



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

TESIS
“ESTANDARIZACION DE LA DESCONGELACION DE CPH DE
CORDON UMBILICAL PARA USO EN TRASPLANTE: METODO DE
DILUCION V/V Y AUTOMATIZACION UTILIZANDO EL EQUIPO
SEPAX BIOSAFE”

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A
SANDRA RAMIREZ PEREZ



MEXICO, DF.

2006



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.

Dedicatorias

Le doy gracias a Dios por ser mi motivación en mi carrera, el siempre ha estado conmigo a cada instante y me acompaña, sin el no habría hecho nada en la vida.

Agradezco a mis padres por el apoyo que a su manera me brindaron.
A mis hermanos porque siempre me ayudaron a salir adelante.

A la alegría, ternura y armonía de mi vida mis sobrinos David, Karina y Saúl.

A esa química que me motivo a estudiar esta carrera y su ejemplo de vida me hizo sacar fuerzas en esos momentos de crisis para terminarla.

Mis amigas de toda la carrera, que siempre hemos estado juntas, saben que las quiero y las admiro, siempre van a estar en mi corazón.

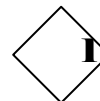
A cada instante de nuestra vida conocemos individuos que dejan huella en nuestra existencia y esas personas aunque ahora ya no estén próximas a nosotros siempre están presentes y con solo ese momento que han tocado nuestras vidas han marcado cambios en nuestra naturaleza de pensamiento.

A todas las personas que conocí durante este trayecto de mi vida, gracias a todas ellas he crecido cada día y han alegrado mi vida.

He asimilado que la vida no es fácil, y que cada día hay que esforzarse por ser mejor y dar lo mejor de uno mismo a pesar de todo.

Contenido

Abreviaturas	3
<hr/>	
Introducción	4
<hr/>	
Capítulo 1	
<hr/>	
Antecedentes	
6	
Acreditación	6
Organización del BSCU del CNTS	
9	
Unidad materna: Recolección de SCU.	9
Unidad de Procesamiento de SCU	10
Unidad de Criopreservación	14
Banco paralelo:	16
Citometría de flujo.	16
Exámenes de laboratorio	17
Unidad de gestión y búsqueda	18
Crioprotectores	19
Crioprotectores	19
Agentes crioprotectores	19
Crioprotectores coligativos	19
Crioprotectores penetrantes	20
Dimetilsulfóxido (DMSO)	20
Crioprotectores no penetrantes.	21
Congelación	23
Sobreenfriamiento	24
Vitrificación	26
Congelación programada convencional	26
Descongelación	27
Dilución.	28



Capítulo 2

Objetivos	29
------------------	-----------

Capítulo 3

Material y Métodos	30
Características de las unidades.	30
Diseño de estudio.	30
Recolección de unidades de sangre de cordón umbilical.	31
Procesamiento de la unidad de sangre de cordón umbilical.	31
Criopreservación de unidades de sangre de cordón umbilical	31
Descongelamiento de unidades después de almacenarlas en nitrógeno líquido.	33
Dilución del DMSO	34
Lavado automático del DMSO	34
Ventajas	35
Exámenes de laboratorio	35
Número de células CD34+	35
Prueba de esterilidad	38
Fase de envío y trasplante	38

Capítulo 4

Resultados	39
-------------------	-----------

Capítulo 5

Análisis de Resultados	46
-------------------------------	-----------

Capítulo 6

Conclusiones	49
---------------------	-----------

Referencias bibliográficas	52
-----------------------------------	-----------



ABREVIATURAS

- SCU.** Sangre de Cordón Umbilical
CPH. Célula Progenitora Hematopoyética.
CMH. Célula madre hematopoyética
BSCU. Banco de Sangre de Cordón Umbilical.
MO. Medula ósea
CFU. Unidad formadora de colonias
CFU-GM. Unidad formadora de colonias granulocíticas y macrofágicas
BFU. Unidad formadora de brotes
BFU-E. Unidad formadora de colonias en estallido eritroides
BF-Mk. Unidad formadora de colonias en estallido megacariocíticas
CFU-Blast. Unidad formadora de colonias blásticas
CFU-E. Unidad formadora de colonias eritroides
CFU-Eo. Unidad formadora de colonias eosinófilos
CFU-G. Unidad formadora de colonias granulocíticas
CFU-GEMM. Unidad formadora de colonias granulocíticas, macrofágicas, eritroides, monocíticas y megacariocíticas.
CFU-M. Unidad formadora de colonias monocíticas
EICH. Enfermedad injerto contra huésped
EPO. Eritropoyetina
FCH. Factores de crecimiento hematopoyético
CPD. Citrato Fosfato Dextrosa
HES. Hidroxietyl-almidón
PVP. Polivinil-pirrolidona
PEG. Polietilenglicol
DMSO. Dimetil Sulfóxido
HIV. Virus de Inmunodeficiencia Humana
VHB. Virus de la Hepatitis B
VHC. Virus de la Hepatitis C
HLA. Antígeno leucocitario humano
HLA-DR. Antígeno leucocitario humano-relacionado con la zona D del cromosoma, clase II
CD. Designación de grupo (cluster designation)
7-AAD. 7-amino-actinomycin D
PE. Ficoeritrina
VE. Velocidad de enfriamiento

INTRODUCCIÓN

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (CPHs) se ha utilizado en estas tres últimas décadas para reconstituir la hematopoyesis tras tratamientos mielo-ablativos. El trasplante de CPHs se utiliza para tratar una extensa variedad de enfermedades hematológicas y no hematológicas, habiéndose establecido como terapia para muchas patologías congénitas o adquiridas del sistema hematopoyético.

La fuente de CPHs se ha ido ampliando en estos últimos años, obteniéndose de médula ósea (MO), sangre periférica movilizada, y más recientemente de sangre de cordón umbilical (SCU).

En estos últimos años, ha habido un gran interés en estudiar las células progenitoras hematopoyéticas (CPHs) para determinar la potencia hematopoyética de las células progenitoras como son: recuento de células nucleadas, cuantificación de células CD34+, la recuperación de células CD34+ tras la descongelación de alícuotas y la viabilidad de las subpoblaciones leucocitarias.

FACT unió fuerzas con NetCord para desarrollar estándares internacionales en unidades maternas donadoras, búsqueda y recolección de sangre de cordón, procesamiento, tipificación, almacenaje, selección y liberación. Los estándares son modelos relacionados a CPH. La colaboración de NetCord/FACT asegura consistentemente la calidad en las unidades de sangre de cordón para trasplante a nivel internacional. NetCord/FACT reconoce la estandarización global de los bancos de sangre de cordón facilitando la viabilidad en la calidad de unidades de sangre de cordón.

Los estándares de NetCord/FACT han sido adoptados por sociedades en un gran número de países fuera de Estados Unidos, incluyendo países de Europa, Canadá, Asia, Australia y en Junio del 2003 México abrió su primer Banco de

Sangre de Cordón Umbilical del Centro Nacional de la Trasfusión Sanguínea, apegándose a los estándares establecidos por NetCord/FACT.

Con una metodología de punta y completamente automatizada, México a logrado colocarse a la cabecera de los BSCU gubernamentales en América latina.

El presente trabajo forma parte del control de calidad de procesos que el BSCU ha implementado.

Con esta estandarización de la descongelación de CPH se pretende garantizar la viabilidad de las CPH para su uso en trasplantes.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

El sistema inmune consta de una serie de órganos, tejidos y células ampliamente repartidos por todo el cuerpo.

La hematopoyesis consiste en la formación y desarrollo de células sanguíneas a partir de la **célula progenitora hematopoyética** (*stem cell*).

Todas las células sanguíneas proceden de la citada célula progenitora hematopoyética. Son células capaces de auto regeneración, de modo que durante la vida adulta se mantienen homeostáticamente.

La hematopoyesis está regulada de forma muy fina, de modo que cada tipo celular tiene un control diferente, pero además, esta regulación es lo suficientemente flexible para permitir incrementos ante una infección o una hemorragia.

ACREDITACION

FACT (Foundation for the Accreditation Of Hematopoietic Cell Therapy), es una organización fundada en 1996 por la sociedad internacional de Terapia Celular (ISCT) y la sociedad americana de trasplante de sangre de medula ósea (ASBMT). ISCT es una sociedad profesional establecida en 1992 representada por científicos y médicos que trabajan en el área de manipulación de células madre. ASBMT fue formada en 1993 como una organización profesional representada por médicos e investigadores involucrados en el aspecto clínico del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. Las dos sociedades establecieron FACT para desarrollar estándares y un programa de acreditación.

El propósito primario de FACT es desarrollar estándares para la recolección, procesamiento y trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

El mayor objetivo de FACT es promover la calidad en el cuidado del paciente y laboratorios de alta calidad. Sus estándares son completos e incluyen aseguramiento de la calidad; fácil diseño y operación; políticas y procedimientos; evaluación del donador, selección, y dirección; cuidado del historial; etiquetado; procesamiento; almacenaje; transportación; resultados y liberación de CPH; reporte de casos adversos; auditoria; y análisis de resultados para la inspección y acreditación voluntaria en la cosecha de terapia celular de progenitores celulares.

FACT ha desarrollado un programa de inspección voluntaria y exitosamente se ha completado al cabo de 3 años de acreditación en la campo de terapia celular de progenitores hematopoyéticos. El equipo de inspección de FACT siempre incluye un equipo líder, un médico entrenado en trasplante de células madre, y expertos profesionales en el área de recolección de células madre y practicas de laboratorio.

El consejo de acreditación revisa todos los reportes de las instalaciones, así mantienen consistencia en la interpretación de los estándares. La acreditación que otorga FACT asegura consistentemente la calidad.

En 2002 FACT unió fuerzas con NetCord para desarrollar estándares internacionales en unidades maternas donadoras, búsqueda y recolección de sangre de cordón, procesamiento, tipificación, almacenaje, selección y liberación. Los estándares son modelos de los estándares relacionados a CPH, pero independientes y llevan la dirección específica a los diferentes resultados relacionados a la sangre de cordón. La colaboración de NetCord/FACT prometió asegurar consistentemente la calidad en las unidades de sangre de cordón para trasplante no solo en los Estados Unidos sino también internacionalmente.

NetCord/FACT reconoce la estandarización global de los bancos de sangre de cordón facilitando la viabilidad en la calidad de unidades de sangre

de cordón para un gran número de receptores de Estados Unidos y receptores de todos los tipos de antecedentes étnicos.

Los estándares de NetCord/FACT han sido adoptados por sociedades en un gran número de países fuera de Estados Unidos, incluyendo países de Europa, Canadá, Asia, Australia y en Junio del 2003 México abrió su primer Banco de Sangre de Cordón Umbilical del Centro Nacional de la Tránsito Sanguínea, apegándose a los estándares establecidos por NetCord/FACT.

Los estándares de NetCord/FACT para sangre de cordón son completos y fueron desarrollados con la misma filosofía de los estándares relacionados con CPH: el aseguramiento de la calidad del trasplante clínico de sangre de cordón es tan importante como el aseguramiento de la recolección y buenas prácticas de laboratorio.

Organización del BSCU del CNTS

El banco de sangre de cordón umbilical esta constituido por cinco unidades:

- 1) Unidad materna
- 2) Unidad de procesamiento
- 3) Unidad de Criopreservación
- 4) Unidad de búsqueda y gestión
- 5) Banco paralelo

UNIDAD MATERNA:

RECOLECCIÓN DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

La sangre de cordón umbilical se colecta en unidades maternas que colaboran con el Banco de Sangre de Cordón Umbilical del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea dentro del Programa Nacional de Sangre Placentaria, entre estas maternidades se encuentran el Hospital Juárez de México, Hospital Juárez del Centro, Hospital de la Mujer, Hospital General de México, Hospital de la mujer de Puebla y muy pronto unidad materna del ISSSTE y Defensa Nacional.

