¹²

El tejido que da origen a todas las células de la sangre se conoce como **sistema hematopoyético**.¹⁰

El sistema hematopoyético incluye tejidos y órganos involucrados en la proliferación, maduración y destrucción de células sanguíneas. Estos órganos y tejidos se refieren a el sistema fagocítico-mononuclear, el bazo, los ganglios linfáticos, el timo, el hígado y la médula ósea que cumplen con funciones específicas dentro del proceso hematopoyético.¹⁷

2.1 Desarrollo de la hematopoyesis

La hematopoyesis inicia en el saco vitelino del embrión humano desde el decimonoveno día después de la fertilización.





Aunque los leucocitos y precursores plaquetarios pudieran estar presentes en el saco vitelino, la mayor parte de la actividad hematopoyética en este sitio se limita a la **eritropoyesis** (formación de eritrocitos). En esta etapa la producción celular se denomina eritropoyesis primitiva.

Cerca del tercer mes de vida embrionaria, el hígado fetal se convierte en el principal sitio de producción de células sanguíneas, mientras que el saco vitelino termina su participación en el proceso hematopoyético. En este momento la hematopoyesis se inicia también, en menor grado, en bazo, riñón, timo y ganglios linfáticos.

La formación leucocitaria y plaquetaria (mielopoyesis y megacariopoyesis) se inicia en el hígado fetal, pero la producción de estas células no se considera significativa hasta el inicio de la hematopoyesis en la médula ósea.

La médula ósea se convierte en el principal sitio de hematopoyesis en el tercer trimestre de la gestación y esta se mantiene como la principal fuente de producción sanguínea después del nacimiento y durante la vida adulta.¹⁷





2.2 El proceso hematopoyético

En una persona sana, por lo general las cantidades de células nuevas que se forman son proporcionales a las cantidades de células viejas que se pierden o mueren. 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 el proceso hematopoyético dependen de varios factores, dentro de los cuales podemos mencionar los siguientes:

- 1) El control en la producción de las diferentes citocinas que estimulan la médula ósea
- 2) El control simultáneo en la producción de las citocinas estimulantes de la médula que son de origen exógeno
- 3) La regulación en la expresión de los receptores para las citocinas hematopoyéticas, tanto en las células pluripotenciales como en las multipotenciales que van madurando, y
- 4) El control de las poblaciones de células maduras mediante la estimulación de la muerte celular programada y el inicio de la apoptosis.¹⁰





Además de la regulación involucrada en la hematopoyesis, un elemento clave dentro de este proceso es la existencia y participación de la célula progenitora hematopoyética (CPH) como elemento funcional.

2.2.1 CPH como elementos funcionales de la hematopoyesis

El proceso conocido como hematopoyesis, comienza con una CPH, que recibe señales internas, procedentes de determinados genes, e información que se encuentra en su entorno. El conjunto de señales es lo que dicta el destino de estas CPH.¹⁴

Las CPH se encuentran clasificadas de acuerdo a sus características, de la siguiente manera:

- ❖ **Totipotenciales:** Pueden dar lugar a un organismo completo. Son capaces de transformarse en cualquiera de los tejidos de un organismo.¹⁴

Por ejemplo: Cualquier célula totipotente (un óvulo fecundado por un espermatozoide) colocada en el útero de una mujer tiene capacidad de originar un feto y un nuevo individuo.^{14,1}





- ❖ **Pluripotenciales:** Son capaces de convertirse en la mayoría de los tejidos diferentes, pero no pueden generar un organismo completo.¹⁴

Por ejemplo: A partir del cuarto día del desarrollo embrionario humano se forma el blastocito. Las células de un blastocito ya no son totipotentes, puesto que una sola de estas células ya no es capaz de generar un individuo completo. Sí son capaces de generar todos los tejidos de un individuo adulto, pero no pueden generar la placenta ni otros tejidos necesarios para el desarrollo del embrión.^{14,15}

- ❖ **Multipotenciales:** Tienen un cierto grado de diferenciación o dicho de otro modo, llevan la marca de un tejido en concreto. Estas, cuentan con la capacidad de generar células, pero sólo del tipo celular del tejido al que pertenecen o residen.^{5,7}

Por ejemplo: Estas células existen, y están presentes en la mayoría de los órganos de la economía corporal del adulto, y conviviendo en su órgano con el resto de las células diferenciadas, tiene una propiedad única: dar lugar a los distintos tipos celulares que componen el órgano en el que residen con el fin, por ejemplo, de renovar las poblaciones de células que van envejeciendo.⁷





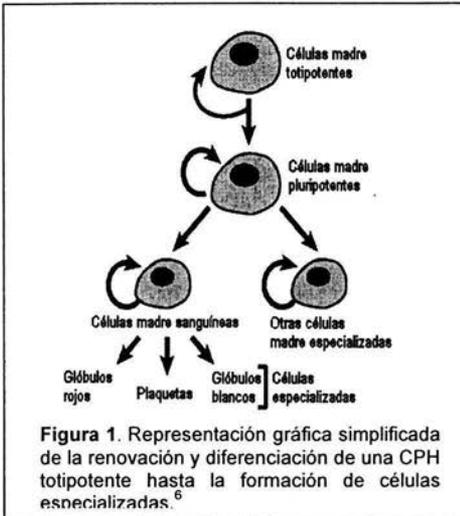
Para mantener el volumen de CPH y al mismo tiempo seguir produciendo células para reemplazar las células sanguíneas diferenciadas ya envejecidas, las CPH deben ser capaces de mantener un equilibrio respecto a la auto reproducción y diferenciación.

Lo anterior puede llevarse a cabo de una o dos maneras:

- ❖ Una CPH puede dividirse en dos células hija, una de las cuales se va a diferenciar, mientras que la otra permanece en el compartimiento de CPH (figura 1), o bien,
- ❖ Por cada CPH que produce dos células hija , de las cuales ambas se diferencian, otra CPH produce dos células hija que permanecerán en el compartimiento de CPH.

Cualquiera de los procesos antes mencionados mantendrá al compartimiento de CPH en una constante mientras produce progenie que se diferencie y reemplace células envejecidas.





Las células hija de las CPH retienen la habilidad para generar células de todos los tipos hematopoyéticos. Sin embargo, en divisiones sucesivas la progenie de las células hijas se restringe progresivamente a diferenciar en cada vez menos hijas hasta que, al cabo del tiempo, se limita a un solo tipo celular, es decir a un solo linaje.

Estas células, denominadas como progenitoras comprometidas, dan origen a células precursoras hematopoyéticas como eritroblastos y mieloblastos.¹⁷

2.2.2 Secuencia del proceso hematopoyético ¹⁷

La CPH pluripotencial da origen a CPH multipotenciales, las cuales se diferencian en CPH comprometidas. En este momento, dichas células se desarrollan hasta células maduras no proliferantes.





La CPH mieloide, llamada unidad formadora de colonias de granulocitos, eritrocitos, monocitos, megacariocitos (UFC-GEMM), y la CPH linfoide, llamada unidad formadora de colonias de linfocitos (UFC-L), se originan de la CPH pluripotencial. Por lo tanto, estas células se llaman CPH multipotenciales.

Al cabo del tiempo, bajo el control de factores de crecimiento hematopoyético específicos, las CPH multipotenciales se comprometen en un solo tipo celular y entonces con toda propiedad se les denomina células de un solo linaje o CPH comprometidas.

La CPH comprometida mieloide, se diferencia hasta formar tipos celulares específicos, mientras que la CPH comprometida linfoide se diferencia hasta originar linfocitos B y linfocitos T.

