



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EL CONTROL DE CALIDAD PRE-TRASPLANTE EN LAS UNIDADES DE
CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS CRIOPRESERVADAS DE
CORDÓN UMBILICAL: UNA ACCIÓN OBLIGADA PARA EL ASEGURAMIENTO
DEL INJERTO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

BEATRIZ AMANDA VICTORIA OCHOA ROBLEDO

MÉXICO, D.F.

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.



Jurado asignado:

Presidente	Prof. EVA DELIA CALDERÓN GARCIDUEÑAS
Vocal	Prof. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ
Secretario	Prof. ARACELI MENDIETA RERGIS
1er. Suplente	Prof. JAVIER FERNÁNDEZ TORRES
2º. Suplente	Prof. MARICELA RAMÍREZ SALDAÑA

Sitio en donde se desarrolló el tema:

CENTRO NACIONAL DE LA TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA

Asesor del tema:

MASS. EVA DELIA CALDERÓN GARCIDUEÑAS _____

Sustentante:

BEATRIZ AMANDA VICTORIA OCHOA ROBLEDO _____



AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Maria Isabel y Jovito, quienes han sido lo mejor de mi vida. Gracias por creer en mí siempre, más que yo misma, por entenderme, por guiarme, por apoyarme en mis decisiones, por confiar en mí, ya que sin su comprensión y cariño nunca hubiera llegado hasta donde estoy. Esto es sólo una pequeña muestra de todo lo que quisiera ser y hacer por ustedes. Los amo.

A mi hermano Claudio Augusto por sus sonrisas, abrazos y alegría; por fastidiarme siempre para hacer de mí alguien mejor. Eres un amigo muy preciado y sabes que te quiero mucho.

A mis niñas, María Fernanda y Abril Amahia, por alegrar mis días, por quererme mucho, por darme muchos besos y por permitirme verlas crecer tan sanas y bonitas. Las quiero mucho.

A Ale, gracias por ser una buena amiga, incondicional y sincera, te aprecio mucho, además de ser la causante de mis dos dolores de cabeza y alegrías más grandes.

A Eva Calderón, por confiar en mí sin conocerme, por poner en mis manos un trabajo tan importante; por su ayuda, comprensión, sus consejos. Por ser la mejor maestra que he podido tener y sobre todo por ser una amiga tan querida y confiable.

A Miriam y Ana Denhi que con paciencia me han enseñado, que me han escuchado siempre que lo he necesitado, porque siempre están allí para mí, por su amistad incondicional, por las risas y porque siempre serán para mí más que compañeras, lindas amigas y maestras. Las quiero muchísimo, sin ustedes no hubiera podido lograr todo esto.

A Javier y Toño por sus consejos y enseñanzas, por hacerme reír tanto, por su amistad y cariño, por todo lo que han hecho por mí. Gracias por estar en mi vida muchachos.

A mis compañeros del Centro Nacional: Maribel, eres una niña súper linda, Salvador, Armando, Pepe, el inge Celerino, Angie, Lalo, Araceli por hacer mi estancia en este Centro más agradable.

A la UNAM por darme la oportunidad de aprender dentro de sus maravillosas instalaciones, por ser la mejor y dejarme ser parte de ello. A mis profesores de la Facultad de Química, los cuales en conjunto logran que lo anterior se lleve a cabo y espero llegar a ser una persona de bien para que el esfuerzo no haya sido en vano.

A mis mejores amigas: Elsa, Arabel, Angélica, Alma, porque siempre me apoyan y confían en mí, porque siempre están conmigo pase lo que pase. Gracias por



dejarme entrar en sus vidas y por darme la inmensa satisfacción de ser su amiga. Las quiero muchísimo.

A mis mejores y súper amigos de la Facultad: Isaura, Vicky, Mayell, Rogelio, Aracne, Christian, Helenita, Cecilia, Erandi y José. Gracias por sus consejos, su cariño y sobre todo por su amistad.

A Quetza, por su cariño y comprensión. Eres una personita súper especial para mí y te agradezco que no me hayas dejado sola en todos estos años.

A mis abues Sotero y Amelia, y toda mi familia, mis primos y mis tías que quiero muchísimo.

A los señores Isabel y Francisco que me han abierto las puertas de su casa y me han apoyado incondicionalmente.

A Alfonso, por todo lo que haces por mí. Por tu cariño, tu apoyo y tu honestidad. Por tu manera tan rara de amarme y querer siempre que sea la mejor. Por estar siempre conmigo, cuidándome y procurándome. Por el simple hecho de haber salido adelante juntos después de toda nuestra historia. Te amo.

Y, lo más importante de todo: a Dios, porque a pesar de mis constantes reproches, controversias e inseguridades me ha dejado dar un paso tan importante en mi vida, en compañía de mis seres queridos, y nunca me ha abandonado. A ti, principalmente, dedico todos mis logros en esta vida y te agradezco que me permitas vivirla bajo tu bondad.



**EL CONTROL DE CALIDAD PRE-TRASPLANTE EN LAS UNIDADES DE
CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS CRIOPRESERVADAS DE
CORDÓN UMBILICAL: UNA ACCIÓN OBLIGADA PARA EL ASEGURAMIENTO
DEL INJERTO**

**INDICE**

	Página
ABREVIATURAS	1
I. INTRODUCCIÓN	3
II. GENERALIDADES	5
1. EL PROCESO DE LA HEMATOPOYESIS	6
2. LAS CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS	8
2.1 La sangre de cordón umbilical: Una fuente alternativa de CPH	8
3. LOS TRASPLANTES DE CÉLULAS MADRE DE CORDÓN UMBILICAL	10
3.1 ¿Por qué utilizar CPH de sangre de cordón umbilical?.....	10
3.1.1 Donación de sangre de cordón umbilical.....	11
3.1.2 Breve historia de los bancos de sangre de cordón umbilical ..	12
3.1.3 Netcord como organización regulatoria de los BSCU	13
3.2 Caracterización inicial del producto	14
3.2.1 Fenotipificación celular	14
3.2.2 Detección de serología positiva y cultivos microbiológicos positivos	15
3.2.3 Cuenta de células nucleadas totales y CD34+ viables	15
4. EL CONTROL DE CALIDAD PRE-TRASPLANTE	16
4.1 La importancia de la trazabilidad en los estudios de SCU	17
4.2 Seguridad transfusional	17
4.2.1 Tipificación AB0/Rh	18
4.2.2 Determinación de antígenos de histocompatibilidad HLA	18



4.2.3 Las pruebas serológicas: detección de VIH, HBsAg, HVC, PRR, Chagas, Toxoplasmosis	20
4.2.3.1 La prueba de NAT	20
4.3 Calidad Hematopoyética	21
4.3.1 Cuenta de GBT y caracterización de CD34+	22
4.3.2 Los cultivos clonogénicos como herramienta para la predicción del injerto	24
III. OBJETIVO	27
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	28
a) Extracción de unidades de SCU congeladas del bioarchivo	29
b) Determinación de HLA en sangre: clase I (locus A, B, C), y clase II (locus DR y DQ) por técnicas de ADN	30
c) Tipificación directa del grupo sanguíneo ABO y del antígeno D del sistema Rh	32
d) Pruebas serológicas	34
e) Determinación de células CD34+ por citometría de flujo	34
f) Siembra de cultivos clonogénicos	35
V. RESULTADOS	37
VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS	46
VII. CONCLUSIONES	52
VIII. REFERENCIAS	54
ANEXO	64



ABREVIATURAS

1. BFU-E: Unidades Formadoras del Bazo-Eritroides
2. BSCU: Banco de Sangre de Cordón Umbilical
3. CFU-GM: Unidades Formadoras de Colonias-Granulocíticas, Monocíticas
4. CFU-MIX: Unidades Formadoras de Colonias Mixtas
5. CMV: Citomegalovirus
6. CNT: Células Nucleadas Totales
7. CNTS: Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea
8. CPH: Células Progenitoras Hematopoyéticas
9. ADN: Ácido Desoxirribonucleico
10. E-CLONE: Eficiencia clonogénica
11. EICH: Enfermedad Injerto contra Hospedero
12. GBT: Glóbulos Blancos Totales
13. GR: Glóbulos Rojos
14. HbsAg: Antígeno de superficie de Hepatitis B
15. HCV: Virus de Hepatitis C
16. HLA: Antígenos Leucocitarios Humanos
17. IMDM: Medio Dubelco Modificado de Isocove
18. NAT: Prueba de Ácidos Nucleicos
19. PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
20. RPR: Prueba de Reaginas Rápidas
21. SCU: Sangre de cordón umbilical
22. VDRL: Laboratorio de investigación de enfermedades venéreas (prueba)



23. VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

24. 7ADD: 7-aminoactinomicin-D



EL CONTROL DE CALIDAD PRE-TRASPLANTE EN LAS UNIDADES DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS CRIOPRESERVADAS DE CORDÓN UMBILICAL: UNA ACCIÓN OBLIGADA PARA EL ASEGURAMIENTO DEL INJERTO

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, está demostrado que la sangre de cordón umbilical cuenta con células progenitoras hematopoyéticas en suficiente cantidad, capaces de reestablecer el funcionamiento medular gracias a su alta capacidad de proliferación y diferenciación, así como su alta inmadurez, lo que representa una fuerte ventaja con respecto a las células provenientes de médula ósea, ya que al provenir de personas adultas, y haberse encontrado expuestas a diversos antígenos, generan cierto tipo de memoria, lo cual hace que el rechazo injerto contra huésped sea mucho más frecuente.