Para que una mujer sea candidata a donación se requiere el consentimiento informado de la madre y la historia clínica del recién nacido.

La recolección se realiza con la bolsa de recolección específica para SCU, se llena por gravedad de la vena del cordón umbilical, esta bolsa contiene citrato fosfato dextrosa (CPD), y es recolectada antes de que se alumbre la placenta. La sangre de cordón colectada es procesada en el banco de sangre de cordón umbilical de acuerdo a los estándares establecidos por NETCORD¹.



UNIDAD DE PROCESAMIENTO

La automatización de los procesos es parte fundamental de la calidad en la obtención de CPH de cordón umbilical, por esta razón se utiliza el sistema Sepax que es un sistema de procesamiento celular rápido y automatizado, de sangre o componentes sanguíneos en un ambiente estéril. Los componentes sanguíneos son colectados en bolsas estándar, listas para el proceso de reducción, con una alta tasa de recuperación y viabilidad celular posterior al procedimiento.

El Sepax es un equipo de centrifugación celular para procesamiento de sangre con volúmenes de 20 a 200 mL, el procedimiento es en un solo paso. La cámara de centrifugación de este equipo tiene una variable que es el volumen con una capacidad hasta de 200 mL.

El volumen de la cámara de centrifugación es determinado por la posición del pistón formado con el botón de la cámara de separación.

El Sepax principalmente consiste de una centrífuga y un sistema neumático con capacidad de hacer vacío o presión para llenar o vaciar la cámara de separación.

Además un sensor óptico y un sistema de tres clavijas, las cuales controlan el flujo de sangre y la posición de las tres válvulas son parte del kit de separación, estas controlan directamente el flujo de sangre en el kit de separación.³⁰



SEPAX, BIOSAFE

El protocolo de reducción de volumen para células madre esta diseñado para reducir el volumen por depleción del plasma de sangre de cordón umbilical y del paquete eritrocitario lo que permite que las CPH puedan posteriormente criopreservarse y almacenarse hasta que sean trasplantadas en el futuro a un paciente.

El protocolo de reducción de volumen permite el procesamiento de muestras por medio de ciclos múltiples en caso necesario y así alcanzar un máximo de reducción en el volumen, con un mínimo de pérdida celular. El volumen final está en función de la concentración celular y del volumen inicial de la muestra, el cual puede ser elegido para conseguir un máximo de recuperación celular.²³

La utilización del hidroxil etil almidón (HES) dentro del proceso de reducción de volumen permite la rápida sedimentación de los eritrocitos y contribuye a mantener la viabilidad celular después de la criopreservación.

El HES es adicionado al producto inicial con una proporción de una quinta parte.

Una alta depleción de eritrocitos y plaquetas mejora la viabilidad post-descongelación.

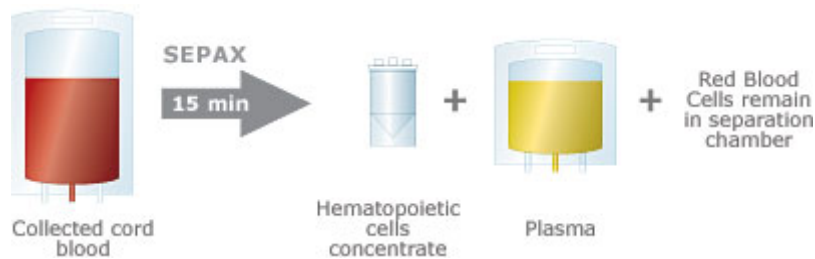
El protocolo de sangre de cordón umbilical permite reducción de volumen de sangre de cordón umbilical en alrededor de 20 minutos.²³

La separación en la cámara inicia cuando es llenada con la SCU por el desplazamiento del pistón de la cámara.

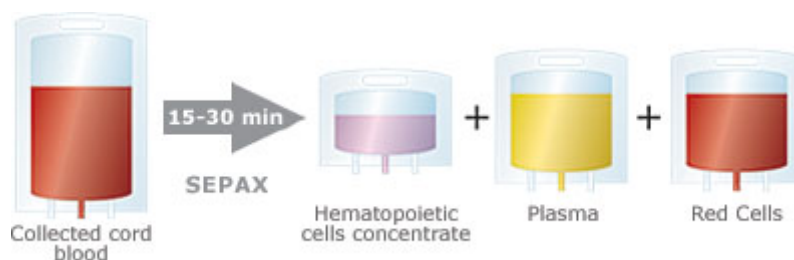
Cuando toda la SCU es transferida de la bolsa a la cámara de separación todas las válvulas del kit son cerradas y la centrifugación rápida es automáticamente incrementada de 3500 rpm a 6500 rpm y mantenida por 4 minutos, después es automáticamente disminuida a 4500 rpm.

En esta rápida centrifugación inicia la extracción de plasma. En esta fase la posición es cambiada la dirección del flujo a través de las mangueras del kit. La SCU ahora es separada hacia plasma, buffy coat y glóbulos rojos, son bombeados fuera de la cámara de centrifugación por desplazamiento del pistón de la cámara de separación.

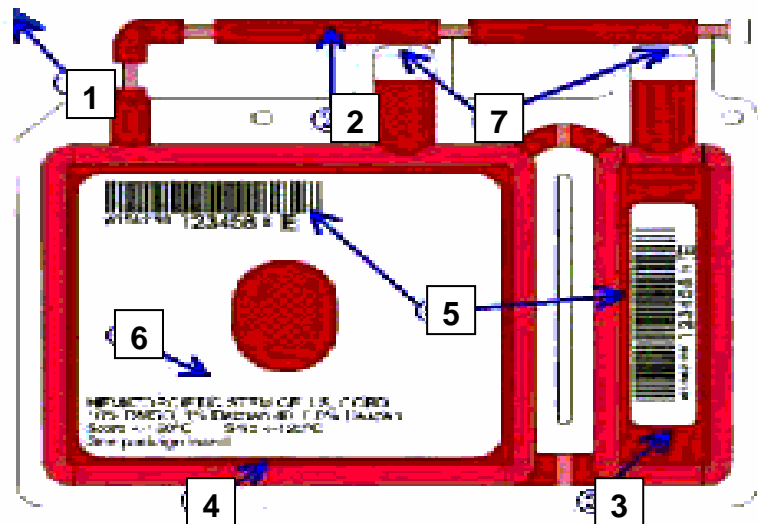
Los primeros 4 mL de plasma son recolectados hacia la bolsa de glóbulos blancos para recuperar el remanente de sangre de cordón, después otros 8 mL son directamente enviados hacia la bolsa de glóbulos rojos que son limpiados con el plasma.



Finalmente las tres válvulas se abren de la cámara de separación hacia la bolsa de plasma. El plasma es recolectado a la bolsa de plasma hasta que el sensor detecta las primeras células. La detección de células inicia con la recolección de buffy coat a la bolsa de recolección de glóbulos blancos cambiando la posición de las tres válvulas mientras el pistón de la cámara de separación continua estos movimientos de células fuera de la cámara de separación. Cuando el volumen de buffy coat es recolectado la posición de las tres válvulas se cambia automáticamente para la extracción de glóbulos rojos en la bolsa de recolección de glóbulos rojos hasta que toda la SCU es procesada completamente.³⁰



El protocolo de reducción de volumen del sistema Sepax utiliza bolsas de almacenaje especiales para sangre de cordón umbilical, las cuales tienen funciones determinadas como se muestra a continuación.



Ejemplo de la bolsa de almacenaje para unidades de sangre de cordón.

1. Sello hermético adicional que envuelve a la bolsa, sirve como bolsa de cuarentena.
2. Fragmento de células desprendible para pruebas confirmatorias.
3. compartimiento desprendible de la bolsa de congelación opcional para expansión ex vivo del 20% del volumen.
4. Compartimiento principal de la bolsa de congelación que contiene el 80% de las células (suficiente para trasplante).
5. Código de barras para ambos compartimientos, el canister y las células del donador.
6. Etiqueta con nombre del producto, solución crioprotectora, requerimientos de almacenamiento y tránsito de temperatura.
7. Puntas de los puertos de entrada que permiten transferir las células descongeladas.

UNIDAD DE CRIOPRESERVACIÓN

A las unidades de sangre de cordón se les adiciona de manera lenta un volumen de DMSO. Después de la reducción de volumen se agrega lentamente 5 mL de solución crioprotectora (0.85 NaCl, 10% DMSO y 5% Dextran 40) a la suspensión celular y en continua agitación. Las unidades son almacenadas en un tanque criogénico (Bioarchiv thermogénesis) en la fase de nitrógeno líquido.



Bioarchivo

El momento crítico de la criopreservación es en la “fase de transición” durante el cual, el sistema pasa de fase líquida a fase sólida. El agua de la solución libera el calor latente de fusión para transformarse en un medio sólido. Si el programa de congelación no reacciona a tiempo, el ritmo de enfriamiento disminuye la curva de descenso de temperatura se enlentece, lo que expone a las células a los efectos del elevado gradiente de presión osmótica.

Una vez iniciado el cambio de estado, el ritmo de enfriamiento debe mantenerse constante entre 1° y $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, para evitar un posible sobreenfriamiento de la célula como es observado en la grafica de enfriamiento.²⁴

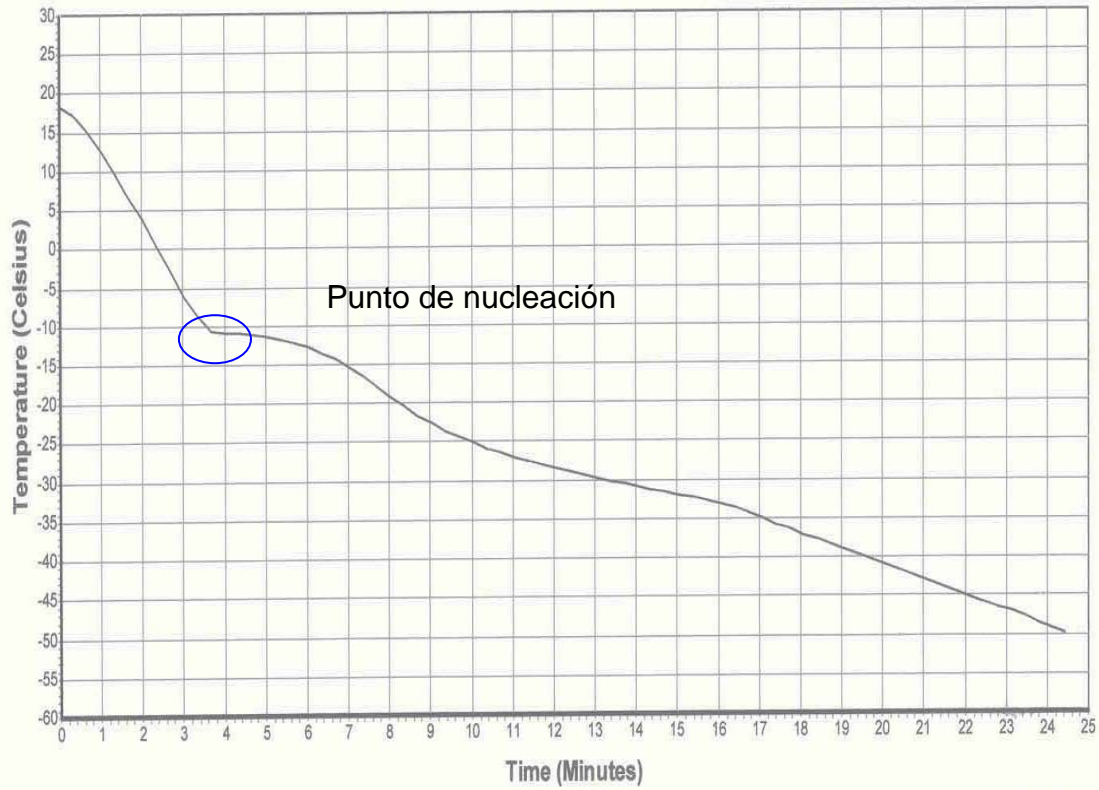
CENTRO NACIONAL DE LA TRANSFUSION SANGUINEA

BioArchive System

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION, DESARROLLO Y CONTROL DE CALIDAD
OTHON DE MENDIZABAL 195 COL. ZACATENCO MEXICO DF

Sample: M00010500047500

Storage Date: 7/7/05 12:07:44 PM



Operator ID: MIRIAM

Location: Slot: 135 Ring: 2 Rack2

Profile Used: default

Pre-Freeze: 10C/Min.