Cada una de estas CPH es nombrada por el tipo celular al cual están comprometidas, por ejemplo:

- ❖ UFC-M Para el tipo celular monocítico
- ❖ UFC-Meg Para el tipo celular megacariocítico.
- ❖ UFC-E Para el tipo celular eritroide
- ❖ UFC-G Para el tipo celular granulocítico





La secuencia del proceso hematopoyético, se presenta en el siguiente esquema:

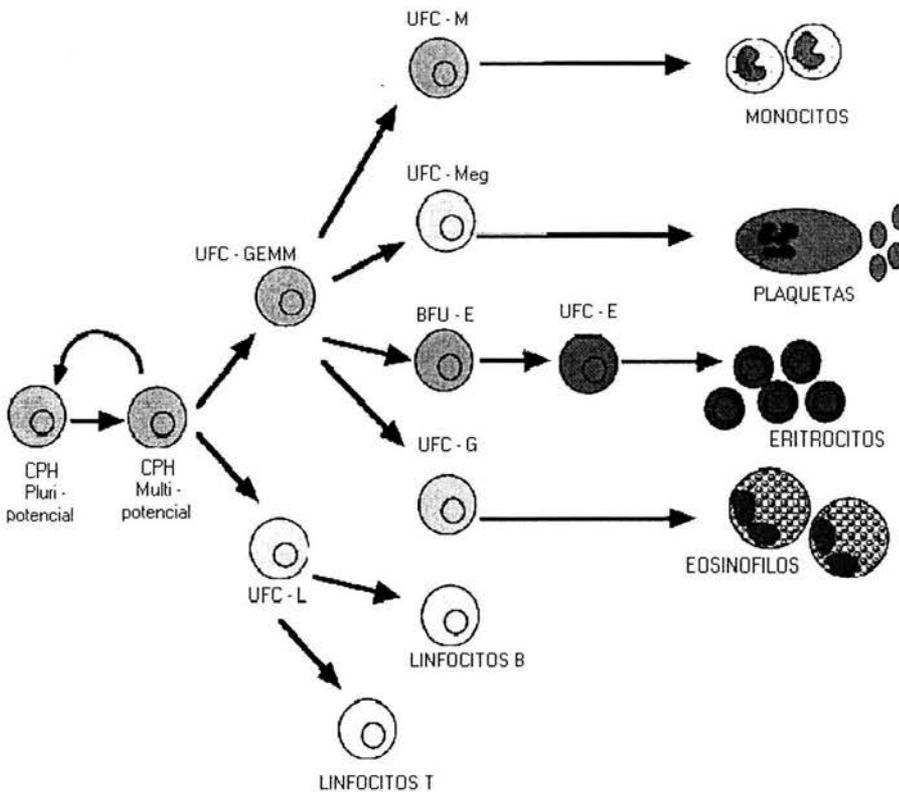


Figura 2. El proceso hematopoyético

Se ha hablado del importante papel que tienen las CPH como unidades funcionales de la hematopoyesis, pero ¿qué son las CPH?, ¿cómo podemos identificarlas? y ¿cuales son las características que definen a estas células?...





3.0 Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH)

El perpetuo misterio de la vida se concreta, desde una perspectiva meramente biológica, en cómo la gran complejidad de un organismo se encuentra pre-programada en un minúsculo cigoto (célula totipotencial), que tras su implantación y con la ayuda del ambiente propicio aportado por la madre, desarrolla todo su potencial biológico, generando toda una constelación de tipos celulares, que de una forma sorprendente van dando forma y vida a un nuevo ser.¹⁸

De manera natural, los tejidos del cuerpo a lo largo de la vida sufren un desgaste, del que se defienden desarrollando la capacidad intrínseca de auto renovación. De no existir esta renovación, se reduciría considerablemente la esperanza de vida de los seres vivos.¹⁶



3.1 Importancia de las CPH

El papel de las CPH dentro de el proceso de renovación en el organismo, es muy importante, debido a que estas células cuentan con dos importantes propiedades:





1. Pueden generar mas CPH, por medio de un proceso de auto renovación.
2. Tienen el potencial de diferenciarse hacia varios células progenitoras que eventualmente madurarán a lo largo de caminos específicos.

El resultado final de esos eventos es la producción continua de suficiente, pero no excesivo, número de células de todas las líneas (células rojas y blancas, células linfoides, etc.).¹³

Las CPH tienen la habilidad para balancear la auto renovación contra las decisiones del destino de diferenciación; una sola CPH produce al menos de 8 a 10 distintas líneas de células maduras.²⁰

Aunque las CPH cuentan con una extensa capacidad proliferativa que las llevan a producir un gran número de progeñie madura; la cantidad de CPH es muy baja ya que cuentan con una frecuencia de 1 en 10 000 para un total de 100 000 células sanguíneas totales.²⁰

Investigaciones recientes han demostrado que el concepto clásico de CPH tiene que ser renovado, puesto que antes se pensaba que las CPH estaban únicamente implicadas en la regeneración del linaje, tejido u órgano en el cual estaban alojadas.





Ahora se ha podido comprobar que las CPH, pueden ser utilizadas para la reparación de daños inducidos en corazón, músculo, cerebro, hígado, epitelios y vasos sanguíneos .

Estas contundentes evidencias enmarcan un nuevo concepto que se viene denominando como "plasticidad" de la CPH y que se concreta en el hecho de que una CPH posee la capacidad intrínseca de ejecutar una gran variedad de programas genéticos de desarrollo, y las decisiones sobre cuál llevar a cabo vienen determinadas por el entorno en el que se encuentran.¹⁸

Cada día salen a la luz nuevos ejemplos de CPH que producen células especializadas diferentes de las esperadas. Esto demuestra que las CPH son mucho más flexibles de lo que se pensaba.¹⁵

La importancia primordial de las CPH, radica en que de aquí se derivan grandes expectativas de terapias innovadoras, que podrán ser aplicadas en pacientes con diversas enfermedades, para que de esta manera ellos tengan una esperanza de vida.¹⁵





3.2 Características de las CPH

En el organismo adulto, no todas las CPH participan activamente en el proceso de regeneración y mantenimiento de la funcionalidad. Sólo unas pocas CPH están contribuyendo de forma simultánea en un momento dado. La mayoría se encuentra en un estado de reposo (conocido como quiescencia), lo que las protege tanto de agresiones externas, físicas o químicas, como del proceso de envejecimiento celular.¹⁸

A partir del análisis sistemático se ha encontrado que las CPH expresan en su superficie un antígeno que permite la identificación de poblaciones raras altamente enriquecidas de CPH. Dicho antígeno se conoce como CD34+ el cual es una glicoproteína única transmembranal de 105-120 kD, que se encuentra asociado con CPH humanas y es un antígeno leucocitario específico para la diferenciación celular. La función normal de la molécula CD34 en la hematopoyesis permanece aún sin ser descubierta. Algunos estudios han descrito un potencial rol en la adhesión celular²⁰

El CD34+ se encuentra presente en CPH inmaduras y en todas las unidades formadoras de colonias de células hematopoyéticas en médula ósea, pero esta ausente en casi todas las células hematopoyéticas diferenciadas.²⁰





El antígeno CD34+ es el marcador universal de las CPH por lo que su identificación, purificación y caracterización ha sido posible mediante estudios inmunofenotípicos.²⁰

La identificación de CD34+ en las células por medio de la citometría de flujo es el método preferente para la cuantificación de CPH.²¹

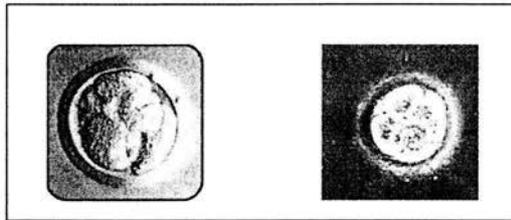


Figura 3. Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH).^{15,23}

Las fuentes principales de CPH son:

- ❖ **Médula ósea** : Una fuente abastecedora de CPH es la médula ósea de un adulto. Las células madre de la médula ósea de los adultos, producen normalmente glóbulos rojos y células de la médula ósea.¹⁹ La frecuencia de las CPH CD34+ en este tejido es de 1 - 4 % de las células mononucleadas.²⁸



- ❖ **Sangre periférica:** En individuos normales, bajos números de células CD34+ pueden ser identificados en la sangre periférica. Estas células pueden ser movilizadas desde la médula hasta la sangre en un significativo número por medio de la quimioterapia.²¹ En la sangre periférica, en condiciones basales, los progenitores hematopoyéticos CD34+ representan el 0.01 – 0.1% del total de células.⁸
- ❖ **Sangre de Cordón Umbilical (SCU):** La tercera opción como fuente de CPH es la SCU, que normalmente es eliminada después de un parto o de una cesárea.¹⁹ La proporción de las CPH CD34+ en SCU presenta valores que oscilan alrededor del 0.4% de las células mononucleadas.²⁸

Ya que conocemos algunas características de estas células tan especiales denominadas células progenitoras hematopoyéticas, que tenemos una idea de donde se ubican dentro del organismo y que sabemos cual es la proporción en la que estas se encuentran, es importante conocer cuales son las técnicas que se emplean para la obtención de las mismas.





4.0 Obtención de las CPH

Las CPH provenientes de una variedad de tejidos ofrecen grandes promesas para la regeneración de la hematopoyesis, basada en las terapias de trasplante así como en el eventual desarrollo de protocolos de terapia génica efectiva.²⁰

La fuente de CPH se ha ido ampliando en estos últimos años obteniéndose de médula ósea, sangre periférica movilizada y más recientemente de sangre de cordón umbilical, además de que, los avances en investigaciones dentro de esta área de la ciencia han permitido optimizar los métodos de obtención de CPH provenientes de dichas fuentes.²⁴



4.1 Obtención de CPH a partir de médula ósea

La técnica de obtención de médula ósea (MO) como fuente de CPH a partir del donante, quedó establecida con pocas modificaciones a partir de la descripción inicial de Thomas y Storb en 1970.⁸





La obtención de la MO es realizada en condiciones estándar de esterilidad y se lleva a cabo en el quirófano, bajo efectos de anestesia general en el donante. La recolección consiste en realizar repetidas punciones aspirativas, con agujas largas, especialmente diseñadas para la “cosecha” de MO, en las crestas iliacas posteriores; si es necesario obtener un número mayor al alcanzado por medio de la aspiración en las crestas iliacas posteriores, se realiza otra serie de punciones aspirativas en las crestas iliacas anteriores o bien, en contadas ocasiones, estas punciones son llevadas a cabo en el esternón.^{8,25}

El producto de cada aspiración se recoge en un recipiente que contiene un medio de cultivo, para mantener la máxima viabilidad celular, y heparina, para evitar la coagulación de la médula; dicho producto así obtenido se pasa a través de filtros metálicos, para convertir los grumos medulares en suspensiones mononucleares y eliminar las partículas óseas del aspirado.⁸

Finalmente, la médula ósea obtenida se trasvasa, en condiciones asépticas, a bolsas de transfusión convencionales y se infunde por vía intravenosa al paciente mediante un filtro estándar de transfusión.⁸

La MO obtenida es usualmente infundida fresca al receptor el mismo día de la recolección.





Aunque si bien la criopreservación de la MO obtenida de esta manera ha sido reportada como exitosa, esto no es comúnmente llevado a cabo.²⁵

Después de la recolección de la MO, el donante puede necesitar una transfusión de sangre para reemplazar los hematíes y el plasma perdidos durante la extracción de la misma. Por tal motivo, es recomendable que done su propia sangre varios días antes de la extracción de la médula ósea con el fin de reinfundírsela durante la intervención.⁸

4.2 Obtención de CPH a partir de sangre periférica movilizada

En 1975 Barr y Whang-Peng pusieron de manifiesto la presencia de CPH en la sangre periférica de humanos. En 1977, Nothurf y colaboradores, trabajando en perros consiguieron regenerar la médula de los animales letalmente irradiados mediante la infusión de células mononucleadas de sangre periférica.⁸

El camino mas efectivo para promover la movilización de las CPH en sangre periférica es el uso de la quimioterapia y de factores de crecimiento hematopoyéticos. La combinación de estos dos tratamientos tiene un efecto sinérgico.²⁵





A diferencia de la recolección de MO, la recolección de las CPH de sangre periférica se realiza en régimen ambulatorio, por aféresis, mediante una selección positiva de las células CD34+ utilizando anticuerpos monoclonales contra los antígenos CD34. Previamente, al donante se le administran factores de crecimiento hematopoyético durante 4 días, realizándose el proceso de aféresis el 5º día, con la finalidad de incrementar el número de CPH en sangre periférica y de esta manera poder hacer la recolección con el menor número posible de aféresis. Por regla general se precisan de 1 a 2 aféresis para obtener el número de células necesarias para un trasplante.⁸

4.3 Obtención de CPH a partir de sangre de cordón umbilical (SCU)

Hace unos años, un grupo de investigadores encontró en un sistema animal de experimentación, que la sangre de los animales recién nacidos contenía altas concentraciones de un tipo especial de células (actualmente identificadas como CPH), que al ser trasplantadas en animales que previamente habían sido expuestos a dosis letales de irradiación, eran capaces de revertir dicho efecto letal en ellos.⁹





Este trabajo se extendió a la sangre humana del cordón umbilical, y se observó que las células del cordón tenía un potencial substancial para ser usadas en trasplantes.⁹ Es por esto que en años recientes la SCU ha emergido como un recurso alternativo de CPH para ser utilizadas en trasplante alogénico.⁶

Se han descrito diversas técnicas en la literatura, encaminadas a obtener el mayor volumen posible de SCU sin asumir riesgos innecesarios tanto para la madre como para el recién nacido, como en lo que se refiere a contaminación de la muestra.¹ La recolección de la SCU es un procedimiento simple, no invasivo y compatible con la práctica rutinaria obstétrica.⁸

Actualmente se ha optimizado un procedimiento inspirado en la técnica descrita por Broxmeyer.¹

La recolección de la SCU, ya sea en parto eutócico o cesárea se lleva a cabo mientras la placenta se encuentra aún dentro del útero, es decir, *in útero*.¹

Previo a la recolección de la SCU se realiza la toma de aproximadamente 8 ml de sangre materna, la cual será depositada en dos tubos, uno con anticoagulante y otro sin anticoagulante para realizar las determinaciones serológicas correspondientes.





La técnica para llevar a cabo dicha recolección consta de los siguientes puntos:

- 1) Preparación del campo operatorio en condiciones de máxima asepsia
- 2) Asistencia al momento del nacimiento del feto con la liberación de circulares de cordón umbilical, si las hubiera y sin seccionarlas.
- 3) Antes de que trascurren 30 segundos, realizar el doble pinzaje del cordón umbilical a 3 o 4 cm del ombligo; para ello se utiliza una pinza de cordón y una pinza de presión
- 4) Realizar el corte del cordón umbilical entre las dos pinzas antes descritas, separar al recién nacido y entregarlo al personal del área de pediatría,
- 5) Aseptizar el cordón umbilical, utilizando una gasa con solución iodada de povidona, realizando un barrido de la zona mas alejada del canal vaginal, hacia arriba, dejar en el canal vaginal la gasa para evitar la contaminación con sangre proveniente del canal vaginal.
- 6) Identificar y puncionar la vena umbilical en el lugar mas distante posible, justo arriba de la pinza, con la aguja incorporada a la bolsa estéril de recolección, dicha bolsa contiene 25 mL de citrato fosfato dextrosa (CPD) que sirve como anticoagulante.