Considerando lo anterior, se debe tomar en cuenta que el paciente que va a recibir dichas células debe ser preparado especialmente para esta terapia, y sin importar la fuente de donde provengan las células, es sometido a tratamientos que reducen sus niveles de defensa al mínimo, con lo cual se debe establecer un estricto control tanto en el manejo inicial de las células que serán congeladas para su posterior utilización, así como antes de ser infundidas en el paciente.

De este modo se puede garantizar que el producto celular en cuestión tiene alta calidad hematopoyética y que se han llevado a cabo todos los controles que nos permiten asegurar al cien por ciento la seguridad transfusional en dicha muestra.

Para ello hemos realizado estudios que avalan la calidad de las unidades que se encuentran congeladas, tales como: determinación de antígenos leucocitarios



humanos por biología molecular o HLA, tipificación de grupo sanguíneo ABO y Rh, pruebas de serología infecciosa y, muy importantes para la predicción del injerto, cuenta de células CD34+ viables y siembra de cultivos clonogénicos.

Los resultados obtenidos arrojan la importancia de la cuenta de células por citometría de flujo, la cual se encuentra relacionada con la capacidad clonogénica del cultivo; ambos son parámetros indispensables para garantizar la expansión celular y que el individuo tenga la seguridad de un injerto exitoso y eficiente.



II. GENERALIDADES

El descubrimiento de las células madre o CPH se llevó a cabo gracias al desarrollo de la teoría de un precursor común denominado célula pluripotencial hematopoyética, la cual, se creía, tenían la capacidad de diferenciarse en todas las estirpes celulares sanguíneas, además de su alta capacidad proliferativa y de autorrenovación. Esta teoría se comprobó más tarde gracias a los estudios de Hill y McCulloch, que en 1961 demostraron que las células progenitoras eran capaces de repoblar el bazo de ratones que fueron previamente irradiados a dosis letales con el fin de eliminar la mayor cantidad de células hematopoyéticas. Estos ratones fueron posteriormente infundidos con células de la médula ósea de ratones sanos, mostrando recuperación de la función medular y del bazo.

En la actualidad se sabe que las células madre hematopoyéticas existen poblando principalmente la médula ósea, órgano en el cual se lleva a cabo la hematopoyesis, que es el proceso por el cual se forman todas las células sanguíneas (1).



1. EL PROCESO DE LA HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis comienza en el saco vitelino aproximadamente a los 19 días y hasta casi los tres meses de vida embrionaria, donde ahora es el hígado fetal el que se convierte en el mayor productor de las células sanguíneas. No es sino hasta el tercer trimestre de la gestación en el que la médula ósea se convierte en el sitio principal donde se lleva a cabo la hematopoyesis, es decir, es el productor primordial de las células de la sangre, desde este momento y durante toda la etapa adulta del individuo (2).

Es gracias a este proceso que se forman los componentes celulares de la sangre: glóbulos rojos, glóbulos blancos, diferenciados en granulocitos y agranulocitos, y plaquetas, provenientes todos de un precursor común, la célula progenitora hematopoyética (fig. 1 y 2), la cual tiene la capacidad de proliferar, dando lugar a una cantidad suficiente de células para el organismo, autorreplicarse, para generar varias células precursoras más que mantendrán el equilibrio celular, y sobre todo, diferenciarse, dando como resultado las estirpes celulares antes mencionadas (3).

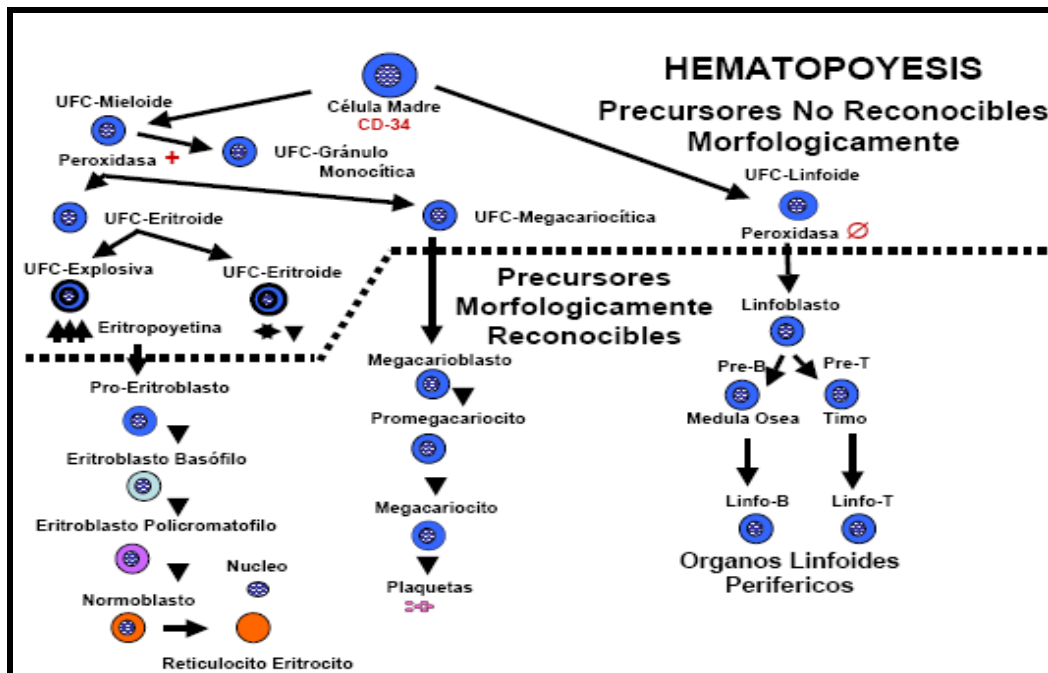


Fig 1. Hematopoyesis: Formación de eritrocitos, plaquetas y linfocitos.

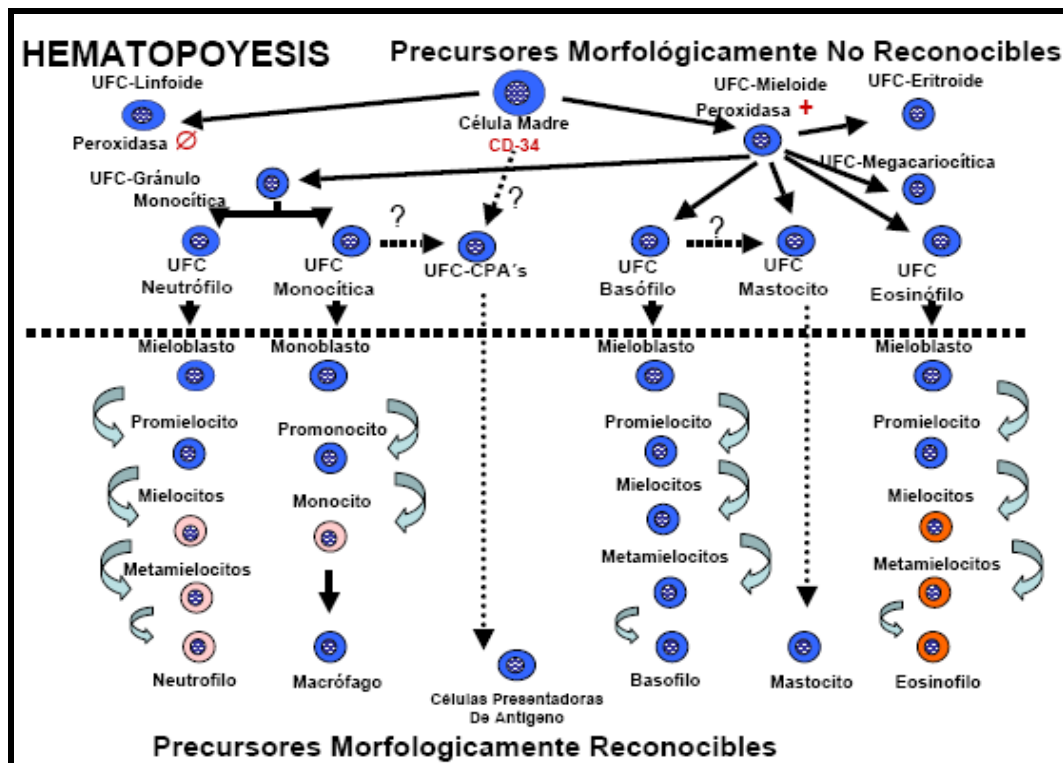


Fig 2. Hematopoyesis: formación de granulocitos.



2. LAS CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

La médula ósea se encuentra poblada por una gran cantidad de células que a un tiempo necesario y definido por el organismo (por el proceso de la hematopoyesis) se dividirán, proliferarán y madurarán para ser liberadas al torrente sanguíneo. Estos precursores celulares son conocidos como células madre hematopoyéticas o CPH, que como su nombre lo indica, son las células más inmaduras del organismo, encargadas de reabastecer y equilibrar el número de eritrocitos, glóbulos blancos y plaquetas que se encuentran en la circulación (3).

2.1 La sangre de cordón umbilical: una fuente alternativa de CPH

La hematopoyesis en la etapa embrionaria y hasta el nacimiento del bebé se encuentra en un estado aumentado, pues el organismo que está en crecimiento está en constante cambio y se encuentra definiendo el sitio en el que se llevará a cabo este proceso a lo largo de su vida. Mientras esto sucede, la hematopoyesis fetal se lleva a cabo en distintos órganos, por lo que la cantidad de CPH producidas es alta.