End Freeze: -11C

CRF Serial Number: 1101

Start Freeze: -1C

Post Freeze: 2C/Min.

CRF Version: 1.10

Fan Power: 100%

End Temp: -50C

Grafica de congelación programada

BANCO PARALELO

El banco paralelo esta constituido por

- 1) Citometría de flujo
- 2) Exámenes de laboratorio
- 3) Tipificación HLA

CITOMETRIA DE FLUJO

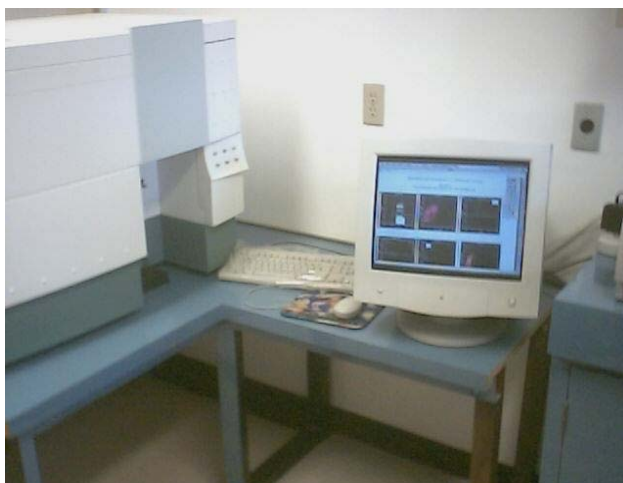
Principio de la prueba:

Los anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos dirigidos contra la molécula CD34+ se pueden usar para identificar las células CD34+ por citometría de flujo.

En este ensayo se obtiene la tinción de las muestras de sangre cuando se agrega a 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 7-amino-actinomycin D (7-AAD) para ácidos nucleicos tiñe al ADN y ARN de las células nucleadas. El sedimento liofilizado en el tubo TruCOUNT se disuelve liberando un número conocido de microesferas fluorescentes.

Se agrega cloruro de amonio para lisar los eritrocitos antes de la muestra por el citómetro. Durante el análisis el número absoluto de células CD34+ se determina dividiendo el número de eventos celulares de CD34+ entre el número de eventos de microesferas fluorescentes y el resultado se multiplica por la concentración de microesferas, dividido entre el volumen de muestra empleado. Se agrega el colorante 7-amino-actinomycin D (7-AAD) para evaluar la viabilidad de las células.

Las células que son 7-AAD positivas no son viables y las que son 7-AAD negativas son las células CD34+ viables^{13,14,15}.



Citómetro de flujo

EXAMENES DE LABORATORIO

Cuenta celular: Las células sanguíneas son contadas con un contador celular automático (Micros 60) según las instrucciones de fabricante para determinar la cantidad de glóbulos blancos.

Microbiológicas: Durante el proceso de obtención de CPH, es importante realizar la verificación de la ausencia de contaminación microbiológica y hongos en las unidades de sangre de cordón umbilical; asegurar la esterilidad de la unidad y así garantizar el producto para uso con fines terapéuticos.

Serología: Se realiza la prueba de serología de cada unidad, para descartar HIV, AgsHB, VHC, RPR y Chagas. En caso de presentar alguna prueba positiva se realiza la prueba confirmatoria.

Grupo ABO y antígeno D: Se realiza la tipificación del grupo sanguíneo ABO y del antígeno D

Tipaje de HLA

Serología: estudio del fenotipo mediante anticuerpos HLA-DR3

Biología molecular: estudio de genotipo HLA-DRB1*03

HLA-A, HLA-B y DRB y DQ son determinados en la sangre de cordón placentaria.²²

UNIDAD DE BÚSQUEDA Y GESTIÓN

Las unidades se conservan hasta que son requeridas por los centros de trasplante para pacientes con enfermedades hematológicas.

Cuando un centro de trasplante requiere una unidad de sangre de cordón umbilical, solicita al BSCU del CNTS una unidad anexando un estudio de HLA del paciente.

El BSCU realiza una búsqueda de unidad de acuerdo a compatibilidad de HLA, la cual se realiza dentro del banco paralelo dentro del mismo CNTS; la compatibilidad de sangre de cordón umbilical es de 6 antígenos del sistema HLA (HLA-A, HLA-B y DRB y DQ), se busca compatibilidad de 6/6, se ha visto que se puede transplantar hasta con una compatibilidad de 4/6.

CRIOPROTECTORES

□ **Crioprotectores**

La ventaja de la criopreservación es que por debajo de aproximadamente -196°C no se producen reacciones químicas de significación biológica y debido a ello, es posible conseguir un almacenamiento indefinido. El problema es la repercusión que los procedimientos de congelación-descongelación tienen sobre los diferentes tipos celulares³.

□ **Agentes crioprotectores**

La minimización de los efectos de daño por congelamiento a los tejidos es equilibrado con los agentes crioprotectores antes del congelamiento.

Los agentes crioprotectores penetrantes como el glicerol o dimetilsulfóxido son efectivos para minimizar el daño de sistemas biológicos de congelamiento².

□ **Crioprotectores coligativos**

Actúan incorporando moléculas de agua y enlenteciendo el crecimiento de los cristales de hielo, lo que evita un aumento brusco de la concentración de solutos extracelulares. La capacidad del crioprotector para penetrar en la célula aumenta la concentración del medio intracelular previniendo la formación de cristales intracelulares y evitando así la posible pérdida de viabilidad.

Permite emplear un ritmo de enfriamiento tal, que no se pierda tanto líquido intracelular como para causar deshidratación pero manteniendo al mismo tiempo una concentración de solutos intracelulares suficientes como para minimizar la aparición de cristales en el interior de la célula.²⁴

El principal efecto benéfico que deseamos obtener es aumentar la proporción máxima de supervivencia celular; cambiar el rango óptimo de enfriamiento a uno prolongado.

❑ **Crioprotectores penetrantes**

Son sustancias muy solubles en agua, de bajo peso molecular, permeables a través de la membrana celular.

Por su capacidad de unirse a las moléculas de agua, reducen la cantidad de hielo formado a cualquier temperatura y por lo tanto la concentración de solutos.

Trabajando a velocidades lentas reducen la deshidratación celular hasta un límite tolerable; si el crioprotector no penetrara dentro de la célula contribuiría a la lesión por deshidratación osmótica en lugar de prevenirla.

Los crioprotectores penetrantes más utilizados son: DMSO, glicerol, 1,2 propanodiol, acetato amónico, acetato de trimetilamina, etanol, metanol, etc.

❑ **DMSO (dimetilsulfóxido)**

El **DMSO** es un bioproducto de la destilación del petróleo, de olor característico y que disuelve muchas sustancias solubles en agua y lípidos. Su capacidad de penetración es elevada a temperaturas superiores a 0°C, pero a 0°C o temperaturas inferiores penetra lentamente, aunque con variaciones que dependen de la especie celular; en los hematíes, por ejemplo, en menor grado que el glicerol.

Es un crioprotector ampliamente utilizado, tiene propiedades coligativas y capacidad de aumentar la viscosidad de la solución. Las concentraciones a las que se emplea habitualmente son 5% (0.7 M) a 10% (1.4 M) y por encima de ellas puede ser tóxico⁴

El DMSO polimeriza la tubulina y despolimeriza la actina y puede perturbar las propiedades cinéticas de algunas enzimas.

Cuando los crioprotectores no se eliminan de la muestra y esta va a ser infundida, hay que tener en cuenta los posibles efectos nocivos que se pueden producir en el receptor.

El DMSO tiene una toxicidad tolerable aunque puede producir fiebre, náuseas y vómitos, cefalea, dolor, vaso espasmo, etc.

El DMSO produce un shock osmótico cuando las células progenitoras hematopoyéticas son descongeladas para ser infundidas a los pacientes. Este problema se resuelve con una dilución 2:1 del método original desarrollado en el New York Blood Center mostrado en el primer trasplante mieloide.¹¹

El HES y la PVP aumentan la viscosidad de la suspensión por lo que la transfusión debe realizarse lentamente.⁵⁻¹⁰

□ **Crioprotectores no penetrantes.**

Son sustancias en general de alto peso molecular, que a concentraciones molares reducidas, protegen a las células a velocidades altas de congelación. Su utilidad abarca a pocas especies celulares aunque, asociados a los crioprotectores penetrantes, mejoran su rendimiento.

Entre estos agentes se encuentran: hidroxietil-almidón (HES), polivinilpirrolidona (PVP), polietilenglicol (PEG), dextrano, glucosa, dextrosa, sacarosa, etc.

Su mecanismo de acción está poco definido aunque existen diversas teorías:

1. Incremento importante de la viscosidad de las soluciones, desviando por ello la obtención de la recuperación óptima celular a velocidades de congelación de hematíes.

La disminución de la velocidad óptima de congelación se debería a que el incremento de viscosidad aumentaría la resistencia a la difusión del agua intracelular al medio extracelular, aumentando el tiempo necesario para lograr una deshidratación óptima. La importancia de este mecanismo radica en que, en las muestras con velocidades óptimas de congelación muy elevadas, sería posible una mayor uniformidad en el enfriamiento de las mismas.

2. Propiedades coligativas, en virtud de las cuales modifican el diagrama de fases de las soluciones.²

Cuando se va a reducir la concentración del crioprotector por etapas, puede ser necesario según el tipo de célula, diluir a la mitad la osmolaridad en cada paso, dejando un intervalo de equilibrio posterior, o emplear como diluyente inicial una solución hipertónica.

La temperatura a la que se realizan la adición y la extracción depende de la penetración del crioprotector y de la toxicidad celular que pueda producir por mecanismo químico. Se han utilizado rangos de 25°C y 0°C. La toxicidad química en muchos casos es menor a esta última temperatura, aunque para muchos crioprotectores también disminuye mucho a 0°C la capacidad de penetración.

Algunos tipos de células toleran una dilución brusca del crioprotector y la presencia de sustancias coloides extracelulares como la albúmina, pueden mejorar dicha tolerancia.

La temperatura también influye y se ha observado que para algunas células es mejor diluir bruscamente a 37 °C crioprotectores como el DMSO y el glicerol en lugar de a 0°C.

Una de las mayores limitaciones para el empleo de los crioprotectores es que pueden producir toxicidad celular bioquímica, aunque los mecanismos exactos son pocos conocidos.