- 7) Recolectar la sangre por gravedad hacia la bolsa con anticoagulante, realizando una agitación constante de la bolsa en forma circular para evitar la formación de coágulos y favorecer el flujo.
- 8) Ejecutar una presión suave del cordón de forma centrífuga para ayudar a su vaciamiento
- 9) Realizar una presión suave del cordón de forma centrípeta con posterior pinzaje a la altura del perineo, para practicar una segunda punción previa aseptización de la zona
- 10) Después de recolectar el volumen máximo de sangre, se procederá al alumbramiento de la placenta
- 11) Una vez que la placenta sea retirada de la madre, realizar el corte de un fragmento del cordón de aproximadamente 2 cm de largo, el cual será depositado en un recipiente apropiado.¹

El personal sanitario que efectúa la recolección, es el responsable de colocar nuevamente todo el material obtenido en una bolsa de plástico con cierre hermético y lo hará llegar en las condiciones óptimas al banco de sangre de cordón umbilical para que se lleve a cabo el procesamiento de la SCU.





Una vez que la unidad de SCU se encuentra en el banco de sangre de cordón umbilical y antes de que hayan transcurrido 40 horas desde el momento de la toma de muestra, se lleva a cabo el procesamiento de dicha unidad, el cual esta fundamentado en la reducción de volumen por agotamiento de plasma y eritrocitos sin pérdida significativa de células nucleadas; una vez que la unidad fue procesada, se le agrega un crioprotector como el dimetil sulfóxido (DMSO) y por medio de un proceso controlado de enfriamiento, se criopreserva en nitrógeno líquido a -196°C , de esta manera la unidad de SCU queda criopreservada para ser utilizada en trasplante de CPH.²⁶⁻²⁷

Haciendo una comparación entre las tres fuentes principales de CPH, observamos que tanto la obtención de MO, como la movilización de CPH en sangre periférica, requieren un compromiso por parte del donador, ya que, por ejemplo, en el caso concreto de la MO, el donador tiene que estar involucrado con el procedimiento, hasta el punto que debe someterse a una intervención quirúrgica; para el caso de la movilización de CPH en sangre periférica el paciente tiene que estar en contacto con sesiones de quimioterapia y tratamiento por lo menos cuatro días antes de que se lleve a cabo la aféresis para poder obtener las CPH.





Ahora bien, si hacemos un análisis acerca de la obtención de CPH provenientes de SCU, podemos ver que esta no con lleva un compromiso con el procedimiento como el que implican los otros dos métodos de obtención, pero es importante tomar en consideración que la obtención de la SCU es un evento único, ya que la placenta y el cordón umbilical, como bien se sabe, son productos perecederos que pueden servir como fuente de CPH una sola ocasión, mientras que la obtención de médula ósea y la obtención de CPH en sangre circulante por aféresis pueden ser llevadas a cabo en varias ocasiones en un mismo individuo.

De acuerdo a la información anterior, podemos decir que una de las mejores opciones de fuente de CPH es la SCU, ya que presenta muchas ventajas sobre otros tejidos al momento de llevar a cabo el procedimiento de recolección de la misma, pero ¿qué otras características presenta la SCU, que la puedan proponer como el mejor recurso de CPH?





5.0 Sangre de cordón umbilical como fuente de CPH

La sangre de cordón umbilical ha demostrado contener CPH en cantidad suficiente para proveer un trasplante duradero, favoreciendo principalmente a aquellos pacientes que no cuentan con donadores familiares compatibles.

La facilidad en el procedimiento de obtención de la SCU, la baja prevalencia de enfermedades transmisibles, así como la posibilidad de realizar la recolección de muestras procedentes de diferentes grupos étnicos, son ventajas adicionales que hacen de este recurso uno de los mejores para la obtención de CPH.^{1,4,6}



Además de las facilidades que presenta el proceso de recolección de SCU como fuente de CPH, existen una gran variedad de ventajas que ratifican a este recurso como uno de los mejores.





Entre estas ventajas podemos encontrar:

- 1) La SCU cuenta con un número alto de CPH
- 2) Existe un gran número de donantes potenciales, ya que por ejemplo, sólo en México suceden más de 2.2 millones de alumbramientos por año.²⁹
- 3) Se puede mantener un balance étnico dependiendo de la región geográfica donde se haga la recolección de la SCU, lo que se traduce en CPH con características específicas de región geográfica y por tanto mayores posibilidades de encontrar SCU compatibles para personas ubicadas dentro de estos lugares.
- 4) Existe muy poco o nulo riesgo para el donante de SCU, es decir para el recién nacido y su madre.
- 5) La SCU tiene baja prevalencia en cuanto a algunas enfermedades infecciosas, en particular citomegalovirus, el cual puede provocar mortalidad en el paciente trasplantado
- 6) Las CPH procedentes de SCU se encuentran disponibles, ya que están congeladas y listas para ser utilizadas en trasplante
- 7) Existe baja intensidad de la enfermedad de injerto contra huésped, ya que se pone de manifiesto la tolerancia de diferencias en el sistema HLA.





- 8) La concentración de células formadoras de colonias (CFC) en la SCU es extremadamente alta, en ocasiones promediando 3,000 CFC por mililitro. Este número es tan alto como el que encontramos en la médula ósea, y mucho más alto que el de sangre periférica adulta no movilizada.⁹

Además de toda la información antes descrita, es importante mencionar que el uso de la SCU puede hacer que los trasplantes de CPH estén disponibles más rápidamente para las personas que los necesitan.

Cada año, se realiza el diagnóstico de aproximadamente 30.000 personas que se encuentran en condiciones que pueden tratarse con un trasplante de médula ósea. Pero las estadísticas indican que de este total de personas:

- Aproximadamente el 25% tiene un pariente cuyo tejido es compatible
- Otro porcentaje, tiene la posibilidad de ubicar donantes adecuados a través de registros de médula ósea nacionales; en la mayoría de los casos, la búsqueda da como resultado la ubicación de donantes adecuados dentro de los cuatro meses siguientes, pero únicamente para la mitad de este grupo de personas.
- Las que se encuentran ubicadas como miembros de grupos étnicos y raciales no blancos tienen menores posibilidades de ubicar un donador con médula ósea compatible.





Analizando la información anterior, encontramos que las oportunidades para las personas que padecen enfermedades graves de la sangre, que pueden ser tratadas con un trasplante de médula ósea, son muy reducidas, pero afortunadamente estas posibilidades en la actualidad se encuentran en un número mayor gracias a la existencia de la SCU como fuente de CPH y a las amplias ventajas que este recurso de CPH representa.

Hemos hablado acerca de la técnica de recolección de la SCU, y del gran número de ventajas que esta presenta como fuente de CPH pero, ¿cómo podemos estar seguros de que la sangre que se recolecta, es realmente SCU y no sangre materna? y ¿cuales son las condiciones que se encuentran presentes al momento de la recolección?...





6.0 Procedencia de la sangre de cordón umbilical

La vida del feto depende totalmente del organismo de la madre, en efecto, el no es capaz por si sólo de alimentarse, ni de eliminar los materiales de deshecho, todas estas funciones se hacen posibles por la presencia de la placenta y el cordón umbilical, que constituyen un auténtico puente entre el feto y la vida exterior.³⁰

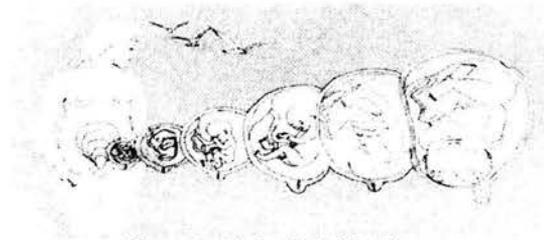


Figura 4 . Evolución del feto humano

Inmediatamente después del parto se producen un conjunto de modificaciones de los sistemas respiratorio y cardio-circulatorio del recién nacido, que le permitirán poder auto suministrarse de O_2 y eliminar el CO_2 , resultante de su metabolismo.³¹



La función del cordón umbilical y de la placenta, esta directamente relacionada con la circulación fetal.