La placenta es un tejido que habitualmente es desechado y que contiene la sangre del cordón umbilical (SCU) en donde circulan concentraciones suficientes de CPH, que pueden ser utilizadas de manera eficaz para reconstituir la médula ósea (4,5).

Las CPH del cordón se caracterizan por una alta capacidad de diferenciación y proliferación, tanto o incluso mejor que aquellas provenientes de la médula ósea y además presentan la ventaja de encontrarse en una etapa de inmadurez mayor que las anteriores (6).

Si bien la cantidad de células que se encuentran en el cordón es más baja que las encontradas en médula ósea, se ha observado que, gracias a su gran capacidad



clonogénica para desarrollar progenitores de todos los linajes: BFU-E, CFU-GM, y CFU-Mk, se puede asegurar un injerto exitoso, con dosis más bajas que las que se requieren infundir en los trasplantes de medula ósea (7).

Desde hace varios años se han realizado estudios en los cuales se han utilizado CPH de SCU en pacientes con enfermedades de tipo hematológico como leucemias y anemias, encontrándose resultados favorables en cuanto a la recuperación del individuo.

La velocidad y probabilidad de injerto, y la supervivencia a la enfermedad, están relacionadas con el número de células madre que se transfunden por kilogramo de peso del paciente. Dichas células se estudian en cada unidad colectada de SCU (8, 9).



3. LOS TRASPLANTES DE CÉLULAS MADRE DE CORDÓN UMBILICAL

Luego de que en 1974 se demostrara la presencia de CPH en la SCU, se llevó a cabo, en 1988, el primer trasplante de cordón umbilical a un niño con anemia de Fanconi severa, cuyo donador fue su hermano HLA-idéntico. El resultado de éste fue exitoso pues hasta la fecha se sabe que el paciente se encuentra en buen estado de salud.

Gracias a esto, se comenzaron estudios para lograr trasplantes en pacientes no emparentados, los cuales hasta hoy siguen demostrando su efectividad (10).

3.1 ¿Por qué utilizar CPH de SCU?

Existen ciertas ventajas en cuanto al uso de SCU como fuente alternativa de CPH, entre las cuales se encuentran que: 1) la recolección se lleva a cabo de manera muy sencilla sin riesgo para el donador, 2) el riesgo de enfermedades por transfusión, así como el de la enfermedad injerto contra huésped es menor debido a la alta inmadurez y capacidad de proliferación de las células (fig. 3), pero sobre todo, 3) las unidades que son estudiadas y criopreservadas están disponibles de forma inmediata en el inventario del banco de cordón umbilical (11,12).

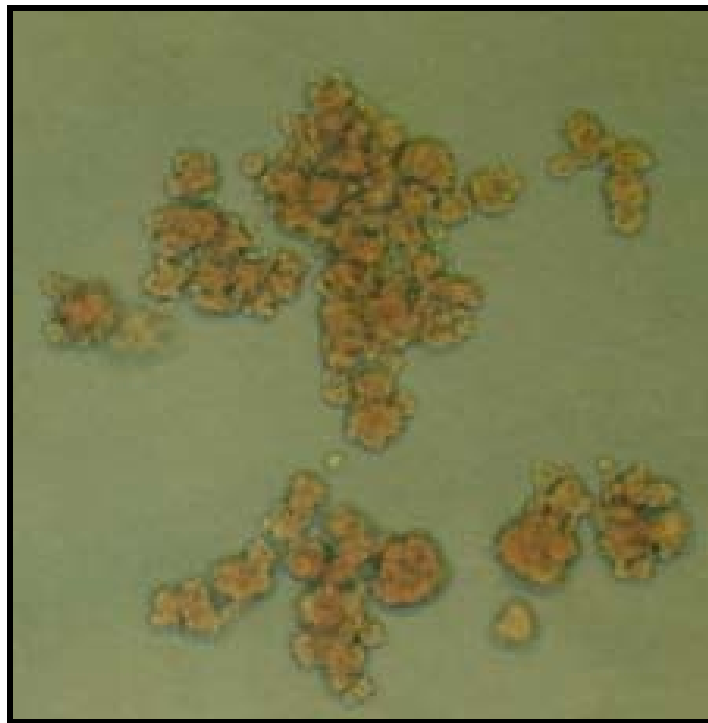


Fig 3. Crecimiento de células de SCU.

3.1.1 Donación de SCU

Fue debido a la necesidad de tener unidades de CPH disponibles de manera inmediata que se han desarrollado en el mundo programas de donación para el almacenamiento de SCU; es por ello que se han generado bancos de cordón con unidades disponibles para pacientes que así lo precisen, con las ventajas de que: 1) el proceso de obtención es muy sencillo, 2) permite establecer un control de calidad de todas las unidades que serán resguardadas y 3) el costo del proceso es mucho menor que en el de obtención de células de médula ósea o sangre periférica.

Tanto los requisitos para la donación, el proceso de toma de muestra y el proceso de reducción de volumen y criopreservación se llevan a cabo bajo los estándares internacionales de NETCORD-FACT.



3.1.2 Breve historia de los bancos de sangre de cordón umbilical

El BSCU de Nueva York fue el pionero, iniciando su actividad en 1993, y también fue el primero en suministrar una unidad de SCU no emparentada, durante el mismo año, para la realización del primer trasplante de este tipo en la "Duke University" de Durham. A esta iniciativa se sumaron los BSCU de Milan, Duesseldorf y Barcelona, entre 1994 y 1995, a los que progresivamente se sumaron otros hasta un total de más de 50 en el año 2000.

En la actualidad existen más de 70.000 unidades de SCU disponibles, de las cuales aproximadamente la mitad están en BSCU Europeos y se han realizado más de 1500 trasplantes.

En el año 2003, a través de la Secretaría de Salud, se puso a disposición de la población mexicana, el Banco de Sangre de Cordón Umbilical bajo resguardo del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, el cual cuenta hasta la fecha con un inventario de 761 unidades disponibles y 32 trasplantes-no emparentados realizados.

La ventaja de contar con un banco de cordón umbilical gubernamental es que la posibilidad de encontrar un donante HLA-compatible se amplía de 25 a 80%, puesto que al incrementarse el inventario se tiene un mayor número de unidades disponibles para la población, además de recordar que las ventajas de la SCU es que se pueden realizar trasplantes con diferencias en dos o tres antígenos del sistema principal de histocompatibilidad (13).



3.1.3 Netcord como organización regulatoria de los BSCU

En 1998, algunos BSCU europeos como Milán, Barcelona y Dusseldorf, crearon una organización internacional conocida como NETCORD, la cual tiene como objetivos: 1) garantizar la calidad de las unidades que quedan en reserva y a disposición para ser trasplantadas, 2) facilitar la comunicación entre los bancos del mundo para toma de decisiones y 3) continuar con la investigación acerca de este producto. A esta organización se unieron bancos de Londres, París, Bélgica, Tokio, Denver, San Luis, Nueva York y Leiden, entre otros (14).

Los BSCU con certificación internacional almacenan células de cordón con altos controles de calidad, por lo que sólo del 40 al 50% de los productos recolectados cumplen con los controles de calidad establecidos por NETCORD, y son criopreservados (fig. 4).

En el año 2006, el BSCU mexicano se unió a los bancos mundiales a través de NETCORD como miembro asociado de esta organización, con lo cual las unidades quedan disponibles al resto del mundo, asegurando siempre la máxima calidad en cada una de ellas.



Fig 4. Netcord es el órgano internacional que regula los bancos de cordón en el mundo.



3.2 Caracterización inicial del producto

Todo producto que llegue a un banco de sangre debe ser caracterizado para su posterior utilización. En el BSCU se hacen estudios a las unidades que se van a criopreservar, tanto para asegurar la calidad del producto, como para tener en la base de datos la información de cada una de las unidades, lista para el momento de una búsqueda (15).

3.2.1 Fenotipificación celular

Dos parámetros muy importantes que deben de conocerse de las unidades criopreservadas son la tipificación de grupo sanguíneo y Rh, y la identificación de los antígenos de histocompatibilidad, los cuales se encuentran clasificados como los principales factores de rechazo y reacciones severas en trasplantes y transfusiones.

En relación a los trasplantes de CPH, se ha observado que en células provenientes de médula ósea, la compatibilidad entre el receptor y el donador debe ser de 100% si se quiere prevenir el rechazo o la enfermedad injerto contra huésped (EICH) severa. No así en las células de cordón umbilical, en las que se ha demostrado que no necesariamente tienen que ser 100% compatibles, ya que se han logrado trasplantes exitosos en los que únicamente 4 de los 6 antígenos HLA más importantes son iguales, lo cual daría un estimado de que se acepta realizar trasplantes con el 70% de compatibilidad entre ambos (16,17).



3.2.2 Detección de serología positiva y cultivos microbiológicos positivos

La calidad de las unidades que llegan a los bancos se estudia llevando a cabo análisis de marcadores serológicos de enfermedades infecciosas (VIH, HBsAg, HCV, Chagas, CMV, Toxoplasmosis, etc). Recientemente se ha utilizado la prueba de ácidos nucleicos (NAT), la cual se lleva a cabo por biología molecular y que presenta mayor sensibilidad para detección de VIH HBsAg y HCV, principalmente.