Las hipótesis actuales suponen que, a temperaturas elevadas, habría una interacción de tipo hidrofóbico entre el crioprotector y las proteínas, que depende también de la concentración del agente y que tendería a estabilizar el estado desnaturalizado de las mismas.

A temperaturas bajas predominaría el carácter hidrofílico del compuesto, como en el caso del DMSO, incluso a elevadas concentraciones del mismo, con interacciones hidrofóbicas débiles que favorecerían el mantenimiento del estado nativo de las proteínas.

Hay efectos comprobados sobre la acción de los crioprotectores súper estabilizando los microtúbulos pudiendo interferir con la división celular normal.

CONGELACIÓN

El congelamiento en nitrógeno líquido se ha utilizado para la criopreservación de tejidos biológicos durante muchas décadas. Se desarrollaron métodos para congelar los glóbulos rojos y blancos, las células blancas y plaquetas que aun están en uso hoy y se han aplicado para la criopreservación de sangre de cordón humana. El almacenamiento de tejidos biológicos a temperaturas criogénicas suspende sus procesos metabólicos y sirve conservarlos por periodos prolongados de tiempo.²⁶

El congelamiento involucra tres estados: sobreenfriamiento, nucleación y cristalización.

Sobreenfriamiento

Ello es posible porque para iniciarse el cambio de estado se deben producir unos fenómenos de nucleación, en los que un número crítico de moléculas de agua adopta una configuración capaz de ser reconocida por otras moléculas como un núcleo de cristalización; estas se condensarán a su alrededor y reducirán su potencial químico.

Es el enfriamiento bajo el punto de equilibrio sin que ocurra el congelamiento. Esto sucede porque los cristales de hielo requieren parecerse a núcleos de la fase cristalina sobre el cual las moléculas de agua pueden condensarse y la probabilidad de formación parecida es dependiente e inversamente proporcional a la temperatura. Los núcleos se pueden formar de dos maneras: homogéneo (agregación casual de moléculas de agua en configuración parecida a hielo) o heterogéneo (inclusiones exteriores esto sucede y ofrece una apropiada superficie).²⁹

Nucleación homogénea: La probabilidad de formación de estos núcleos aumenta con la disminución de la temperatura, a la par que disminuye la masa crítica necesaria para ser reconocidos como el inicio de la cristalización.²⁵

Nucleación heterogénea: Este fenómeno tiene lugar mayoritariamente en el espacio extracelular. De no ser así, la membrana celular se encarga de detener el crecimiento cristalino. El tamaño crítico del núcleo bajo cero el cual es dependiente de la temperatura, decae y desaparece; el tamaño mencionado arriba crece y es iniciada la cristalización. Es importante notar que la temperatura a la cual la muestra de agua o solución se congele, no es constante mientras que la temperatura a la cual el hielo se funde durante el calentamiento es constante.^{25, 29} Este fenómeno tiene consecuencias cinéticas.

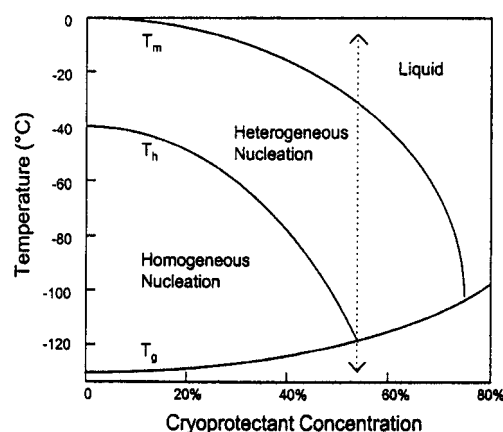
Si el enfriamiento es rápido se pueden formar muchos núcleos, pueden ser cristales de hielo numerosos y pequeños. Si el enfriamiento es lento los cristales de hielo pueden ser pocos y largos, pero estos cristales son inestables; los cristales largos dirigen su crecimiento a expensas de los cristales pequeños suministrando la suficiente temperatura para permitir la migración molecular. Este es el fenómeno de recristalización o maduración Ostwald.

Cuando el enfriamiento es a temperatura muy baja es verdaderamente rápido el proceso de nucleación y puede no tener tiempo de iniciarse la cristalización. En este caso la viscosidad del líquido aumenta con la disminución de temperatura.

Muchas de las propiedades de los cristales difieren dependiendo de los líquidos de los cuales son formados.²⁹

Cristalización: el hielo formado se compone de agua pura, hecho provocado por la separación de las fases (hielo puro y solutos preexistentes) de las soluciones acuosas. Puesto que los solutos permanecen disueltos en el agua no congelada, aumenta progresivamente de concentración a medida que progresa el cambio de estado; ello provoca un incremento continuo de osmolaridad del espacio extracelular.

Estas variaciones osmóticas condicionan la deshidratación y pérdida progresiva del volumen celular durante el proceso de cambio de estado y puesto que la permeabilidad de las membranas celulares es limitada, la duración del cambio de estado define el contenido hídrico y el volumen celular en cada momento de la congelación.²⁵



Vitrificación

Es la solidificación de un líquido, a través de una elevación extrema de la viscosidad durante el enfriamiento. Esta solidificación difiere físicamente de la que resulta de la formación de cristales de hielo, y en ella se mantiene la distribución molecular e iónica normales del estado líquido. El sólido resultante, por tanto, se considera como un líquido súper enfriado extremadamente viscoso. Esta técnica se ha utilizado en la preservación de embriones y tejidos complejos (córneas).

Congelación programada convencional.

Los factores primariamente responsables del daño potencial durante la congelación son la formación de hielo intracelular y el efecto osmótico (solución).

Ambos eventos pueden minimizarse controlando la velocidad de enfriamiento (VE), de forma que no sea excesivamente rápida y pueda formarse hielo a partir del agua libre intracelular, ni excesivamente lenta como para someter a las células a una deshidratación progresiva y a un marcado aumento de la concentración de electrolitos que pueda dañar la membrana.

Las células pueden ser protegidas del daño secundario al efecto osmótico (solución) por agentes que reduzcan la concentración de electrolitos.

Los crioprotectores disminuyen la concentración de sales gracias a sus propiedades coligativas y además, en el caso de los agentes permeantes, protegen también al reducir la temperatura de nucleación dentro de la célula y prevenir así la formación de cristales de hielo.

La VE óptima difiere con cada tipo de célula, probablemente debido a diferentes constantes de permeabilidad al agua y tamaño celular. Las células progenitoras hematopoyéticas son óptimamente congeladas a una velocidad constante entre 1-3 °C/min. Por otro lado el DMSO ha demostrado que es superior a otros crioprotectores en la criopreservación de MO y CPH de SCU y la concentración final recomendada de DMSO es del 10%. Utilizando estos parámetros de congelación se han conseguido las mejores recuperaciones de CFU-S y/o CFU-GM criopreservadas.

Además, la duración de la fase de transición (cambio de estado líquido a sólido) y el retraso en la curva de congelación producida por la liberación del calor latente de fusión que tiene lugar en esta fase, se correlacionan directamente con mayor destrucción celular. Estos efectos pueden ser atenuados con relativa facilidad gracias a los sistemas de congelación programada como el Bioarchivo (Thermogénesis), que permite la entrada brusca de vapor de nitrógeno líquido en el momento adecuado para contrarrestar el calor latente de fusión y evitar un enlentecimiento indeseado de la VE.

Se ha demostrado que con fases de transición inferiores a 4 minutos la pérdida de recuperación de células progenitoras hematopoyéticas es mínima.⁹

La criopreservación bloquea todas las reacciones energéticas y el metabolismo celular.

DESCONGELACIÓN

Durante el procedimiento de descongelación, los cristales de hielo se disuelven generando agua libre. El fluido extracelular se vuelve hipotónico, las células se deshidratan y pueden terminar lisándose. El paso de DMSO de dentro hacia fuera de la célula reduce este efecto posiblemente al compensar la diferencia en la concentración de solutos que progresivamente se va estableciendo a ambos lados de la membrana.

Sin embargo, el propio DMSO no esta exento de toxicidad celular, relativamente escasa a 4°C pero cada vez mayor a medida que aumenta la temperatura del producto descongelado.²⁴

Durante la descongelación pueden suceder dos problemas adicionales que reducen la supervivencia de células congeladas: recristalización con aumento de la formación de hielo intracelular debido a la aglomeración de cristales pequeños de hielo que se puede producir durante calentamientos lentos y shock dilucional por un mecanismo inverso al efecto osmótico (solución).

Empleando una descongelación rápida se reduce la probabilidad de recristalización puesto que la tasa de crecimiento de los cristales de hielo disminuye y eventualmente desaparece del todo por encima de una cierta velocidad de calentamiento.

El uso de crioprotectores muy difusibles como el DMSO, capaces de atravesar rápidamente la membrana celular, disminuye el riesgo de lisis celular al compensar mejor las diferencias de presión osmótica a uno y otro lado de la membrana durante la descongelación.⁹

Dilución del DMSO

De acuerdo a diversos estudios se muestra que después de descongelada la unidad no sufre daño celular por el crioprotector DMSO durante los primeros 30 minutos.¹⁰

La dilución volumen / volumen se realiza con un buffer de albúmina-Dextran 40. Los resultados obtenidos de esta técnica son satisfactorios y reproducibles, con un porcentaje de recuperación de progenitores hematopoyéticos (CFU-GM y BFU-E) después de la descongelación entre el 60 y 80% y un tiempo de preconstitución hematopoyética en pacientes tratados con dosis mieloablativas de quimiorradioterapia inferior a 45 días en la mayoría de los casos.⁹

CAPITULO 2



OBJETIVOS

- Garantizar la calidad hematopoyética de unidades descongeladas en base a la recuperación de células progenitoras hematopoyéticas y su viabilidad antes de ser infundidas para trasplante siguiendo los estándares establecidos por NetCord –FACT.

- Disminuir el efecto tóxico del DMSO para reducir las complicaciones asociadas con la infusión de células criopreservadas debido al crioprotector (DMSO) y la lisis celular de la infusión directa. Complicaciones como nauseas, vomito e hipotensión, fallas renales y complicaciones cardiovasculares.

- Proponer un método que posea trazabilidad y control de calidad.

□ Proponer que con las unidades lavadas beneficien a los receptores principalmente a los pacientes pediátricos ya que la dosis máxima tolerada por el organismo de DMSO es de 1mL/kg de peso.

CAPITULO 3

MATERIAL Y MÉTODOS

PROCEDIMIENTO

Para la estandarización, se siguió un escrutinio previo, que constó de lo siguiente:

Características de las unidades

Se estudiaron 10 unidades de sangre de cordón las cuales fueron recolectadas de junio a octubre 2003 en las unidades maternas que se encuentran en convenio con el Banco de Sangre de Cordón Umbilical del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea.

Diseño de estudio

Se realizó un muestreo al azar de 10 unidades de sangre de cordón umbilical las cuales habían recibido un proceso de reducción de volumen a 21 ml con HES, estas estaban almacenadas en un sistema Bioarchivo Thermogénesis de congelación programada en nitrógeno líquido a -196°C .

Para la estandarización de la dilución volumen/volumen se utilizaron 5 unidades e igualmente las otras 5 fueron utilizadas para la estandarización del método automático de lavado.

Las unidades fueron descongeladas e inmediatamente se les tomó una muestra para realizar análisis de las células, prueba de esterilidad y conteo celular y después se realizó el tratamiento la dilución volumen /volumen y el de lavado. Al término de la dilución y/o lavado se muestrearon las unidades para realizar análisis celular y conteo celular.