Esta circulación difiere mucho de la del adulto, ya que en el corazón del feto hay una comunicación directa entre la parte derecha y la parte izquierda a través del agujero de "Botal"; en el conducto arterioso, existe una conexión por debajo del corazón que comunica la aorta con la arteria pulmonar y a nivel del hígado, la vena aorta está conectada directamente con la vena cava inferior. En el cordón umbilical, la vena umbilical lleva sangre arterial, mientras las dos arterias retiran la sangre venosa fetal. La placenta ejerce un efecto de filtro ya que esta permite el paso hacia el feto solo de algunas sustancias bloqueando el paso de otras.³⁰

Después del parto ocurren una serie de modificaciones en un corto periodo de tiempo, dichas modificaciones no ocurren de forma secuencial.

Cuando el feto nace, el primer fenómeno es habitualmente el colapso de las arterias umbilicales. El flujo a través de la vena umbilical persiste durante algunos minutos después del parto, antes de la sección o ligadura del cordón, permitiendo de esta manera el retorno de sangre de la placenta hacia el niño.





De esta manera la sangre remanente que queda en la placenta y el cordón umbilical una vez que el recién nacido ha sido separado de estos, es sangre procedente del recién nacido, lo que garantiza que al momento de llevar a cabo la recolección de la misma, estamos seguros que no se trata de sangre materna . Este producto biológico es el que se denomina "Sangre de Cordón Umbilical ", y es aquel que debido a las características que presenta, tiene un alto contenido de células progenitoras hematopoyéticas .

Ya definimos la procedencia de la SCU, y los fenómenos que ocurren desde el nacimiento hasta la recolección de esta. Además, hasta este momento, la información contenida en estas generalidades nos ha permitido ubicarnos en un punto tal, que sabemos cual es la importancia de las CPH, su rol dentro de la hematopoyesis así como cuales son las fuentes en las que estas se encuentran presentes y en que cantidad. Ahora lo que debe centrar nuestra atención es ubicarnos dentro del contexto de esta tesis, por lo tanto la pregunta que surge es: de acuerdo a la literatura ¿cuales son los factores maternos y neonatales que pueden tener una influencia directa sobre la recuperación de las CPH procedentes de la SCU?...





7.0 Relación entre factores maternos, neonatales y CPH

El potencial terapéutico de las células madre es enorme. Basta pensar en la cantidad de personas que todavía mueren a la espera de un trasplante de órgano vital, a sabiendas que de conseguir un donante adecuado, esto les ofrecería unos cuantos años con calidad de vida. En otros casos, algunos órganos del paciente sufren daños debidos a procesos traumáticos, patológicos o causados por hábitos insanos, que solamente pueden ser aliviados mediante complejos procedimientos clínico-quirúrgicos. La tecnología asociada a la manipulación de CPH empieza a ofrecer un futuro en todos estos campos¹⁸.

Las posibilidades pueden tornarse mas amplias para estos pacientes, si se logran encontrar factores que se encuentren relacionados con una buena recuperación de CPH procedentes de SCU, que nos permitan obtener unidades con una alta calidad hematopoyética, lo que se traduce directamente en mayores posibilidades de éxito en el trasplante de las mismas.



El determinar la relación existente entre los factores maternos y neonatales y la obtención de unidades de SCU de alta calidad hematopoyética, puede tornarse una tarea muy compleja.





Para facilitar esta tarea es necesario, inicialmente, tomar en consideración cuales son aquellos factores que se encuentran involucrados en la obtención de recién nacidos sanos.

En principio, es importante mencionar que el peso del producto al nacer es determinante para establecer la probabilidad de sobrevivida de un niño; por ende, este factor resulta una muy buena referencia para determinar si el recién nacido se encuentra en condiciones óptimas o no.

Uno de los factores que se asocian mas frecuentemente al peso del recién nacido es la nutrición de la madre. La importancia de la alimentación en el desarrollo normal del embarazo, tanto para la salud de la madre como para el niño ha sido muy reconocida. Existen estudios que establecen relación entre la alimentación de la madre y el peso del niño al nacer. A medida que se reduce la calidad y cantidad de la alimentación de la madre embarazada, menor es el peso del niño al nacer. Por el contrario, a una dieta óptima, durante el embarazo corresponde un peso adecuado del niño al nacer³³.

Es importante tomar en consideración que, las características de los individuos cambian de una región geográfica a otra, por esta razón no es posible unificar los valores de referencia, es decir, cada región tendrá sus propios valores que





serán validos únicamente para esa población en particular; en este rubro, la alimentación de la mujer embarazada y el peso del recién nacido no son la excepción, siempre estarán directamente relacionados con la región geográfica de la que se este hablando.

Un ejemplo de lo anterior, se muestra en el siguiente apartado, donde se pone de manifiesto la variabilidad existente entre individuos con respecto a factores maternos y neonatales involucrados en la obtención de CPH.

7.1 Experiencia a nivel mundial

7.1.1 Estados Unidos de Norteamérica

Un grupo de investigadores de la universidad de Massachussets en Estados Unidos de Norteamérica realizó una investigación sobre la influencia de factores maternos y neonatales sobre la recuperación de CPH dentro de un grupo de donadoras de SCU en ese país.

Estudiaron el efecto de las características neonatales como el número de nacimiento, el peso del recién nacido, las semanas de gestación y el sexo del recién nacido. Ellos encontraron que la raza y la edad materna no tienen efecto sobre los parámetros de laboratorio estudiados.





Por medio de análisis multivariados llegaron a la conclusión de que los recién nacidos con una edad de gestación mayor tuvieron altas cuentas celulares, pero bajos conteos de CD34+; recién nacidos con mayor peso tuvieron altos conteos celulares y más células CD34+, las mujeres que tenían menor número de nacimientos previos también produjeron unidades de SCU con altos conteos celulares y altos conteos de CD34+.

De acuerdo a estos resultados, investigadores de USA indican que el donador ideal de SCU en este país debe ser: primero o segundo embarazo, bebés con edades gestacionales menores o iguales a 40 semanas y pesos del recién nacido altos. Ahora bien el sexo del bebé, la edad de la madre y la raza de la misma no son factores que tengan una relación directa con la obtención de unidades de SCU de alta calidad hematopoyética.⁴

7.1.2 Japón

Otro grupo de investigadores en Japón realizó un estudio muy similar con unidades de SCU recolectadas en donadoras de este país. Los resultados que ellos reportan son los siguientes: los recién nacidos femeninos están asociados con números altos de células nucleadas totales, semanas de gestación altas están asociadas con un número alto de células nucleadas totales pero con bajo rendimiento de células CD34+ y además encuentran que edades más cortas en





las donadoras se encuentran asociadas con un alto rendimiento de células CD34+. ³²

De acuerdo al ejemplo de las dos investigaciones anteriores podemos darnos cuenta que, mientras para los investigadores de Estados Unidos de Norteamérica el sexo del recién nacido y la edad de la madre no son factores que tengan una relación directa con la recuperación de CPH; para los investigadores de Japón estos factores si muestran una relación directa en la obtención de unidades de SCU de alta calidad hematopoyética.

Lo anterior nos permite observar que los factores maternos y neonatales que se encuentran relacionados en la recuperación de CPH varían de población a población, razón por la cual es muy importante determinarlos dentro de la población de mujeres y recién nacidos mexicanos para tener un marco de referencia que nos permita favorecer la captación de madres embarazadas que cumplan con ciertas características, tales, que nos permitan obtener unidades de SCU con una alta calidad hematopoyética que puedan ser utilizadas en trasplante de CPH.