Ahora bien, los cultivos microbiológicos se realizan para detectar contaminación bacteriana o fúngica que puede bien ser por infección en el paciente, o por una inadecuada toma de la muestra. Cualquiera que sea el caso, siempre que se detecte una muestra positiva, la unidad será dada de baja.

3.2.3 Cuenta de células nucleadas totales y CD34+ viables

Se ha establecido que las CPH se caracterizan por el marcador de superficie CD34+ y que son capaces de restablecer la hematopoyesis por su capacidad de repoblar la médula ósea. Debido a esto, es importante conocer la cantidad de células disponibles en la unidad para que, con respecto a la dosis mínima que se conoce como necesaria de CNT ó CD34+/kg, podamos saber si esa unidad es suficiente para un adulto o un niño, dependiendo de su peso (18,19).



4. EL CONTROL DE CALIDAD PRE-TRASPLANTE

La calidad puede definirse como la satisfacción de los requerimientos de un usuario por un producto dado. En transfusión, esto significa la prescripción oportuna de la sangre o de sus componentes compatibles, con una justificación clínica clara, sin riesgo de transmisión de enfermedades, ni de efectos nocivos (20).

Es por esto que el control de calidad pre-trasplante ha nacido de la necesidad de asegurar que las unidades de SCU que han sido congeladas cumplan con todas las normas establecidas, tanto de carácter nacional como lo es la Norma Oficial Mexicana NOM-003-SSA2-1993 "Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos", y que establece la seguridad transfusional, como las normas internacionales, establecidas por NETCORD-FACT, soportadas por estudios en los que se habla de la importancia en la calidad hematopoyética de las células que serán trasplantadas.

Cabe pues recordar que la mayoría de los pacientes son tratados con fármacos inmunosupresores y dosis de radiación que eliminan totalmente la función de la médula ósea. Por ello se debe asegurar que la unidad que ha sido encontrada compatible para cualquier paciente, realmente sea útil y que no vaya a generarle un daño mucho más grave posterior a la infusión.

Es muy importante que el manejo de las unidades, una vez que hayan sido congeladas, se lleve a cabo en las condiciones adecuadas y de manera controlada pues se debe evitar que las células sufran daños ocasionados por los cambios bruscos de temperatura, ya que dichos cambios podrían generar pérdidas en el número de células CD34+ totales, las cuales son las más importantes para el aseguramiento del injerto.



4.1 La importancia de la trazabilidad en los estudios de SCU

Debemos recordar que para que todo el proceso de control de calidad pre-trasplante pueda llevarse a cabo de manera eficiente, cada una de las unidades que llegan al BSCU deben estar debidamente documentadas de todos los procesos que se realizaron, con el fin de poder seguir su ruta y así poder encontrar la información necesaria, datos y resultados que se obtuvieron desde el principio, evitando errores en la información dada a una unidad, que podrían poner en riesgo la vida del paciente.

4.2 Seguridad transfusional

El término seguridad transfusional debe distinguirse del término sangre segura. El contar con sangre segura es, en gran medida, responsabilidad de las personas que colectan la sangre. Entonces, el término transfusión segura incluye todos los pasos que relacionan tanto a los estudios realizados a la sangre que llega al banco, al mismo proceso de la transfusión y a los resultados de mejoría o rechazo reportados del paciente.

Es, por lo tanto, un proceso complejo que depende de la integración y la coordinación de todos los trabajadores de la salud: químicos, médicos, enfermeras, trasplantólogos, e inclusive, las personas que transportan la sangre. A los datos colectados que reportan eventos adversos en todo este proceso se le conoce con el nombre de hemovigilancia (21,22).

Por parte del BSCU, se busca contar con unidades que garanticen la seguridad transfusional, para lo cual se debe asegurar la correcta caracterización de todas las unidades y la verificación de los datos obtenidos al inicio, realizando nuevamente los estudios pertinentes antes de que las unidades abandonen el banco.



4.2.1 Tipificación ABO/Rh

Es importante la tipificación de grupo ABO y Rh, puesto que al igual que los antígenos de histocompatibilidad son un parámetro que genera reacciones transfusionales que ponen en riesgo la vida de los pacientes. En el caso de la SCU, cada unidad congelada cuenta con el estudio de fenotipo sanguíneo.

Sin embargo, no es un requisito estricto que el grupo sanguíneo y el Rh del receptor y del donador sean iguales. Esto por 2 razones: Primero, la sangre total que llega al BSCU, se somete a un doble centrifugado y sedimentación de GR por medio de un procesador celular automatizado, por lo que la mayor parte de los GR se han retirado de la muestra, lo que disminuye el riesgo del rechazo; en segundo lugar, las CPH que se infunden en el paciente, evidentemente contienen la información para desarrollar estirpe eritroide, por lo que, una de las pruebas que se realiza para confirmar el injerto es el quimerismo en el paciente, es decir, que sus células ahora expresen un genotipo distinto al que originalmente tenían, en este caso sería que su grupo sanguíneo haya cambiado, recordando que el término de quimerismo abarca también el cambio de genotipo HLA al del donador (23,24,25).

4.2.2 Determinación de antígenos de histocompatibilidad HLA

Se ha mencionado que en el caso de la SCU, la compatibilidad necesaria para que un injerto sea exitoso y no exista un severo rechazo, es mínimo del 70%, es decir, que 4 de los 6 antígenos más importantes sean estrictamente compatibles (26).

El rango de permisibilidad en cuanto a la compatibilidad en las CPH de cordón puede explicarse en el contexto en que la sangre proveniente de cordón posee las células más inmaduras que se encuentran en todo el organismo, y que además



proviene de un organismo cuyo sistema inmune es tan “nuevo” que sus células no se han encontrado expuestas a diversos antígenos y por lo tanto aún no son inmunocompetentes (27,28,29).

En el caso de control de calidad pre-trasplante, se repite el estudio de HLA en las unidades que se encuentran congeladas y que ya han sido caracterizadas previamente. Esto con el fin de corroborar que los resultados arrojados en los primeros estudios, coinciden con la repetición de la determinación de los antígenos de histocompatibilidad en un segmento de la unidad, con lo cual se descarta cualquier equivocación que pudiera haberse pasado por alto en la primera determinación y que al no coincidir los antígenos reportados con los de la muestra, se llegaran a infundir células con un HLA distinto (fig. 5) y que provocara una reacción muy fuerte e incluso fatal en el paciente (30).

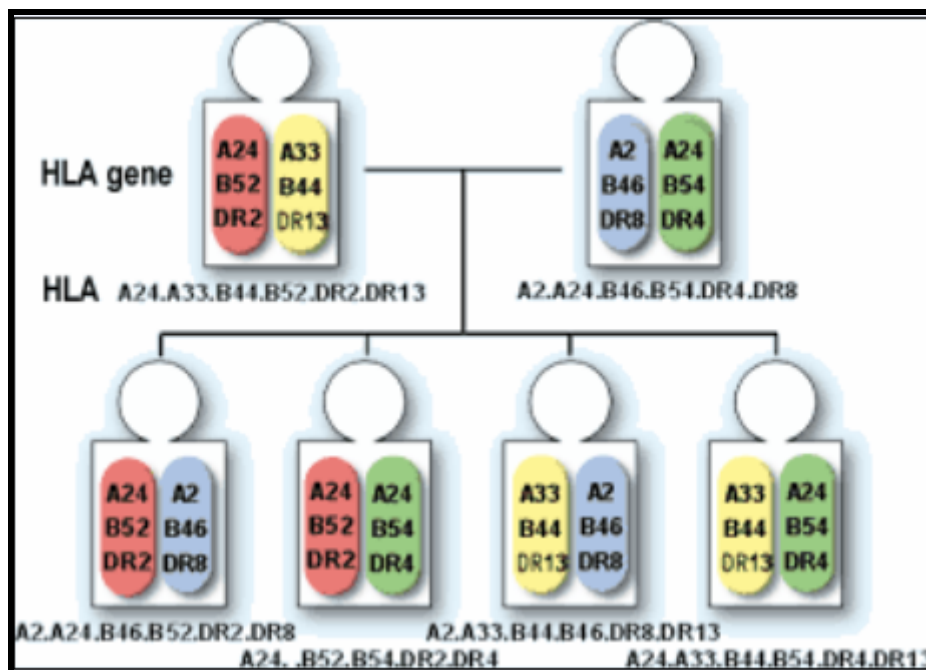


Fig 5. Determinación de los principales antígenos HLA. En el ejemplo se muestra la herencia de los antígenos HLA de los padres a los hijos. Esto avala el por qué entre la familia no llega a hallarse un donador compatible de médula ósea.



4.2.3 Las pruebas serológicas: detección de VIH, HBsAg, HVC, PRR, Chagas, Toxoplasmosis.

Existen varias enfermedades transmisibles por vía sanguínea y que además de ello son capaces de atravesar la barrera placentaria. Es por eso que es muy importante la detección de enfermedades infecciosas que pudieran llegar a transmitirse al infundir la muestra.

Se debe recordar que muchas veces los errores humanos se ven reflejados de manera dramática en la salud del paciente, por lo que es indispensable que esta prueba sea repetida y confirmada, asegurando que la unidad que será trasplantada no fue ni es reactiva a ninguna de las enfermedades antes mencionadas, es decir que se encuentra libre de virus y parásitos que pongan en riesgo la salud del paciente (31).