Recolección de unidades de sangre de cordón umbilical

Las unidades fueron recolectadas después de un consentimiento informado de las madres. El equipo entrenado del BSCU y el equipo médico y enfermeras de los hospitales en convenio con el BSCU del CNTS, recolectó estas unidades en bolsas especiales para sangre de cordón umbilical las cuales contienen CPDA, antes de la liberación de la placenta. El procesamiento y criopreservación se realiza en el BSCU del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea.

Procesamiento de la unidad de sangre de cordón umbilical

Las unidades de sangre de cordón umbilical fueron procesadas por reducción de volumen, consistiendo de doble buffy coat después de la adición de HES usando el equipo Sepax. El volumen final de las unidades de sangre de cordón procesadas fue de 25 mL con DMSO, en bolsas compatibles con el sistema de termogénesis Bioarchivo.

Criopreservación de unidades de sangre de cordón umbilical

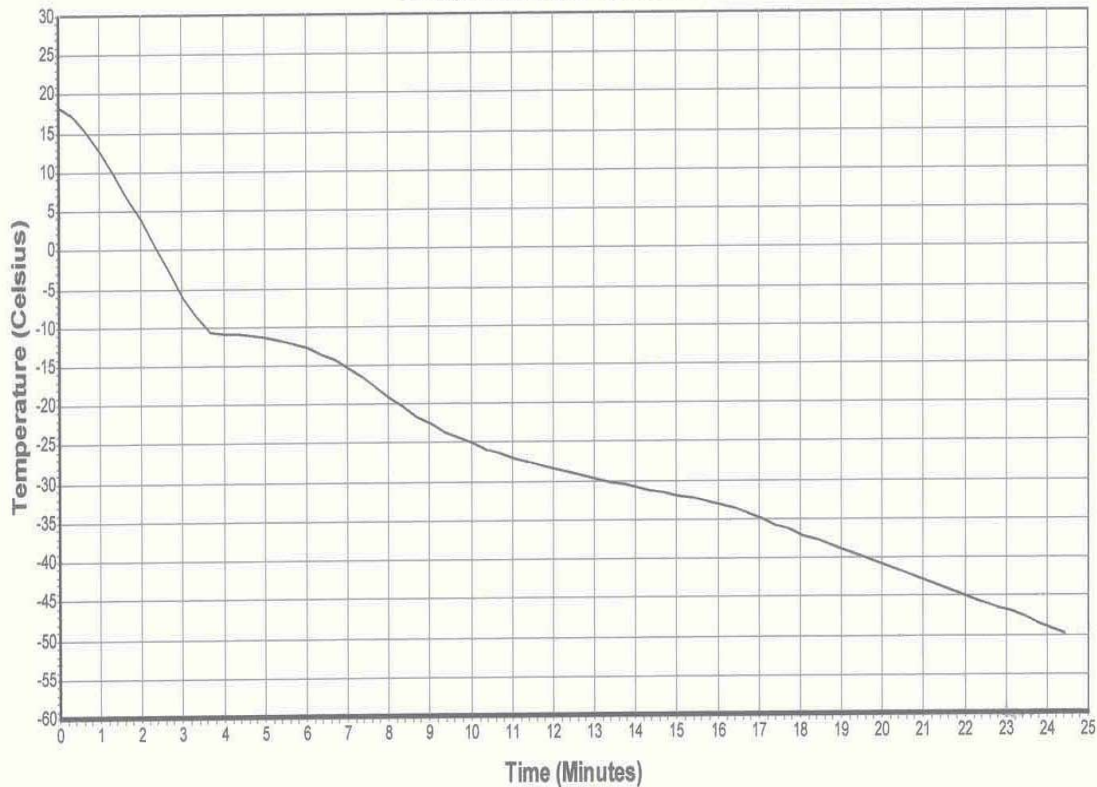
La criopreservación de células progenitoras hematopoyéticas se realizó con ayuda de una solución crioprotectora y DMSO (concentración final 10%), que se añadió lentamente en 10-15 minutos a la suspensión celular a 4°C, con la congelación programada usando el equipo Bioarchivo, programable con control y registro electrónico de la VE. ⁹ E inmediatamente se inició el proceso de congelación con una VE constante de 1°C/min antes y después del cambio de fase, hasta llegar a -50 °C. ⁹ ver gráfica.

CENTRO NACIONAL DE LA TRANSFUSION SANGUINEA

BioArchive System
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION, DESARROLLO Y CONTROL DE CALIDAD
OTHON DE MENDIZABAL 195 COL. ZACATENCO MEXICO DF

Sample: M00010500047500

Storage Date: 7/7/05 12:07:44 PM



Operator ID: MIRIAM

Location: Slot: 135 Ring: 2 Rack2

Profile Used: default

Pre-Freeze: 10C/Min.

End Freeze: -11C

CRF Serial Number: 1101

Start Freeze: -1C

Post Freeze: 2C/Min.

CRF Version: 1.10

Fan Power: 100%

End Temp: -50C

Gráfica de enfriamiento Bioarchivo Termogénesis

Para conseguir este gradiente de temperatura, las bolsas se prepararon con un volumen de 25 mL, se colocaron en una caja metálica canister (foto) y se introdujeron en el CFR, en el puerto del Bioarchivo, y después con un enfriamiento de 2°C/min. hasta -50°C y almacenado en la fase de nitrógeno líquido del equipo (-196 °C).



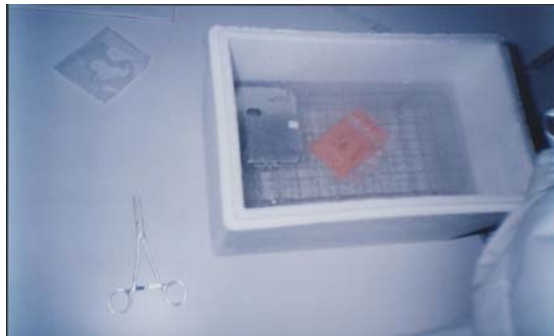
Canister.



Brazo electrónico del Bioarchivo

Descongelamiento de unidades después de almacenarlas en nitrógeno líquido.

La bolsa de la unidad descongelada es elevada a la fase de gas del nitrógeno líquido y expuesta al ambiente para permitir que el plástico recobre algo de elasticidad.



Unidad descongelada

La bolsa es sumergida en baño maría a 37°C para descongelar tan rápido como sea posible, usualmente menos de 2 minutos ¹².



Baño María 37°C

Dilución del DMSO

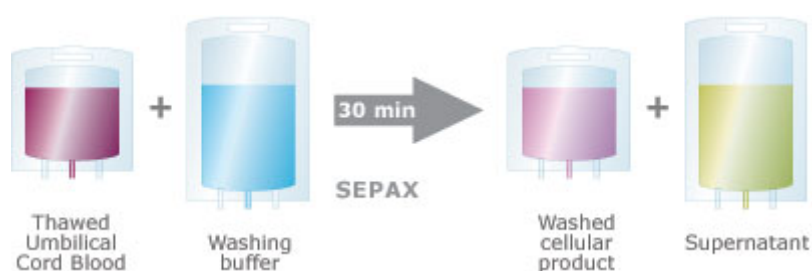
Las bolsas de sangre de cordón almacenadas en nitrógeno líquido fueron descongeladas en baño María. Inmediatamente después de descongelada la unidad fue muestreada para análisis y conectada al buffer de albúmina sérica humana-Dextran 40.

La sangre de cordón es adicionada al buffer lentamente, se deja en equilibrio por 5 minutos se toma una pequeña muestra para análisis e inmediatamente es infundida la unidad.

Lavado automático del DMSO

Las bolsas de sangre de cordón almacenada en nitrógeno líquido fueron descongeladas por inmersión en un baño maría a 37°C. Desde el descongelado de la bolsa de sangre de cordón fue muestreada para análisis de laboratorio y conectado al kit diseñado para lavado de células de sangre de cordón y procesada con el equipo Sepax s-100, la bolsa es conectada hacia un flujo estéril usando dos bayonetas en los dos puertos de la bolsa de criopreservación de termogénesis.

En el otro puerto el kit es conectado al buffer (Dextran 40 y albúmina humana) y tiene dos bolsas adicionales: una para el producto final y la segunda para el producto de desecho. Se elige la dilución inicial de 1:1. ²⁸ Al término de el ciclo de lavado se muestra la unidad para análisis y es infundida inmediatamente al paciente.



Ventajas:

Eliminación de DMSO y plasma hemolizado

Alta recuperación de CD34+ y células mononucleares

Producto final viable por horas (hasta 3 h)

Exámenes de laboratorio

Cuenta celular automática

Antes de la congelación, después de la descongelación y antes del tratamiento de dilución y lavado las células nucleadas fueron contadas con un contador celular automático.

Número de células CD34+

El número de células CD34+ de sangre de cordón umbilical fue evaluado por citometría de flujo (Procount kit). Los procedimientos utilizados para tinción y análisis siguieron la descripción del protocolo provisto por el fabricante. En resumen, en tubos separados TRUCOUNT que contienen perlas se adiciona por separado 20µL de IgG1 o 20µL de CD34PE.

Entonces en cada tubo vaciar 50 μL de muestra de sangre de cordón seguido de agitación con el vortex y bien mezclado. Después de 10 minutos de incubación, se adiciona en cada tubo 450 μL de solución diluida 10x de FACS de lisis. Treinta minutos después las muestras son analizadas usando Citometría de flujo (FACS Calibur) con software (Cell Quest).

El número absoluto por μL de células CD34+ en la muestra es calculado por la siguiente formula:¹¹

$$\frac{\text{Número de eventos celulares de CD34+}}{\text{Número de eventos de microesferas fluorescentes}} \times \frac{\text{perlas por tubo} \times \text{factor de dilución}}{\text{volumen de muestra empleado (50}\mu\text{L)}}$$

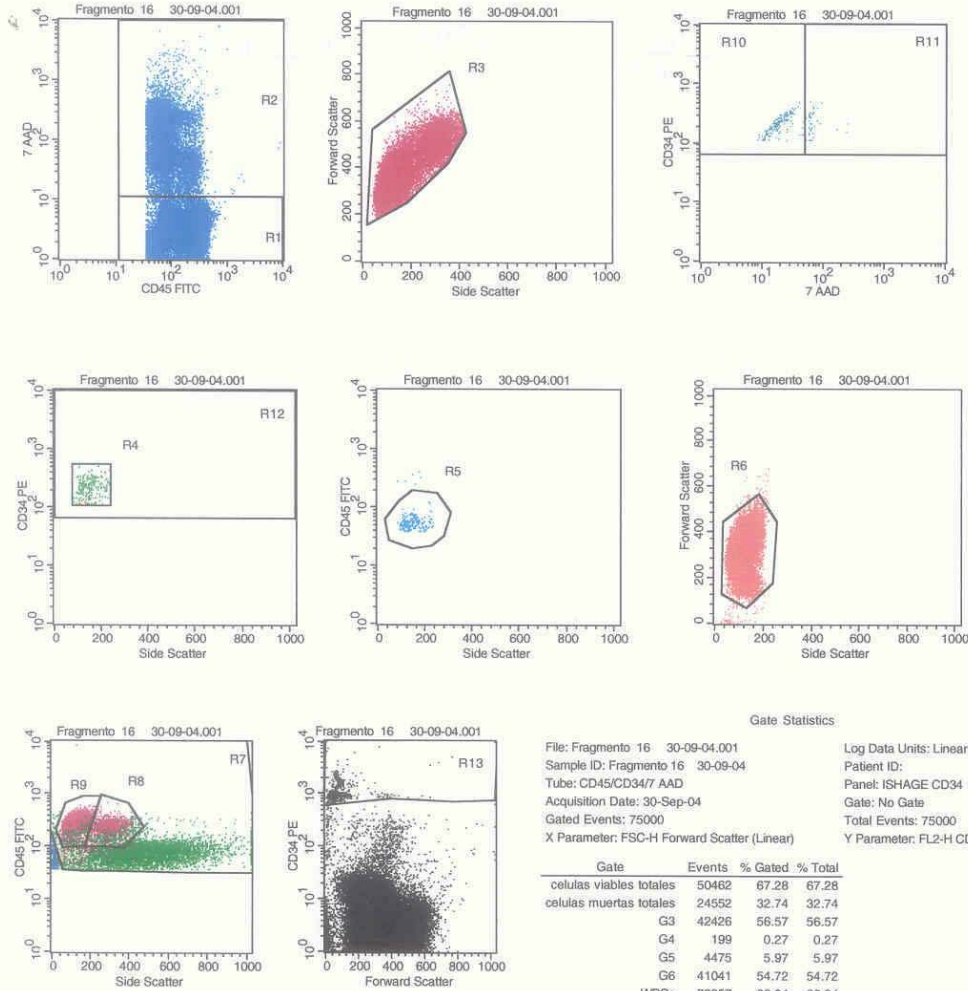
La evaluación de la cuenta absoluta usando análisis de citometría de flujo de plataforma simple, el porcentaje de recuperación de CD34+ se obtuvo con la siguiente formula:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Cuenta celular absoluta post-lavado}}{\text{Cuenta celular absoluta post-descongelado}} \times 100$$