II. OBJETIVOS

1. Establecer los factores maternos y neonatales que influyen en una buena recuperación de células progenitoras hematopoyéticas procedentes de sangre de cordón umbilical, basándose en la determinación de cuenta total de células nucleadas, determinación del marcador celular CD34+ así como el porcentaje de recuperación de estas células después del procesamiento de la unidad de sangre de cordón umbilical.

2. Proponer un modelo de donador que cuente con características específicas que favorezcan la captación, procesamiento y criopreservación de unidades de sangre de cordón umbilical de alta calidad que podrán ser utilizadas en trasplante hematopoyético.





III. HIPÓTESIS

Los factores maternos (edad, semanas de gestación, número de gesta) y los factores neonatales (sexo del recién nacido, peso del recién nacido) tienen influencia directa sobre la obtención de CPH procedentes de sangre de cordón umbilical en población mexicana.





IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo el presente estudio, se tomaron en consideración 157 unidades de sangre de cordón umbilical (SCU) validadas y criopreservadas en el Banco de Sangre de Cordón Umbilical del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea (BSCU-CNTS). Dichas unidades fueron captadas en tres hospitales de la Secretaría de Salud ubicados en la ciudad de México y cumplen con los criterios de aceptación referidos en NETCORD-FAHCT (vease tabla 1 de factores de inclusión y exclusión).





UNIDAD MATERNA		UNIDAD DE PROCESAMIENTO	
Factores de inclusión	Factores de exclusión	Factores de inclusión	Factores de exclusión
<ul style="list-style-type: none">❖ Madre > 18 años❖ Semanas de gestación (SDG) > 34❖ Consentimiento informado de la madre	<ul style="list-style-type: none">❖ Anemia (Hb<10 g/dl)❖ Factores de riesgo de enfermedades transmisibles por vía sanguínea❖ Enfermedades genéticas neoplásicas y autoinmunes❖ Evidencia de infección activa❖ Isoinmunización materno-fetal❖ Sospecha de sufrimiento fetal❖ Complicaciones obstétricas	<ul style="list-style-type: none">❖ Volumen de SCU > 80 ml❖ Tiempo < 40 horas desde la recolección❖ Celularidad > 8×10^8 CNT	<ul style="list-style-type: none">❖ Cultivos microbiológicos positivos❖ Serología infecciosa positiva❖ Recuperación < 60% de CNT después del proceso

Tabla 1. Factores de inclusión y exclusión de unidades de SCU.

Cabe señalar que estas unidades fueron seleccionadas para ser procesadas y criopreservadas, de un total de 368 unidades de SCU recolectadas.

Las causas de rechazo de las unidades NO procesadas y criopreservadas son las que se presentan en la gráfica 1.





Gráfica 1. Causas de exclusión de las unidades NO validadas unidades totales n= 368 , unidades NO validadas n= 211

Es evidente que el porcentaje de unidades NO validadas es mayor al 50% de las unidades totales recolectadas. Lo anterior refleja el control de calidad estricto que maneja el BSCU-CNTS con el fin de únicamente llevar a cabo el procesamiento y criopreservación de unidades de SCU de alta calidad hematopoyética que posteriormente podrán ser utilizadas en trasplante de CPH.

Para determinar cuales son las unidades que serán analizadas, procesadas y criopreservadas en el BSCU-CNTS, se utiliza el siguiente procedimiento:





Las unidades de SCU recolectadas en la unidad materna que cuentan con todos los requerimientos necesarios (figura 5), es decir, con la firma de consentimiento informado de la madre, dos muestras de sangre materna (utilizadas para estudios de serología), una cantidad suficiente de SCU recolectada (mayor a 80 mL), un fragmento de cordón umbilical así como la documentación requerida por el BSCU-CNTS, son transportadas desde la unidad materna hasta el BSCU-CNTS en condiciones óptimas, para que, ya validadas, estas sean analizadas, procesadas y criopreservadas.

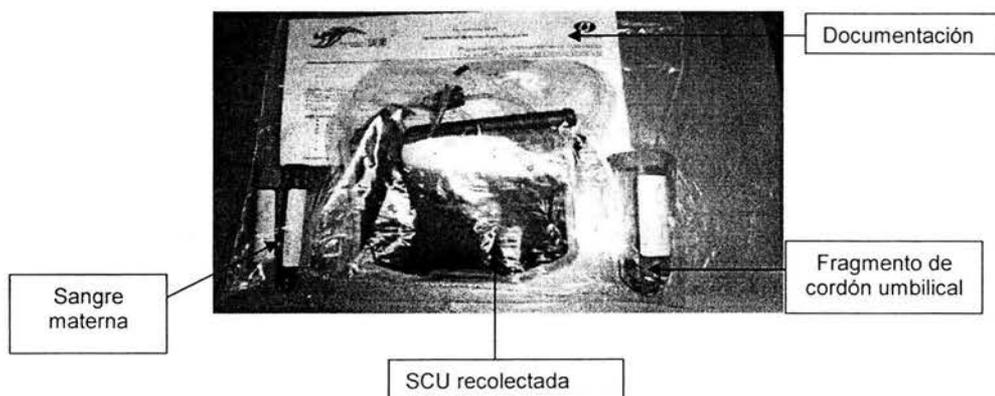


Figura 5. Unidad de SCU recolectada en unidad materna



Si la unidad es validada con respecto a unidad materna, entonces se determina si cumple con los criterios de volumen, es decir mayor a 80 mL, así como con los criterios de celularidad, para ello, se hace una biometría hemática a la SCU y se valida si el No. de glóbulos blancos totales iniciales es mayor a 8×10^8 .

En caso de que la unidad cumpla con dichos requisitos, pasa entonces por un proceso de reducción de volumen por agotamiento de plasma y eritrocitos sin pérdida significativa de células nucleadas.

Este procesamiento de las unidades de SCU es llevado a cabo de acuerdo a Procedimientos Normalizados de Operación (PNO) validados, el BSCU-CNTS cuenta con la tecnología para llevar a cabo tanto el procesamiento (figuras 6 y 7) como la criopreservación (figura 8) de manera automatizada, de estas unidades de SCU.



Figura 6. SEPA-X-BIOSAFE equipo automatizado para proceso de reducción de volumen de SCU.



Figura 7. Unidad de SCU procesada y lista para su criopreservación.



Figura 8. BIOARCHIVO equipo automatizado de disminución controlada de temperatura para criopreservación de unidades de SCU.





Las 157 unidades de SCU validadas que fueron incluidas para el estudio, cuentan con información de factores maternos, neonatales así como de datos propios del procesamiento de concentración celular que fue llevado a cabo para cada una de dichas unidades.

Para el análisis, los factores maternos y neonatales así como los valores de procesamiento de las unidades, se incluyeron dentro de una Red Bayesiana de factores continuos y discretos, en donde cada factor para su representación es considerado como un nodo o componente dentro de una red de factores.

En estas redes se intenta establecer las posibles relaciones de influencia o causalidad entre los factores, mismas que una vez establecidas son representadas por medio de flechas dirigidas de uno a otro factor o nodo.