4.2.3.1 La prueba de NAT

La prueba de ácidos nucleicos, NAT (por sus siglas en inglés Nucleic Acid Testing) tiene la ventaja de que puede identificar secuencias de ácidos nucleicos genómicos virales que componen partículas específicas del virus, a diferencia de la serología clásica que, por método indirecto, identifica la presencia de anticuerpos en la muestra. Esto es una gran ventaja ya que se disminuye el periodo de ventana, lo que da como resultado una detección más temprana del virus.

Esta prueba es extremadamente útil puesto que es parecido al PCR por su alta sensibilidad, y aunque se trata de una prueba costosa y por lo cual generalmente es utilizada más bien en estudios de investigación, es importante contar con todas las herramientas que sean necesarias para asegurar la calidad del producto que se le proporcionará, en este caso, al paciente (32).



4.3 Calidad hematopoyética

En un concentrado de CPH, no sólo es importante tener un buen número de células que asegure el prendimiento del injerto, sino que éstas sean capaces de autorrenovarse, diferenciarse y proliferar, poblando nuevamente la médula ósea dañada. Con los estudios de calidad hematopoyética se puede asegurar que las células que serán infundidas en el paciente tienen una alta eficiencia clonal y que derivarán en todas las estirpes celulares que se generan en una hematopoyesis normal.

Para evaluar el potencial de injerto de las CPH comúnmente se estudia el número de células nucleadas totales que se infunden, por kilogramo de peso del paciente. Sin embargo, de las CNT que se encuentran en la muestra, debe restarse el número de células rojas nucleadas que se encuentran en la SCU, con lo cual, un parámetro más confiable para garantizar que una buena dosis de CPH será infundida en el paciente es la cuenta de células CD34+ totales; esto debido a que las diversas experiencias en trasplante han demostrado que la capacidad de repoblación medular, se encuentra circunscrita a los progenitores CD34+, razón por la cual se le considera el principal marcador utilizado para la caracterización de las células madre. La frecuencia de este antígeno en la SCU se estima de entre el 0.2 al 1% del total de las células nucleadas (33).

El estudio de la calidad hematopoyética de las CPH se lleva a cabo en un medio de cultivo de base semisólida, en el cual se observan al microscopio invertido el número y tipo de colonias que crecen en el medio (fig 6). La correlación entre el número de unidades formadoras de colonias encontradas en el cultivo (UFCs), con respecto al número de CD34+ presentes en la muestra es a lo que se conoce como E-CLONE, y que es el valor más importante que nos ayudará a definir si una unidad es recomendable para ser trasplantada o no.

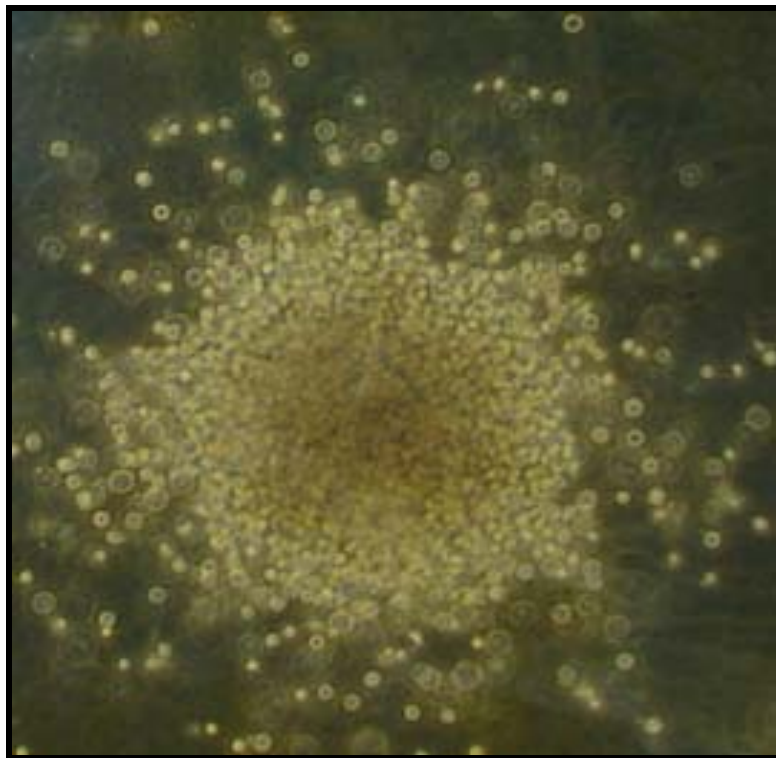


Fig 6. Crecimiento de una colonia CFU-GM de células provenientes de SCU.

4.3.1 Cuenta de GBT y caracterización de CD34+

El análisis de las células CD45+ de la SCU muestra que un 0.3 % de ellas coexpresan el antígeno CD34+, característico de las CPH, y por ello la expresión de CD34+ se ha utilizado con éxito como marcador de elección, para la caracterización de las muestras tanto de médula ósea, sangre periférica y sangre de cordón umbilical (fig. 7).

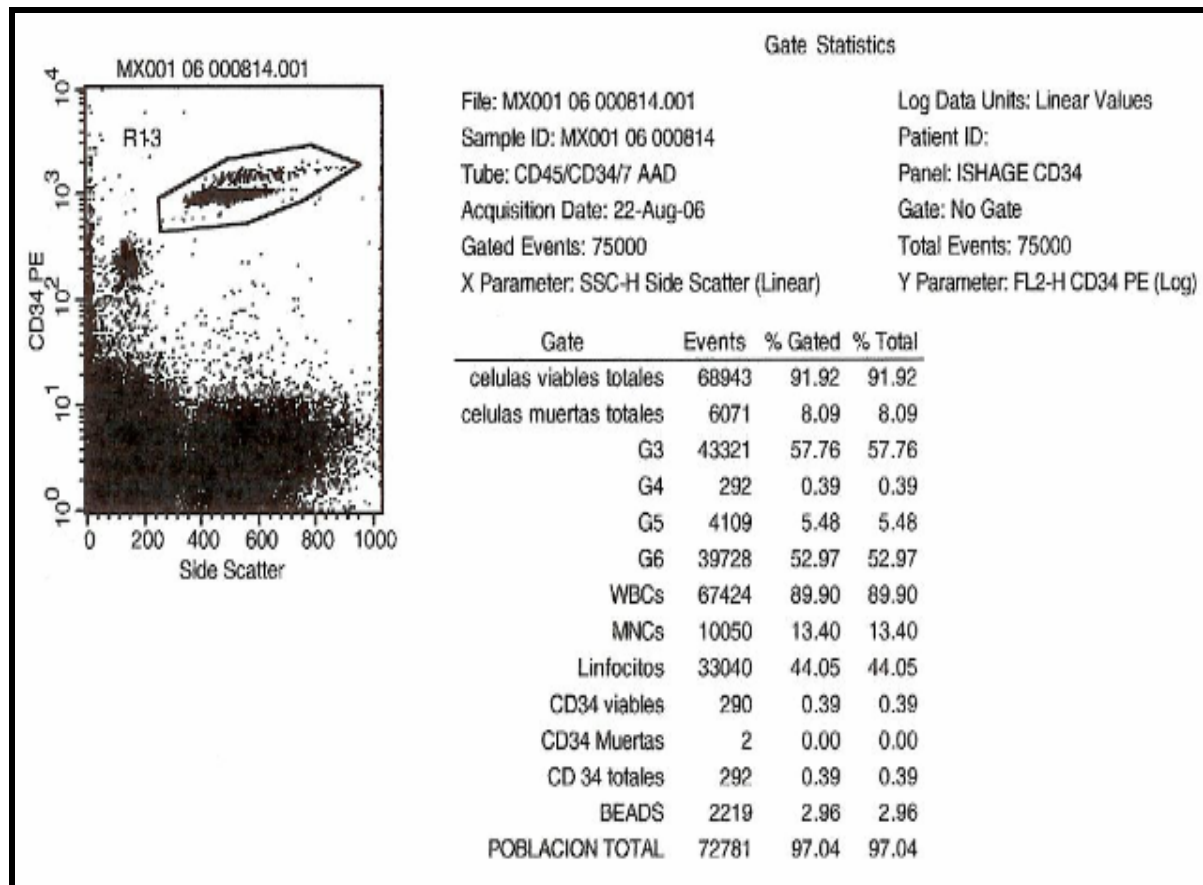


Fig 7. Caracterización de CD34+ viables en una muestra de SCU.

Se ha observado que el número de CNT que se encuentran en las unidades de SCU no es un parámetro tan característico como el número de células CD34+ que se encuentran en la muestra. De cualquier modo, la dosis de CNT que se requiere para un trasplante exitoso es alrededor de 3.7×10^7 CNT/Kg de peso del paciente. Este número es mucho más bajo en comparación con la cantidad de células que se requiere en el trasplante de médula ósea (34).

En los estudios de células de cordón umbilical se habla de que la dosis mínima requerida para un trasplante es 100×10^3 células/kg de peso, refiriéndose a CD34+, puesto que, como se ha dicho, es más representativo hablar de dosis de CD34+, que es el marcador de las CPH, que de dosis de CNT (35).