CENTRO NACIONAL DE LA TRANSFUSION SANGUINEA

INVESTIGACION, DESARROLLO Y CONTROL DE CALIDAD

REPORTE
CELULAS CD34+ EN SANGRE DE CORDON UMBILICAL



Gate Statistics:

File: Fragmento 16 30-09-04.001
 Sample ID: Fragmento 16 30-09-04
 Tube: CD45/CD34/7 AAD
 Acquisition Date: 30-Sep-04
 Gated Events: 75000
 X Parameter: FSC-H Forward Scatter (Linear)
 Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: ISHAGE CD34
 Gate: No Gate
 Total Events: 75000
 Y Parameter: FL2-H CD34 PE (Log)

Gate	Events	% Gated	% Total
celulas viables totales	50462	67.28	67.28
celulas muertas totales	24552	32.74	32.74
G3	42426	56.57	56.57
G4	199	0.27	0.27
G5	4475	5.97	5.97
G6	41041	54.72	54.72
WBCs	72257	96.34	96.34
MNCs	6405	8.54	8.54
Linfocitos	38922	51.90	51.90
CD34 viables	156	0.21	0.21
CD34 Muertas	43	0.06	0.06
CD 34 totales	199	0.27	0.27
BEADS	5493	7.32	7.32
POBLACION TOTAL	69507	92.68	92.68

ANALIZO : QBP ANGELICA GOMEZ ROMERO
 SUPERVISO : QFB SAGRARIO ROMERO ESTRELLA
 AUTORIZO : EBC EVA D. CALDERON GARCIDUENAS

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

Gráfica de cuenta de CD34+ post-descongelación

Prueba de esterilidad

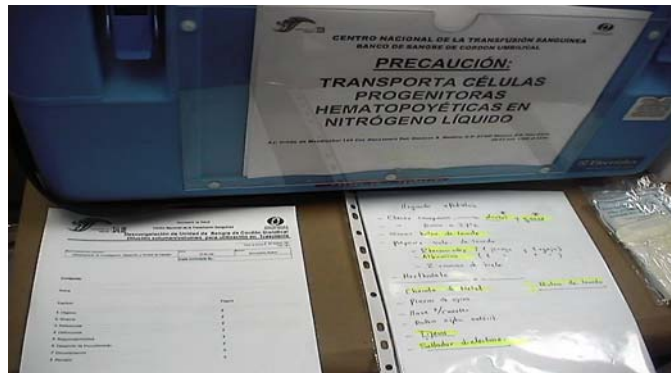
Los cultivos de esterilidad se realizan una vez que se ha separado la muestra de SCU para la congelación previo adición de DMSO, esta se congela de acuerdo al procedimiento de congelación y después del proceso de descongelación. Estos cultivos microbiológicos para aerobios y anaerobios nos aseguran la esterilidad de la unidad y así garantizar el producto para uso con fines terapéuticos.

Se ingresan los frascos en el sistema de incubación automatizado Bact/Alert. Con un diario control, no debe presentarse desarrollo de microorganismos en ninguno de los dos frascos.

Fase de envío y trasplante

Fase de envío y trasplante: depende del centro de trasplante y es responsabilidad del equipo médico que atiende al enfermo receptor. En todo caso, el banco debe velar que el centro de destino de su unidad sea un centro autorizado por las autoridades sanitarias del país para la realización de este tipo de procedimiento terapéutico. Además, el banco debe seguir el resultado de la infusión y del trasplante para detectar posibles anomalías o Incidencias en la recepción del producto.

En el BSCU del CNTS se cuenta con un equipo especial validado para el transporte de las unidades de SCU hacia el centro de trasplante como es el DryShipper. Nos permite transportar la unidad en las mismas condiciones de criopreservación a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante tres días.



CAPITULO 5

RESULTADOS

Se procesaron 10 unidades; 5 fueron diluidas después de la descongelación, encontrándose una media de células nucleadas totales de 7.39×10^8 y las 5 unidades restantes, fueron lavadas después de la descongelación con una media de células nucleadas totales de 5.59×10^8 .

La tabla 1 nos muestra las características completas de las 10 unidades utilizadas para la estandarización de los dos métodos. El promedio de células nucleadas totales para las 10 unidades fue de 6.49×10^8 .

De las 10 unidades que fueron sometidas a estos dos tratamientos se observa que no hay diferencia significativa en recuperación celular cuando se diluye o se realiza lavado.

	Total	Diluidas	Lavadas	Referencia
Número	10	5	5	
Células nucleadas totales $\times 10^8$	6.49	7.39	5.59	8×10^8
CD34 + totales / microlitro	71.69	77.14	66.24	
% CD34 + totales	0.33	0.33	0.34	
CD34 + viables /microlitro	69.08	74.06	64.1	
% CD34+ viables	0.32	0.31	0.34	0.2-0.3
% recuperación	39.6515 %	58.0821 %	21.220 %	60 %
Tiempo de proceso (min)	29.5	18	41	

DILUCIÓN

Al realizar la comparación de la celularidad durante el tratamiento de dilución encontramos los datos mostrados en la tabla 2.

TABLA 2. DILUCIÓN			
	Antes de congelación	Descongelado antes de diluido	Diluido
Células nucleadas totales x10 ⁸	7.392	6.44	5.671
CD34 + totales / microlitro	77.1400	51.0080	28.6880
% recuperación	79.42 %	N/A	58.08 %

Asimismo al graficar CD34+ totales contra el tiempo observamos el comportamiento celular durante la manipulación de las unidades en el transcurso del tratamiento.

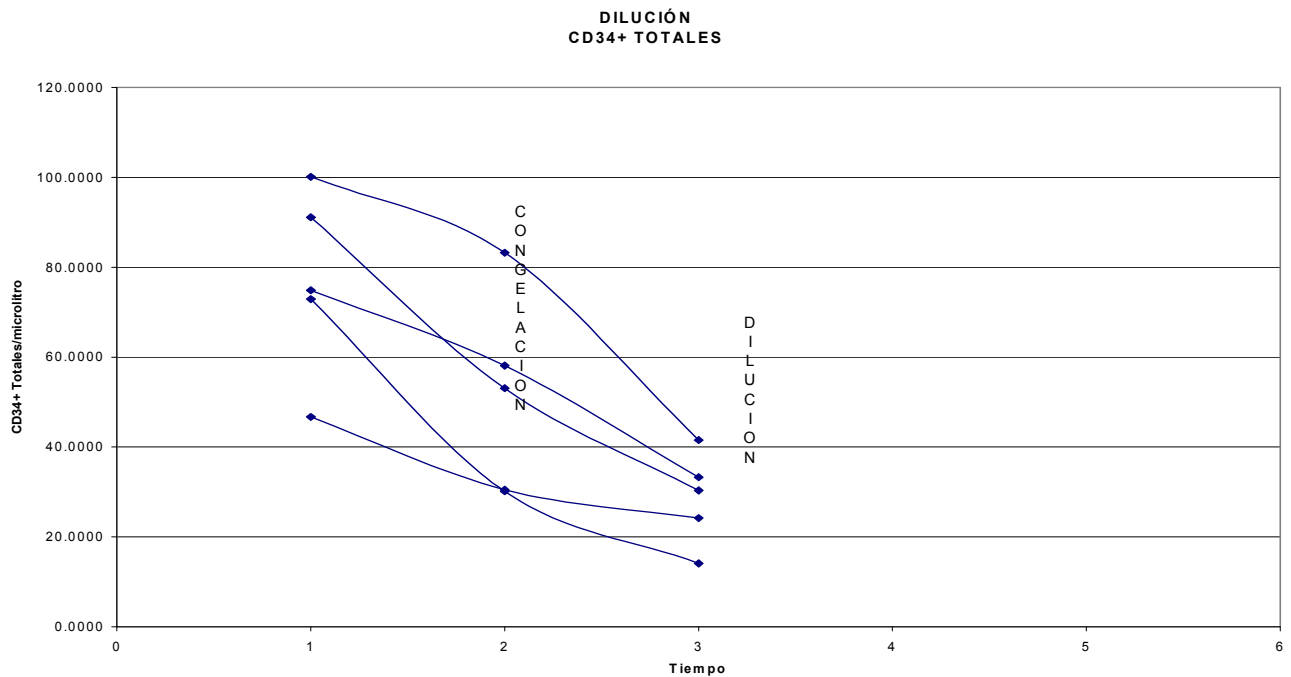


Fig. 1 comportamiento celular dilución

LAVADO

Al realizar la comparación de la celularidad durante el tratamiento de lavado encontramos los datos mostrados en la tabla 3.

TABLA 3. LAVADO			
	Antes de congelación	Descongelado antes de diluido	Lavado
Células nucleadas totales x10 ⁸	5.518	3.48	2.192
CD34 + totales / microlitro	66.2400	32.1047	9.1076
% recuperación	59.72	N/A	21.2208

La gráfica nos muestra el comportamiento celular durante la manipulación de las unidades en el transcurso del tratamiento.