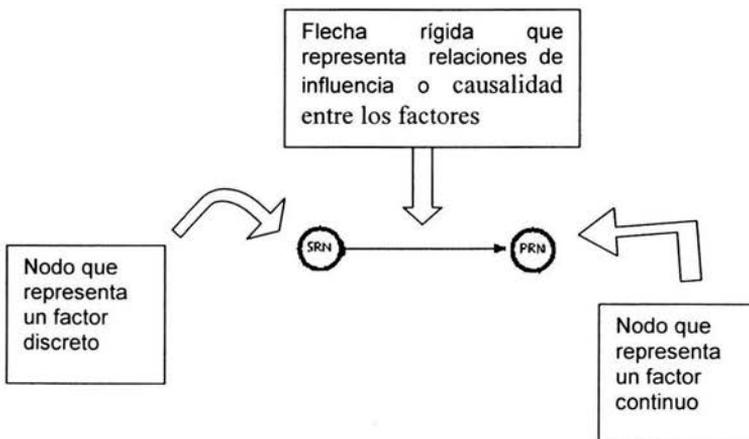


Figura 9. Representación de los componentes básicos de una red bayesiana





El cálculo de la red se realiza a partir de las probabilidades a priori de los factores y de las probabilidades conjuntas entre los mismos, considerando las posibles relaciones entre ellos. El cálculo involucra probabilidades condicionales de todos los factores en relación a los factores que los definen en una red global, además de que incluyen procedimientos de perturbación y evaluación de las redes obtenidas, hasta la red final que en definitiva establece las mejores relaciones de acuerdo a los datos que se involucran dentro de la misma.



V. RESULTADOS

Las redes de factores que se presentan muestran las relaciones de causalidad obtenidas a partir del análisis de nuestros datos. En la primera red (figura 10) se presenta un análisis de seis factores con la finalidad de mostrar puntualmente la consistencia que los datos tienen con relación a lo que se identifica como factores importantes en una serie de factores definida; en este caso se considera el sexo del recién nacido (SRN), el peso del recién nacido (PRN), los mililitros de sangre de cordón umbilical recolectados (MLSCU), el porcentaje de CD34+ totales (PCCD34T), así como las células CD34+ totales y viables en la unidad de SCU (CD34T y CD34V respectivamente).

Este ejemplo nos permite mostrar el efecto que el peso del recién nacido tiene sobre los mililitros de SCU recolectados, mismos que a su vez tienen un doble papel al explicar el Porcentaje de células CD34+ viables y las células CD34+ totales, lo que en conjunto explica a su vez los valores de las células CD34+ Viables.





Estas redes puntuales permiten establecer la evidencia del impacto real de modificar algún valor dentro de la serie de factores involucrados, pudiendo establecerse que la variable mas sensible en cuanto a impacto sobre las células CD34+ totales y viables fue el volumen de SCU recolectado.

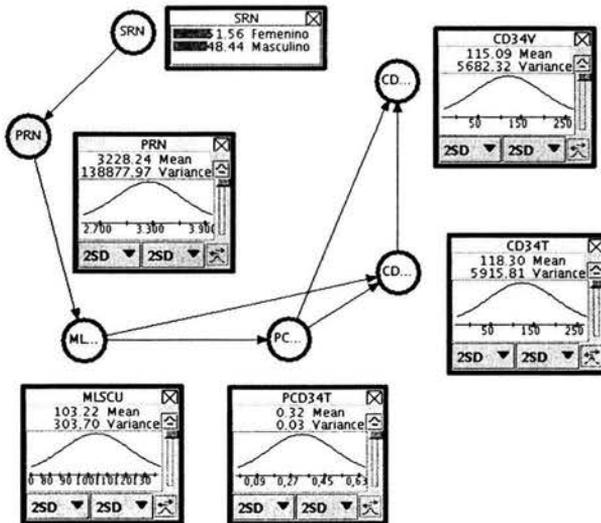


Figura 10. Red Bayesiana 1. Seis nodos involucrados: sexo del recién nacido (SRN), peso del recién nacido (PRN), mililitros de sangre de cordón umbilical recolectados (MLSCU), porcentaje de CD34+ totales (PCCD34T), células CD34+ totales y viables en la unidad de SCU (CD34T y CD34V respectivamente).



Una red Bayesiana (figura 11) que puede estar relacionada al dominio de la recolección y manejo de unidades de SCU construida sobre 11 factores involucrados, (los cuales fueron determinados al limitar las relaciones de causalidad que no se consideraron importantes al momento de analizar los factores involucrados en las mismas), muestra las relaciones de influencia y la posibilidad de que diferentes factores puedan ser explicados a partir de otros de distinta naturaleza.

En este contexto las redes Bayesianas permiten detectar factores críticos que actúan sobre otros factores dentro de la red de causalidades encontradas, así, de acuerdo al análisis que se presenta, el tiempo que transcurre desde la recolección de la unidad hasta su procesamiento (TH) tiene un papel crítico en los valores de células CD34+ viables y totales ya que si este tiempo es reducido puede llevar a la disminución en la reducción de distintas poblaciones celulares.

Un factor que muestra un efecto poco evidente entre los factores incluidos resulta ser el factor relacionado a la unidad hospitalaria (UH), que muestra que existe un componente de diversidad poblacional entre las madres donantes, al relacionarse directamente con las poblaciones celulares.





De este modo las poblaciones de CD34+ viables y totales están explicadas tanto por los factores esperados como por el factor de diversidad poblacional y tiempo de procesamiento.

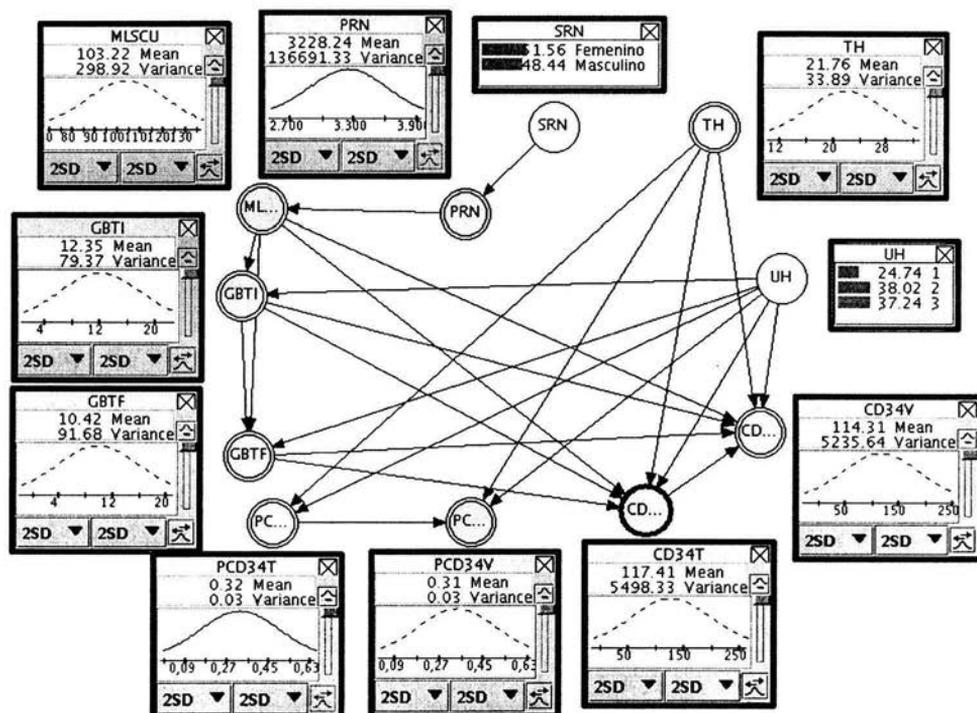


Figura 11. Red Bayesiana 2. Once nodos involucrados: sexo del recién nacido (SRN), peso del recién nacido (PRN), mililitros de sangre de cordón umbilical recolectados (MLSCU), glóbulos blancos totales iniciales (GBTI), glóbulos blancos totales finales (GBTF), porcentaje de CD34+ totales (PCCD34T), porcentaje de CD34+ viables (PCCD34V) células CD34+ totales y viables en la unidad de SCU (CD34T y CD34V respectivamente), unidad materna (UH), tiempo transcurrido desde la recolección hasta el procesamiento en horas (TH).



VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las redes bayesianas creadas para este estudio nos muestran que, de acuerdo a la hipótesis, los factores involucrados en nuestros datos tienen una influencia sobre la cantidad de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) CD34+ que se encuentran presentes en las unidades recolectadas de SCU.