Debido a lo anterior para fines del control de calidad pre-trasplante, se realiza la cuenta de células CD34+ viables que quedan luego del congelamiento, ya que a pesar de seguir estrictamente el procedimiento de criopreservación, siempre habrá algunas que mueran por encontrarse susceptibles a las bajas temperaturas. La cuenta se repite para determinar si son suficientes para realizar un trasplante y, considerando que ahora el número disminuirá, se reflexiona si pudiera llegar a ser exitoso o no.

4.3.2 Los cultivos clonogénicos como herramienta para la predicción del injerto

Los cultivos tienen la finalidad de ayudar a predecir el posible éxito del trasplante, esto gracias a que las células se encuentran en un medio ideal de crecimiento, el cual representaría en gran parte las condiciones que se encuentran en el organismo. Además, sirven para determinar la capacidad de expansión clonogénica de las células concentradas en una unidad, con lo cual se podría asegurar el injerto de las mismas (fig 8) (36,37,38).

La eficiencia clonogénica o E-CLONE se define como la relación que existe entre el número de UFC totales y el número de CD34+ totales. Es un parámetro constante después de una manipulación mínima o criopreservación para cada tipo de progenitor.

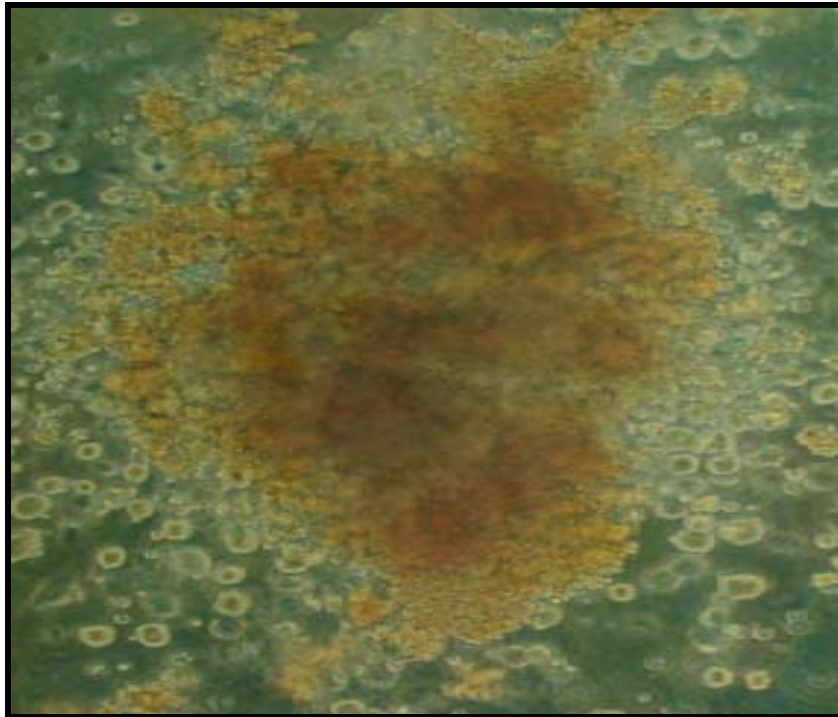


Fig 8. Colonia CFU-Mix de células provenientes de SCU. Un buen crecimiento celular permite predecir el éxito de un injerto.

Se ha observado que existe una relación importante entre la eficiencia clonal obtenida por cultivo y el número de CD34+ viables que se encuentran en la unidad en estudio. Sin embargo, en algunas ocasiones esta relación no es tan significativa, pues se llega a observar que aunque el número de células CD34+ cuantificadas en una muestra no parezca suficiente, la eficiencia clonal es muy alta, o viceversa. Esto quiere decir que no siempre la capacidad hematopoyética de la SCU puede ser medida con parámetros como el contenido de CPH (39,40).

Diversos estudios han revelado que la capacidad proliferativa de las células está vinculada con la expresión de ciertos marcadores de superficie. Se ha observado que la molécula CD38+ es una glicoproteína que desempeña un papel muy importante en los procesos de activación, proliferación e interacción de las células blancas. Asimismo, el antígeno HLA-DR, que es también una molécula de



histocompatibilidad de clase II encontrada en la mayoría de las células del cuerpo, se encuentra asociado a la capacidad proliferativa de las CPH (41).

En particular, en las células que han sido caracterizadas como CD34+CD38-DR- se ha encontrado que son las CPH más primitivas, y que en el caso de médula ósea no tienen gran capacidad proliferativa. No así en el cordón umbilical, en el que se ha demostrado en cultivos, *in vivo* y por expansión celular en cultivos a largo plazo que tienen alta capacidad clonogénica.

Además, se han caracterizado otros antígenos responsables de la proliferación celular de progenitores hematopoyéticos, tales como Lin-, AC133, CD7+, encontrándose diferencias en cuanto al crecimiento celular, aunque como ya se ha mencionado, los más importantes son los CD34+CD38-DR- (42,43,44).



III. OBJETIVO

- Establecer la importancia del control de calidad pre-trasplante en unidades disponibles en el Banco de Sangre de Cordón Umbilical del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea.



IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos descritos (anexo) fueron llevados a cabo en el Banco de Sangre de Cordón Umbilical del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, utilizando para el estudio 25 unidades de SCU criopreservadas las cuales fueron reservadas por el centro de trasplantes correspondiente.

Los procedimientos que se llevaron a cabo para realizar el control de calidad pre-trasplante fueron: a) seguridad transfusional: determinación de HLA por técnicas de DNA, tipificación del grupo sanguíneo ABO y Rh, pruebas serológicas para detección de VIH, HBsAg, HVC, PRR y b) aseguramiento de la calidad hematopoyética: cuenta celular de CD34+ viables y expansión celular por cultivos clonogénicos.

Las pruebas se llevaron a cabo en pequeños volúmenes de la sangre contenidos en segmentos antena que se sellan de la misma guía de la bolsita del concentrado de células, para ser separados y poder realizar los estudios (fig. 9).

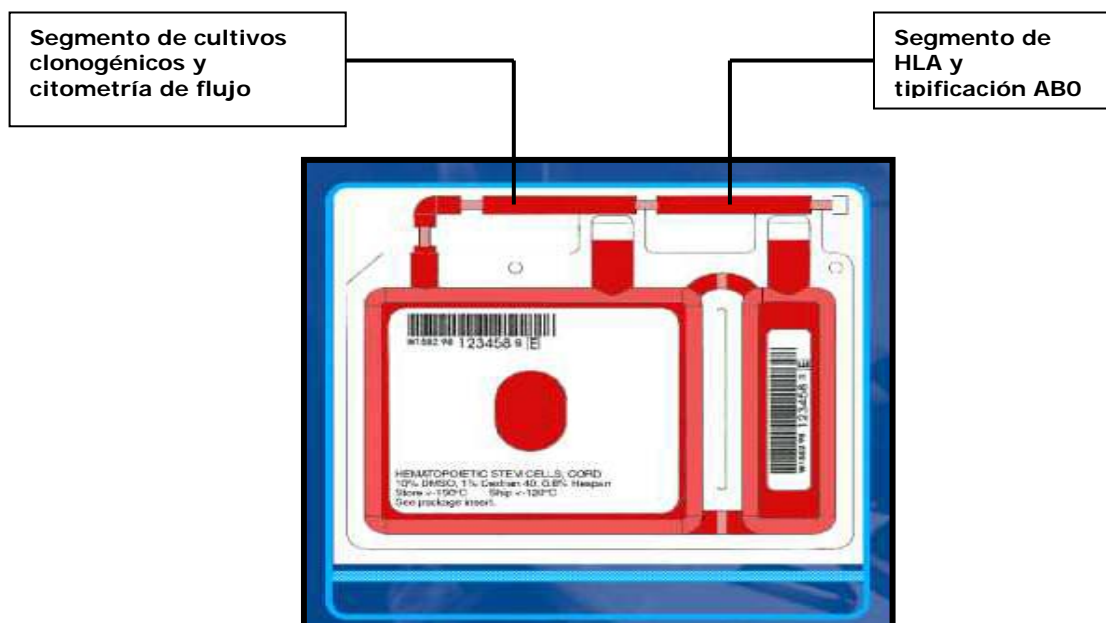


Fig 9. Muestra de la bolsa de concentrado celular con los 3 fragmentos antena.



Los estudios de serología y/o NAT se realizaron en volúmenes obtenidos de plasma o suero de las muestras congeladas, tanto del cordón umbilical como del suero materno, que se han mantenido en la seroteca del BSCU.

a) Extracción de unidades de SCU congeladas del bioarchivo

Las unidades que han sido congeladas en el bioarchivo se extraen de manera controlada y procurando siempre que se encuentren dentro de nitrógeno líquido (N_2L), usando para esto un puerto CFR de extracción y una caja de unicel que contenga un buen volumen de N_2L (fig. 10). Una vez que se ha sumergido la unidad en el contenedor, se extrae la unidad del canister y se cortan los fragmentos que se utilizarán en los estudios de control de calidad pre-trasplante, recordando que todo esto debe realizarse dentro del N_2L hasta el momento en que vayan a ser utilizadas.



Fig 10. Unidad de SCU extraída del bioarchivo, sumergida en N_2L .



b) Determinación de HLA en sangre: clase I (locus A, B, C), y clase II (locus DR y DQ) por técnicas de ADN

Se determinó el HLA en sangre por medio de métodos moleculares de mediana y alta resolución luego de un proceso de amplificación del ADN en estudio. El ADN se obtuvo de las células blancas de la SCU, luego de una lisis preferencial de los eritrocitos, y posteriormente la lisis de las células blancas, en presencia de un detergente aniónico fuerte, para la liberación del ADN. Las proteínas se precipitaron de la muestra para purificar el ADN, que se recuperó posteriormente con etanol absoluto y mediante técnica de PCR (primers dynal-biotech) se amplificó con ayuda de un termociclador (Techne-412).