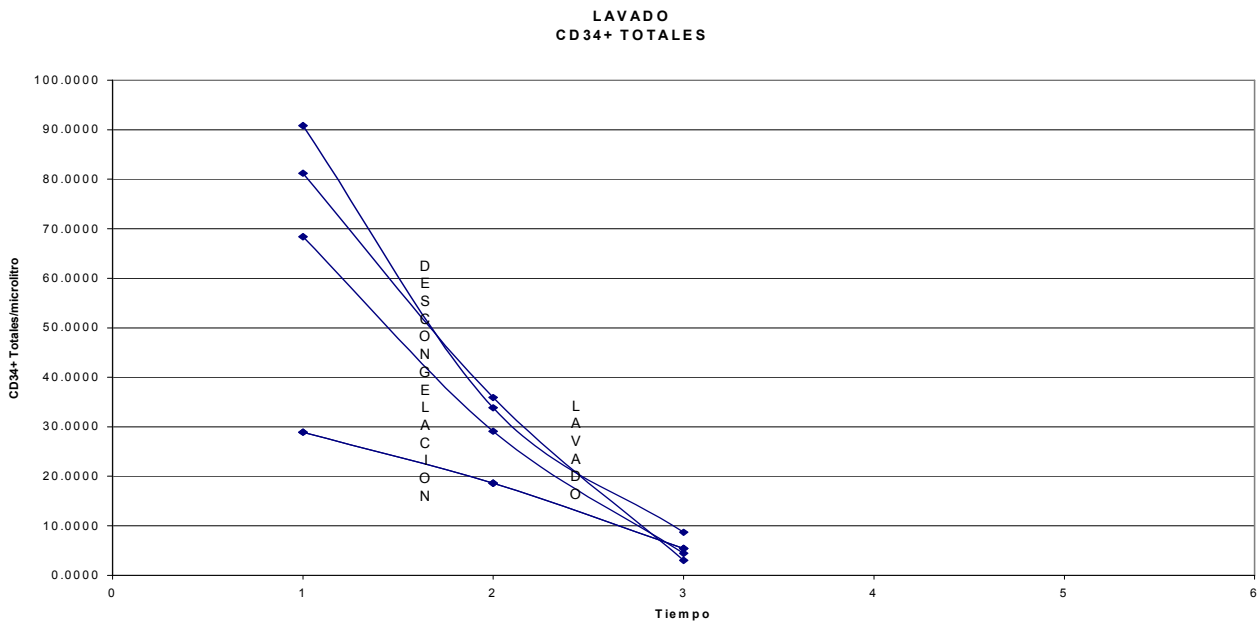


Fig. 2. comportamiento celular lavado

De acuerdo a la figura 1 y la figura 2; la dilución nos da un promedio de proceso de 16 minutos con un rango de 15 a 20 minutos, mientras que utilizando el Sepax s-100 con el método automatizado nos da una media de 34 minutos con un rango de 40-45 min.

En los dos métodos tenemos ausencia de contaminación microbiológica. En la figura 3 observamos que la tendencia de la viabilidad de las células CD34+ totales es constante hasta tres horas después de lavada la unidad.

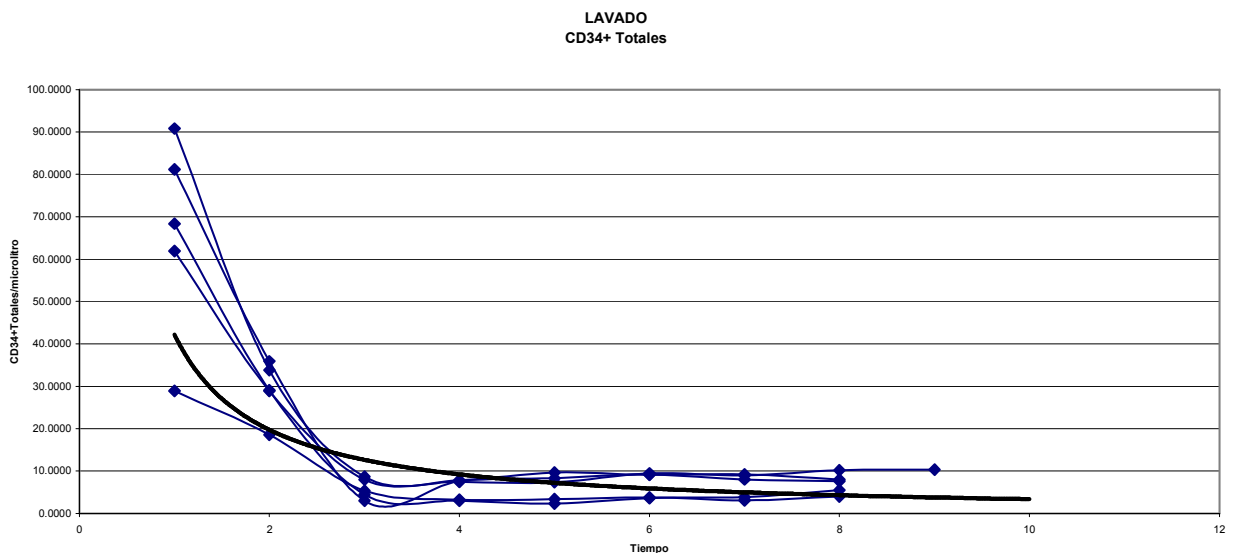


Fig. 3. comportamiento celular dilución

En esta gráfica observamos la tendencia que muestran las células CD34+ totales durante el transcurso de tres horas después de haber sido diluida.

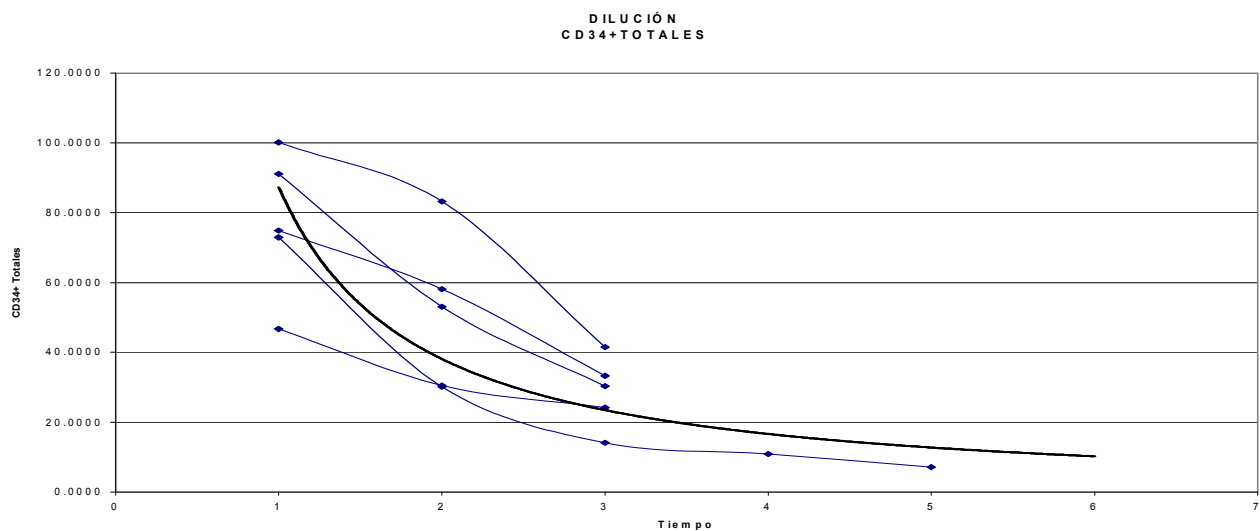


Fig. 4. comportamiento celular durante el tiempo

Comparación de viabilidad y recuperación de CD34+ Totales y Viables

La tabla 4 nos muestra datos comparativos del proceso de reducción de volumen contra la descongelación y se puede observar que no hay pérdida significativa de células CD34+ totales y viables.

DILUCIÓN

TABLA 4.									
Proceso vs Descongelación									
	Proceso n=5			Descongelación n=5			P	U	
	Media	Mediana	Rango	Media	Mediana	Rango			
CD34+ Viables/ microlitro	74.06	70.05	7.4	46.26	48	3.6	0.0601		
CD34+ totales /microlitro	77.140	74.9	7	51.008	53.06	4	0.1443		
% recuperación	79.42	87.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

La tabla 5 muestra que no hay pérdida significativa de células CD34+ totales y CD 34+ viables.

TABLA 5.									
Descongelación vs Dilución									
	Descongelación n=5			Dilución n=5			P	U	
	Media	Mediana	Rango	Media	Mediana	Rango			
CD34+ Viables/ microlitro	46.26	48	7.4	10.59	30.57	3.6	0.060		3
CD34+ totales /microlitro	51.008	53.06	7	28.688	30.36	4	0.1443		5
% recuperación	N/A	N/A	N/A	58.082	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

La tabla 6 nos indica que la diferencia entre los dos grupos de observaciones no es significativa, o sea que se debe a eventos aleatorios.

LAVADO

TABLA 6.									
Proceso vs Descongelación									
	Proceso n=5			Descongelación n=5			P	U	
	Media	Mediana	Rango	Media	Mediana	Rango			
CD34+ Viables/ microlitro	64.1	65.6	7.8	24.51	25.46	3.2	0.0214	1	
CD34+ totales /microlitro	66.24	68.4	7.3	29.26	29.1	3.7	0.0751	3.5	
% recuperación	59.72	47.7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	

La tabla 7 nos muestra que hay diferencia significativa entre los dos grupos de observación

TABLA 7.									
Descongelación vs Lavado									
	Descongelación n=5			Lavado n=5			P	U	
	Media	Mediana	Rango	Media	Mediana	Rango			
CD34+ Viables/ microlitro	24.51	25.46	8	7.83	6.97	3	0.01 21	0	
CD34+ totales /microlitro	29.26	29.1	8	5.91	5.4	3	0.01 21	0	
% recuperación	N/A	N/A	N/A	21.220	N/A	N/A	N/A	N/A	

CAPITULO 6

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Análisis estadístico

U-Mann-Whitney prueba no paramétrica para muestras independientes fue usada para comparar la viabilidad de las células CD34+ durante el proceso de congelación, descongelación y el tratamiento de dilución y/o lavado. Media, desviación estándar, medianas y rangos fueron usados para la descripción del análisis.

Las 10 unidades utilizadas para la estandarización de dilución y lavado automático fueron elegidas de forma aleatoria de la existencia del banco de sangre de cordón umbilical.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

La sangre de cordón necesita ser criopreservada hasta ser usada, usando DMSO, el crioprotector más popular.

Como se ha observado en estudios anteriores, las unidades lavadas (se elimina el DMSO) y no lavadas (dilución del DMSO) no presentan diferencias significativas de recuperación y viabilidad celular¹¹, en este estudio se estandarizaron los dos métodos: el de dilución volumen/volumen y el método automático de lavado de SCU con el equipo Sepax BIOSAFE.

El objetivo de este estudio fue realizar la estandarización de los dos métodos de preparación y acondicionamiento de las unidades de sangre de cordón umbilical usadas para trasplante, para poder brindar seguridad y garantizar la calidad hematopoyética.

DILUCIÓN

La tabla 4 compara el proceso de reducción de volumen contra la descongelación y la tabla 5 de la descongelación contra la dilución. Ambas tablas muestran que no hay diferencias significativas de pérdida celular durante la manipulación de las muestras.

La tabla 4 nos da un valor de $p=0.14$ y la tabla 5 nos da un valor de $p=0.14$, que es un valor mayor a $p=0.005$ que nos indica que las muestras son iguales, los rangos tienen valores muy cercanos, esto nos indica que la pérdida de células CD34+ debidas a la descongelación, realizada en la estandarización del método de dilución, no es significativa.

De acuerdo a los resultados obtenidos encontramos que las unidades utilizadas para la estandarización de la dilución volumen / volumen no presentan pérdidas significativas de celularidad durante la manipulación de la unidad.

A su vez la cuenta de células blancas realizada por citometría, fue cambiada significativamente en la pos-descongelación al igual que las células MNC, mientras que los linfocitos no presentaron disminución significativa. Esto se ve reflejado en las células muertas totales.

LAVADO

La tabla 6 nos muestra que no hay diferencias significativas al comparar el proceso de reducción de volumen contra la descongelación ya que tenemos un valor de $p = 0.07$.

La tabla 7 nos dan un valor de $p = 0.012$ esto nos indica que hay diferencia entre los dos grupos de observación y por lo tanto la diferencia es significativa.