Es importante mencionar que los factores maternos como la edad, el número de gestas y el tipo de parto, no muestran una relación directa sobre el porcentaje de CPH obtenidas, ya que a lo largo de este estudio se llevó a cabo la construcción de un sinnúmero de redes que involucraran estos factores y no se encontró una influencia directa sobre las CPH.

A diferencia de los factores maternos, vemos que los factores neonatales tienen una influencia directa sobre las CPH (CD34+), ya que se observa una clara relación entre el peso del recién nacido, los mililitros de SCU recolectados y a su vez la cantidad de CD34+ presentes en la unidad de SCU.





Tomando en consideración la información contenida en este trabajo de tesis acerca de la importancia fundamental que tiene la alimentación sobre la obtención de recién nacidos con un mayor peso; podemos inferir que existe una influencia directa por parte de los hábitos alimenticios que lleve a cabo la madre durante el embarazo, ya que se pone de manifiesto una relación directa con la obtención de mayor cantidad de CPH en la SCU.

Lo anterior puede deberse a que mejores hábitos alimenticios durante el embarazo generan ganancia en peso del recién nacido, lo que a su vez se traduce en una mayor cantidad de SCU recolectada y por ende en una mayor cantidad de CPH procesadas y criopreservadas listas para ser usadas en trasplante.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA





VII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten observar que de acuerdo a la hipótesis planteada, los factores maternos y neonatales tienen una influencia directa sobre la obtención de CPH; ya que gracias al análisis bayesiano realizado encontramos que existe una relación directa entre el peso del recién nacido, los mililitros de SCU recolectados y el porcentaje de CPH procesado.

Además podemos decir que el modelo de madre donadora ideal debe cumplir con las siguientes características:

- Estar catalogada como clínicamente sana
- Ser mayor de edad
- Que tenga al menos 34 semanas de gestación al momento de dar a luz
- Que haya llevado una alimentación, tal que le otorgue la base de un desarrollo saludable al recién nacido.
- Consentimiento informado para realizar la donación de la SCU.



Estas características en las madres donadoras nos garantizan mayores posibilidades de obtener un alto volumen de SCU al momento de la recolección y por ende un mayor porcentaje de CPH que serán analizadas y criopreservadas.

Es importante mencionar que los factores de raza, medio ambiente, alimentación hacen a cada grupo de individuos únicos, por tal motivo los factores que pueden estar directamente relacionados en el caso de la comunidad de donadoras mexicanas es muy diferente al que se maneja en otros países

Lo anterior nos sirve para crear conciencia en las madres que se encuentran embarazadas acerca de la importancia que tienen los buenos hábitos alimenticios y estados de vida saludables durante el embarazo, para que sus hijos tengan mejores condiciones al momento del nacimiento, además de que les dá la posibilidad de DAR LUZ A MAS DE UNA VIDA ya que van a poder donar la SCU después del nacimiento de sus bebés, lo que se traduciría a su vez en la obtención de unidades de SCU de alta calidad hematopoyética que en un futuro inmediato puedan salvar la vida de un niño que lo necesite.





VIII. REFERENCIAS

- 1.- **Amat, Ll. , Querol, S., Molina, C.** La sangre de cordón umbilical, una nueva fuente de progenitores hemopoyéticos para trasplante. Análisis de nuestra experiencia en la recolección y procesamiento. *Progresos de Obstetricia y Ginecología* vol 39, Numero 8,571-579 (1996).
- 2.- **Verfaillie C.** Hematopoietic stem cells for transplantation. *Nature Immunology* vol. 3 No. 4 abril 2002 314-317.
- 3.- Standars for cord blood collection , procesing, testing,banking, selection and release. NETCORD – FAHCT. Draft 10. October 21, 1999.
- 4.- **Ballen K.K., Wilson M., Wu J.** Bigger is better: maternal and neonatal predictors of hematopoietic potential of umbilical cord blood units. *Bone Marrow Transplantation* 27: 7-14 2001.
- 5.-**Calderón E.** Los bancos de sangre de cordón umbilical, la normativa internacional y su situación actual en la República Mexicana. *Gaceta Médica de México* vol. 139 Sup 3 S 101- S 103 Sep-Oct 2003.
- 6.-**Cohen Y., Nagler A.** Cord Blood Biology and Transplantation. *IMAJ* 2004;6:39-46.
- 7.- **Wada R., Bradford A., Moogk M.** Cord Blood Units collected at a remote site: a collaborative endeavor to collect umbilical cord blood through the Hawaii Cord Blood Bank and store the units at the Puget Sound Blood Center. *Transfusion* 2004;44:111-118
- 8.- <http://usuarios.lycos.es/LaOsteopetrosis/Varios/TrasplAlogMedO>
- 9.-**Indrikovs, Alexander.** Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical. *Gaceta Médica de México* Vol. 138 Suplemento No. 1, 2002. S-130 , S-131, S-132.
- 10.- <http://www.fmedic.unr.edu.ar/catedras/inmunologia/inmuno/medula-7.htm>
- 11.- <http://www.macospania.es/H.HTML>





- 12.- http://www.drscope.com/pac/mg/a5/mga5_p3.htm
- 13.- **Stuart H.O.** Diversification of Haematopoietic Stem Cells to specific Lineages. *Nature Reviews Genetics* 2000; 1: 57-64.
- 14.- http://www.embrios.org/celulasmadre/medicina_reparadora.htm
- 15.- <http://www.ecojoven.com/uno/05/celulasm.html>
- 16.- <http://www.biotech.bioetica.org/docta7.htm>
- 17.- **McKenzie S. B.** *Hematología Clínica*. Edit. El manual moderno. Segunda edición en español traducida de la segunda edición en inglés. México 2000. p.p. 11-36.
- 18.- http://www.biotech.bioetica.org/docta14.htm#_Toc42345755
- 19.- http://www.bionetonline.org/castellano/Content/sc_cont1.htm
- 20.- **Bonnet D.** Haematopoietic stem cells. *Journal of Pathology* 2002;197:430-440.
- 21.- **Keeney M., Chin-Yee I., Weir K.** Single Platform Flow Cytometric Absolute CD34+ Cell Counts Based on the ISHAGE Guidelines. *Cytometry* 1998 34:61-70.
- 22.- [Netcord.com](http://www.netcord.com) inventario
- 23.- www.repromed.co.uk
- 24.- **Miñana M., Carbonell F., Mateu E., Encabo A.** Sangre de cordón umbilical como fuente de células madre hematopoyéticas para trasplante. Instituto de Biología Celular. Organismo público valenciano de Investigación. Valencia.
- 25.- **Larry C. Lasky, Phyllis I. Warkentin.** Marrow and stem cell processing for transplantation. American Association of Blood Banks Bethesda, Maryland U.S.A. 1995
- 26.- **Zingsem, J.** Cord Blood Processing with an automated and functionally closed system; *Transfusion* 2003;43:806-813.
- 27.- **Rubinstein P., Dobrila L., Rosenfield R.** Processing and cryopreservation of placental / umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Medical Sciences* 1995;92:10119-10122.





28.- Wognum; Hematopoietic stem cells

29.- Aguayo Q. S. El almanaque mexicano 2000. Edit. Hechos confiables. México pp. 15-17.

30.<http://www.thaisyjosef.com/hombremujer/sexoembarzoparto/sexoembarzoparto.htm>

31.- <http://docencia.med.uchile.cl/pos/obstetricia/Textos/046.htm>

32.- Nakagawa R., Watanabe T., Kawano Y. Analysis of maternal and neonatal factors that influence the nucleated and CD34+ cell yield for cord blood banking. *Transfusion* 2004;44:262-267.

33.- Icaza S. J., Béhar M. Nutrición. Nueva editorial interamericana. México 1981. 2da. Edición