El tiempo total de amplificación de ADN en el termociclador fue de 1 h 25 min, después del cual se realizó la electroforesis en gel para el desplazamiento de las bandas y de los marcadores de peso molecular. Se observó el gel en el transiluminador UV y se tomó una foto del gel con el programa KODAK (fig. 11). Se analizan los resultados en el programa Unimatch Plus (fig. 12), que proporciona los alelos correspondientes a la muestra, confirmándolos con la hoja de trabajo ABDRDQ SSP UniTray (fig. 13).

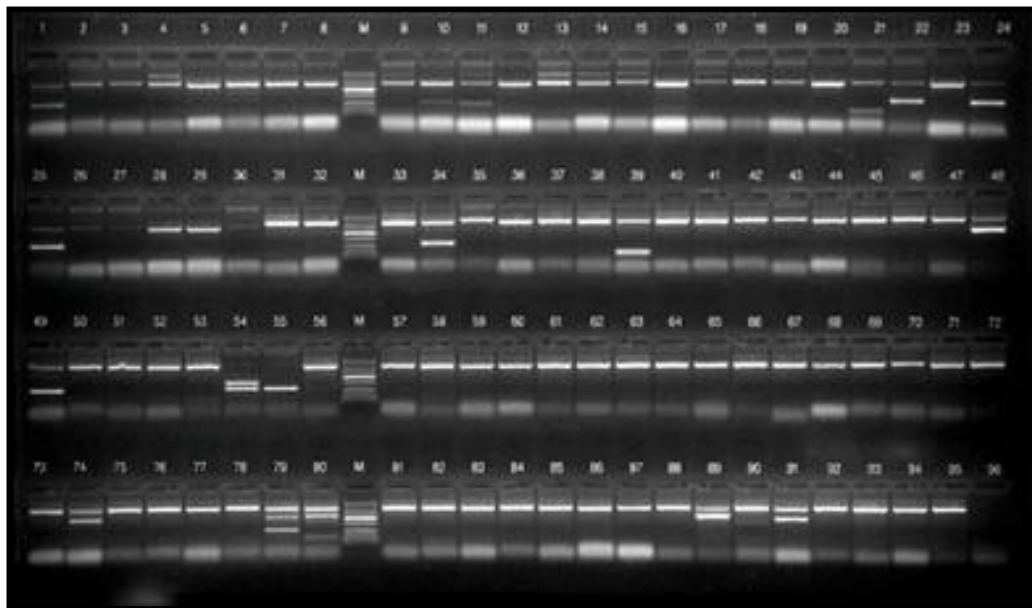


Fig 11. Foto de gel de electroforesis con equipo KODAK.



Fig 12. Programa Unimatch Plus para determinación de antígenos HLA.



Serology Equivalent	Allele Specificity	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31			
DE2	DEB1*0201	1	2	3																															
DE2	DEB1*0202		2	3	4																														
DE2	DEB1*0203				4	5																													
DE7(3)	DEB1*03011/012	1				5	6																												
DE8(3)	DEB1*0302	1		3				7																											
DE9(3)	DEB1*03032/033	1				5		7	8																										
DE7(3)	DEB1*0304	1		3			6																												
DE8(3)	DEB1*0305	1								9																									
DE3	DEB1*0306	1				5			8		10																								
-	DEB1*0307	1		3				7				11																							
-	DEB1*0308	1		3				7					12	13																					
-	DEB1*0309					5	6						11																						
-	DEB1*0310	1				5	6		8						14																				
DE4	DEB1*0401	1							8							15	16																		
DE4	DEB1*0402	1							8		10						16																		
DE5(1)	DEB1*05011																	17	18																
DE5(1)	DEB1*05012																		17			20													
DE5(1)	DEB1*0502																					19	20												
DE5(1)	DEB1*05031								8														20												
DE5(1)	DEB1*05032																						20	21											
DE5(1)	DEB1*0504																					18	19												
DE6(1)	DEB1*06011-013	1							8														22												
DE6(1)	DEB1*0602								7				12				16							23	24										
DE6(1)	DEB1*0603												12										21	23	25										
DE6(1)	DEB1*06041																									25	26	27	28	29					
DE6(1)	DEB1*06042																										25	27	28	29					
DE6(1)	DEB1*06051/052																										26	27			30				
-	DEB1*0606																16		18						24	26	27	28							
-	DEB1*0607																						21	23	25	27									
-	DEB1*0608												12												25	27	28	29							
DE6(1)	DEB1*0609								7																	26	27	28							
-	DEB1*0610												12				16								24									31	
DE1	DEB1*06111/112								7				12										21	23											
DE1	DEB1*0612								7				12														26	27	28						
-	DEB1*0613								7				12				16								24										
DE6(1)	DEB1*0614												12												23	24	25								
-	DEB1*0615								7								16								23	24		27							
-	DEB1*0616								7				12				16								23										31
-	DEB1*0617												12														25	26	27	28	29				31
	Product Size (bp)	140	120	135	140	120	215	175	70	150	205	110/140	170	110	145	205	105	135	230	135	245	185	215	195	125	155	220	170	125	220	170/180/2				
	Lane Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31			

Fig 13. Hoja de trabajo UniTray para determinación de antígenos HLA

c) Tipificación directa del grupo sanguíneo AB0 y del antígeno D del sistema Rh

La tipificación del grupo sanguíneo AB0 y el Rh, se realizó enfrentando sueros anti-A, anti-B y anti-AB, para grupo y anti-D para tipificación del Rh, con los eritrocitos problema previamente lavados y en suspensión (tabla 1 y 2). Luego de la centrifugación, se resuspende suavemente el botón para poner en evidencia la aglutinación y poder emitir el resultado final. En caso de resultar grupo A positivo



se realiza el ensayo de manera idéntica pero con antisueros anti-A₁ y anti-H. En caso de resultar Rh negativo se confirma agregando a la muestra suero de Coombs, que evidenciará entonces la aglutinación, confirmando un resultado positivo débil, o bien, en caso de seguir siendo negativo, se hace un ensayo con eritrocitos sensibilizados y observando la aglutinación, se considera negativo y se manda a confirmar en un programa más sensible (wadiana).

Reactivos Hemoclasificadores					Interpretación
Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-A ₁	Anti-H	
+	neg	+	+	neg	Grupo A ₁
			neg	+	Grupo A ₂
neg	+	+			Grupo B
+	+	+			Grupo AB
neg	neg	neg			Grupo O

Tabla 1. Interpretación de los resultados obtenidos en la prueba de tipificación de los grupos AB0.

Reactivos				Interpretación Rh
Anti-D	Control Rh	Anti-globulina humana	Celulas sensibilizadas	
neg	neg	neg	+	Negativo
		+		Positivo débil
+	neg			Positivo

Tabla 2. Interpretación de los resultados obtenidos en la prueba de tipificación del antígeno Rh.



d) Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas se realizaron por el método de ELISA para la detección de anticuerpos en contra de enfermedades transmisibles tales como VIH, HBsAg, HCV, Chagas, Sífilis, Toxoplasmosis y CMV, así como estudios de biología molecular NAT para detección de VIH, HBsAg, HCV.

e) Determinación de células CD34+ por citometría de flujo

La detección de CPH viables se realizó por medio de citometría de flujo con ayuda del citómetro FACSCalibur, utilizando para ello anticuerpos monoclonales como marcadores específicos CD45+ (células blancas) y CD34+ (CPH) y colorante de viabilidad 7-ADD. El cálculo se realizó utilizando el valor de las esferas contenidas en los tubos Trucount, el cual es variable para cada lote y por el número de eventos, de la siguiente manera:

$$\frac{\text{No. de células por evento}}{\text{No. de perlas por evento}} \times \frac{\text{Número de perlas contenidas en el tubo}}{\mu\text{L de muestra adicionado}} = \text{No. de células} / \mu\text{L}$$

Finalmente se calculó el número de células total en la muestra, que en este caso sería en 21 mL que es el volumen final en la bolsa del concentrado.



f) Siembra de cultivos clonogénicos

Luego de la extracción de la unidad del bioarchivo y la colecta de los fragmentos en los criotubos, se procedió a realizar los cultivos clonogénicos de cada unidad extraída. Para ello se utilizó un medio de cultivo que tiene como base la metilcelulosa, donde se le agregó IMDM para enriquecerlo (fig 14). Se calculó el volumen de siembra, el cual se sustenta en el desarrollo de 50 colonias por cada placa de 3 mm:

$$50UFC \times \frac{100CD34+}{30UFC} \times \frac{1000mL}{Xcél} \times \frac{100cél}{YCD34+} = \text{vol de siembra en } \mu\text{L}$$

donde X = es el número de células nucleadas reportadas en la biometría hemática y Y = es el porcentaje de CD34+ totales reportadas en la citometría de flujo de la muestra.