De acuerdo a los resultados obtenidos encontramos que las unidades utilizadas para la estandarización de lavado presentan pérdidas de celularidad durante el lavado de la unidad. Sin embargo la cuenta de células blancas totales, de citometría disminuyeron dramáticamente en la pos-descongelación al igual que los linfocitos, mientras que las MNC no presentaron disminución significativa.

Por lo tanto observamos que no hay pérdida significativa de las células madre hematopoyéticas CD34+ de sangre de cordón umbilical.

Dilución /Lavado

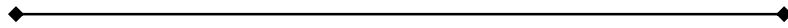
La dilución nos da un promedio de proceso de 16 minutos con un rango de 15 a 20 minutos. Mientras que el lavado nos da un promedio de 41 minutos con un rango de 40 a 50 minutos.

Se realizó una comparación de recuperación de CD34+ totales y viables de las unidades analizadas. Se tomaron tres puntos de muestreo antes de la congelación, post-descongelación y dilución.

A cada punto de muestreo se realizó cuenta de glóbulos blancos y cuenta de células CD34+ por citometría de flujo.

No hay diferencias significativas para la cuenta encontrada entre el pre-congelado y pos-descongelado de células progenitora hematopoyéticas en CD34+, la bolsa de criopreservación de la sangre de cordón placentaria contiene dos compartimientos (20 ml y 5 ml) ambas mostraron similar viabilidad.

CAPITULO 7



CONCLUSIONES

El DMSO produce alta osmolaridad resultando en un shock osmótico de las células descongeladas utilizadas en trasplante, para resolver este problema en este estudio se realizó la estandarización del método de dilución y el método de lavado. Con el afán de que todos los bancos de sangre de cordón umbilical que cuenten con la infraestructura adecuada y aprobada para realizar trasplantes, tengan ambos métodos estandarizados para las unidades empleadas en trasplantes, siguiendo los estándares de NetCord-FACT al igual que los sigue el BSCU del CNTS.

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos asegurar que la calidad de las unidades de sangre de cordón umbilical procesadas, criopreservadas, descongeladas y diluidas y/o lavadas en el banco de sangre de cordón umbilical del CNTS, destinadas para trasplante de células madre cumple con los estándares de NetCord-FACT así mismo se garantiza que la viabilidad de las células CD34+ es la adecuada para la reconstitución hematopoyética requerida por el receptor.

Se concluye que la condición para el proceso de criopreservación y descongelado de células progenitoras hematopoyéticas pueden ser dañino para células maduras y células con tamaño grande, como el granulocito, pero conveniente al linfocito y monocito, sobre todo para las células con tamaño pequeño, como las CD34+.²⁰

Al realizar la estandarización de los dos métodos de preparación de las unidades listas para trasplante se propone:

- ✓ Utilizar el método de dilución cuando el paciente tenga un peso mayor a 15 kg, debido a la dosis tolerada del crioprotector DMSO de 1mL/kg de peso con un régimen de tratamiento establecido y adicional a esto con hipervolemia (aumento de diuréticos y aumentar el volumen de agua corporal) para favorecer la rápida eliminación del crioprotector ya que este puede producir alta osmolaridad, disnea, vómito.
- ✓ Utilizar el método de lavado automático usando el equipo Sepax BIOSAFE, en niños con un peso menor de 15 kg de peso ya que al eliminar el DMSO se eliminarán los efectos producidos por el crioprotector.
- ✓ El lavado permite la eliminación de DMSO y plasma hemolizado, así como una alta recuperación de CD34+ y células mononucleares; además de que obtenemos un producto final con viabilidad celular suficiente hasta por 3 horas. Se tiene un mejor control de las unidades usadas para trasplante ya que es un equipo automatizado seguro por realizarse todo el tiempo en un sistema cerrado, así obteniendo unidades libres de contaminación bacteriana y fúngica y asegurarnos una alta calidad hematopoyética siguiendo los estándares de NetCord -FACT.

De acuerdo a los datos obtenidos en la cuenta celular de CD34+ que se realizó de las unidades cada media hora, en los dos métodos estandarizados no se encontró diferencia significativa de la recuperación celular de CD34+ debido al proceso y al tratamiento.

Es necesario usar protocolos validados y estandarizados para ambos métodos, dilución y lavado, esto nos va a permitir tener recuperación de células con pocas variaciones de un banco de cordón a otro, si todos los bancos de sangre de cordón que realizan trasplantes en México, se apegan a los estándares de NetCord-FACT.

Este estudio nos permitió comparar los datos obtenidos de la dilución y del lavado y al igual que los obtenidos por el Dr A. Takahashi del departamento de hematología / oncología, del Instituto de Ciencia Médica de Tokio. Tokio, Japón,¹¹ no encontramos diferencia significativa en cuanto a recuperación de células CD34+, al comparar los dos tratamientos de dilución contra lavado. Así también concordamos con el Dr. S.Querol del departamento de criobiología y terapia celular del instituto de Reserva Oncológica. Barcelona, España,²⁸ que la automatización del procesamiento de sangre de cordón umbilical, ayuda a estandarizar los métodos de procesamiento usados por diferentes bancos de sangre de cordón que realicen trasplantes.

Finalmente se concluye que los bancos de sangre de cordón umbilical que realizan trasplantes deben tener trazabilidad en sus métodos de procesamiento, criopreservación, descongelación y dependiendo de las condiciones del receptor y la indicación del médico responsable encargado del trasplante, realizar el método de dilución y/o el método de lavado siguiendo los estándares de NetCord-FACT, para así asegurar la calidad hematopoyética de las células CD34+ de las unidades y estas puedan restablecer la hematopoyesis del receptor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. L. Amat, S. Querol, C. Molina, C. Salvador, I. Badell, J. García, J. M. Lailla. *La sangre de cordón umbilical, una nueva fuente de progenitores hematopoyéticos para trasplante. Análisis de nuestra experiencia en la recolección y procesamiento.* Obstetricia y ginecología 1996; 8:571-579.
2. Harvey L. Bank, Kelvin G. M. *Basic Principles of Cryobiology.* Vol. 1, No. 3, 1987, Supplement.
3. Arakawa T, Carpenter J F, Kita YA, Crowe JH. *The basis for toxicity of certain cryoprotectants: A. hypothesis.* Cryobiology 27, 401-415.1990.
4. Fahy GM, Mc Farlane DR, Angell CA, Meryman HT. *Vitrification as an approach to cryopreservation.* Cryobiology 21, 407-426.1984.
5. Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, Douglas MJ, Meryman HT. *Cryoprotectant Toxicity and Crioprotectant toxicity Reduction: In search of molecular Mechanisms.* Cryobiology 27, 247-268.1990.
6. García J, Vila L. *Criopreservadores: concepto y manejo.* Biología y clínica hematológica 6, 219-225.1984.
7. Meryman HT. *Cryopreservation of blood cells and Tissues.* In "clinical practical of transfusion medicine". Petz LD, Swisher SN. Churchill Livingstone, 297-314.1989.
8. Vila L. *Principios químico-físicos de la criopreservación de material biológico.* Biología y clínica hematológica 6, 227-236. 1984.
9. P. Bornstein Sanchez. *Congelación: métodos convencionales / métodos alternativos.*
10. I Heschel, R Speetzen, Th GroSS, V Rindler, G Rau. *Fundamental aspects and clinical applications of cryobiological research.*
11. Tokiko Nagmura-Inoue, Mika Shioya, Michiko Sugo, Yan Cui, Atsuko Takahasi, Satomi tomita, yizhou Zheng, Kei Takada, Hideko Kodo, Shigetaka Asano, and Tsuneo A. Takahashi; *Wash-out of DMSO does not improve the speed of engraftment of cord blood transplation: follow-up of adult patients with units shipped from a single cord blood bank.* Volume 43, September 2003. TRANSFUSION.
12. Rubinstein P., 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): p 10119-22.
13. *Enumeration of CD34+ cell in cord blood: A varration on a Single-platform flow cytometric method based on the ISHAGE Gating Southbank* Victoria, Australia. Cytometry (communications in clinical cytometry) 46:254-261 (2001).
14. Olga I. Gan, Barbara Murdoch, Andre Larochele, and John E. Dick. *Differential Maintenance of Primitive Human SCID-Repopulating Cells, Clonogenic Progenitors, and Long-Term Culture-Initiating Cells after incubation on Human Bone Marrow Stromal Cells.* Blood, Vol. 90 No. 2 (July 15), 1997: pp. 641-650.
15. T. Roßmanith, B. Schröder, G. Bug, P. Müller, T. Klenner, R. Knaus, D. Hoelzer, O.G. Ottmann. *Interleukin 3 Improves the Ex Vivo Expansion of Primitive Human Cord Blood Progenitor Cells and Maintains the Engraftment Potential of SCID Repopulating Cells.*

16. Kutzbreg J, Laughlin M, Graham ML, et. *Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients.* N Engl J Med 1996; 335:157-66.
17. Yossi Cohen, Arnon Nagler. *Cord blood biology and transplantation.* IMAJ 2004, Vol 6; 39-46.
18. P Mao, S Wang, Z Zhu, Q Liv, Y Xuv, W Mo, Y Ying. Umbilical cord blood transplant for adult patients with severe aplastic anemia using anti-lymphocyte globulin and cyclophosphamide as conditioning therapy. Bone marrow transplantation (2004) 33, 33-38.
19. Ornella Belvedere, Cristina Feruglio, Walter Malangone, Maria L. Bonora, Alessandro M. Minisini, Riccardo Spizzo, Annibale Donini, Pierguido Sala, Dino De Anna, David M. Hilbert, Alberto Degrossi. *Increased Blood Volume and CD34⁺CD38⁻ Progenitor Cell Recovery Using a Novel Umbilical Cord Blood Collection System.* Stem Cells, Vol. 18, No. 4, 245-251, July 2000
20. Liu J, Zhou SY, Huang GD, Huang Y, Wang YS, Chen DZ, Huang Z, Chen LN. *Cryobiological characteristics of placental cord blood preserved in BioArchive auto-preserved liquid nitrogen system.*
21. Rubinstein P, John W. Adamson, A and Cladd Stevens. *The Placental/Umbilical Cord Blood Program of the New York Blood Center A Progress Report.* Volume 88, Issue 3, pp. 795-802, 08/01/1996.
22. Anna Rita Migliaccio, John W. Adamson, Cladd E. Stevens, N. Ludy Dobrila, Carmelita M. Carrier, and Pablo Rubinstein. *Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity.* Blood, 15 October 2000, Vol. 96, No. 8, pp. 2717-2722
23. *Sistema de procesamiento celular.* Manual de operación. Biosafe.
24. García J, Bornstein R, Lamana M, Maldonado J, Pérez de Oteyza J, Regidor C. *Obtención y manipulación de precursores hematopoyéticos (manual de técnicas).* Grupo de criobiología y biología del TMO
25. Farrant J. *General observations on cell preservation.* En: Ashwood smith MJ, Farrant j. *Low temperature preservation in Medicine and Biology.* Nueva York, Londres: Pitman Medical, 1980; 1-18.
26. Manual de operación Thermogénesis.
27. G.J. Ruiz-Arguelles/J.F. San Miguel. *Actualización en leucemias.* Editorial medica panamericana. 1ª edición, 1996.México.
28. l. Rodríguez, C. Azqueta, S. Azzalin, J. García, S. Querol. *Automatic washing of thawed cord blood for transplantation: high cell recovery using Sepax device*
29. Pegg, D.E. *cryobiology tutorial II. The effect of temperatures below 0°C in the biophysics of organ preservation.* Edited by D.E.Pegg and A.M. published by plenum press, New York.1987.