Fig 14. Siembra de cultivos clonogénicos. La muestra ya ha sido adicionada en el medio soporte de metilcelulosa



Asimismo, se calculó el volumen de IMDM que se agregó a la metilcelulosa, de modo que se obtuvo un volumen final de 100 μL de IMDM + muestra. Para asegurar la viabilidad celular se realizó un conteo de células en la cámara de Newbauer con azul de tripan. Finalmente, se colocó el volumen total en una caja de siembra, de manera homogénea y en ambiente húmedo al 5% de CO_2 (fig. 15).

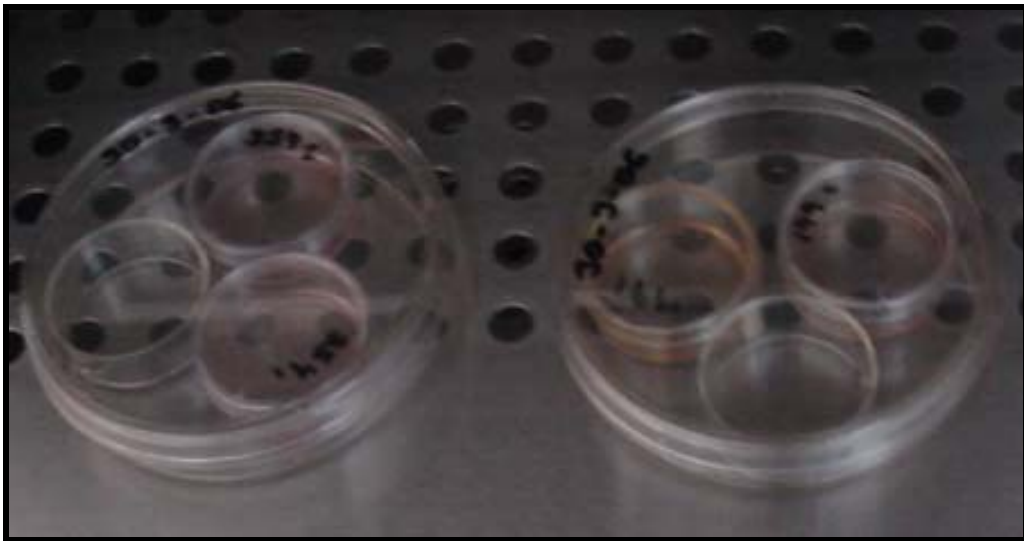


Fig 15. Cajas de cultivos clonogénicos en estufa de CO_2

Las cajas se leyeron de 10 a 15 días después, tiempo en el cual se esperó el máximo desarrollo de las células. Luego de esto se procedió a obtener el valor de E-CLONE, de la siguiente manera:

$$\frac{UFCl / \mu\text{L}}{CD34+t / \mu\text{L}} = \text{E-CLONE}$$

donde $UFCl$ son las unidades formadoras de colonias totales que se encuentran en un microlitro de muestra y $CD34+t$ es el número de CPH totales por microlitro de muestra.



V. RESULTADOS

Los resultados obtenidos tanto al inicio de la caracterización de las unidades, como en el estudio del control de calidad pre-trasplante de las cinco unidades, fueron agrupados para poder ser observados y comparados en las siguientes tablas:

ESTUDIOS INICIALES A UNIDAD					ESTUDIOS VALIDACIÓN DE FRAGMENTO					
Número de unidad	Citometría células/21mL	Grupo sanguíneo	HLA	Serología	Citometría células/21mL	Grupo sanguíneo	HLA	Serología	Cultivos clonogénicos E-CLONE	Viabilidad celular con azul de tripan
008	3.5 x 10 ⁶	A+	A*02, A*31, B*40, B*51, DRβ1*04, DR β1*13, DQβ1*03, DQβ1*06	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, VDRL	1.87 x 10 ⁶	A+	A*02, A*31, B*40, B*51, DRβ1*04, DR β1*13, DQβ1*03, DQβ1*06	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas Toxo(IgM-), CMV (IgM-)	8.4 %	88 %
017	2.80 x 10 ⁶	O+	A*31, A*02, B*35, B*39, DRβ1*01, DRβ1*14, DQβ1*05, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, VDRL, NAT (HBsAg, HCV, VIH)	0.84 x 10 ⁶	O+	A*31, A*02, B*35, B*39, DRβ1*01, DRβ1*14, DQβ1*05, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas	17.7 %	96 %
040	1.8 x 10 ⁶	O+	A*24, A*02, B*4008, B*51, DRβ1*13, DRβ1*04, DQβ1*03, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, VDRL, NAT (HBsAg, HCV, VIH)	0.136 x 10 ⁶	NO SE REALIZÓ	A*24, A*02, B*4008, B*51, DRβ1*13, DRβ1*04, DQβ1*03, DQβ1*03	NO SE REALIZÓ	5.1 %	96 %
051	0.79 x 10 ⁶	O+	A*24, A*24, B*39, B*48, DRβ1*04, DRβ1*04, DQβ1*03, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, VDRL	0.299 x 10 ⁶	O+	A*24, A*24, B*39, B*48, DRβ1*04, DRβ1*04, DQβ1*03, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas Toxo(IgM-), CMV (IgM-)	7.4 %	100 %
070	1.558 x 10 ⁶	O+	A*02, A*02, B*35, B*35, DRβ1*08, DRβ1*11, DQβ1*04, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, VDRL, NAT (HBsAg, HCV, VIH)	0.3 x 10 ⁶	O+	A*02, A*02, B*35, B*35, DRβ1*08, DRβ1*08, DQβ1*04, DQβ1*04	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas	14.0 %	94 %

Tabla 1. Resultados obtenidos en el estudio de unidades de CPH estudiadas. Los cuadros sombreados reflejan resultados no satisfactorios para el control de calidad.



ESTUDIOS INICIALES A UNIDAD					ESTUDIOS VALIDACIÓN DE FRAGMENTO					
Número de unidad	Citometría células/21mL	Grupo sanguíneo	HLA	Serología	Citometría células/21mL	Grupo sanguíneo	HLA	Serología	Cultivos clonogénicos E-CLONE	Viabilidad celular con azul de tripan
140	6.6 x 10 ⁶	O+	A*02, A*31 B*35, B*39 DRβ1*04, DRβ1*14, DQβ1*03, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, VDRL, NAT (HBsAg, HCV, VIH)	2.09 x 10 ⁶	O+	A*02, A*31 B*35, B*39 DRβ1*04, DRβ1*14 DQβ1*03, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas	17.6 %	60 %
151	3.3 x 10 ⁶	O+	A*02, A*11, B*51, B*27, DRβ1*14, DRβ1*01, DQβ1*03, DQβ1*05	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, VDRL, NAT (HBsAg, HCV, VIH)	2.1 x 10 ⁶	O+	A*02, A*11, B*51, B*27, DRβ1*14, DRβ1*01, DQβ1*03, DQβ1*05	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas	13.55 %	97 %
155	2.7 x 10 ⁶	A ₁ +	A*02, A*02, B*40, B*51, DRβ1*14, DRβ1*16, DQβ1*03, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, VDRL, NAT (HBsAg, HCV, VIH)	1.38 x 10 ⁶	A ₁ +	A*02, A*02, B*40, B*51, DRβ1*14, DRβ1*16, DQβ1*03, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas	20.57 %	91 %
199	2.2 x 10 ⁶	O+	A*02, A*02 B*35, B*51 DRβ1*04, DRβ1*08, DQβ1*03, DQβ1*04	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, NAT (HBsAg, HCV, VIH)	1.09 x 10 ⁶	O+	A*02, A*02 B*35, B*51 DRβ1*04, DRβ1*08, DQβ1*03, DQβ1*04	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas	17.5 %	93 %
203	3.9 x 10 ⁶	O+	A*24, A*31 B*39, B*35 DRβ1*08, DRβ1*08, DQβ1*04, DQβ1*04	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, NAT (HBsAg, HCV, VIH)	1.82 x 10 ⁶	NO SE REALIZÓ	NO SE REALIZÓ	NO SE REALIZÓ	22.2 %	60 %

Tabla 2. Resultados obtenidos en el estudio de unidades de CPH estudiadas.



ESTUDIOS INICIALES A UNIDAD					ESTUDIOS VALIDACIÓN DE FRAGMENTO					
Número de unidad	Citometría células/21mL	Grupo sanguíneo	HLA	Serología	Citometría células/21mL	Grupo sanguíneo	HLA	Serología	Cultivos clonogénicos E-CLONE	Viabilidad celular con azul de tripan
210	3.0 x 10 ⁶	O+	A*02, A*02 B*35, B*35 DRβ1*14, DRβ1*08 DQβ1*03, DQβ1*04	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, NAT (HBsAg, HCV, VIH)	1.31 x 10 ⁶	O+	A*02, A*02 B*35, B*35 DRβ1*14, DRβ1*08 DQβ1*03, DQβ1*04	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas Toxo(IgM-), CMV (IgM-)	11 %	74 %
354	2.04 x 10 ⁶	O+	A*02, A*24 B*35, B*35 DRβ1*08, DRβ1*11 DQβ1*04, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, VDRL, NAT (HBsAg, HCV, VIH)	0.135 x 10 ⁶	O+	A*02, A*24 B*35, B*35 DRβ1*08, DRβ1*11 DQβ1*04, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas	0.55 %	65 %
358	3.74 x 10 ⁶	O+	A*11, A*24, B*35, B*08, DRβ1*01, DRβ1*01, DQβ1*05, DQβ1*05	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, NAT (HBsAg, HCV, VIH)	2.54 x 10 ⁶	O+	A*11, A*24, B*35, B*08, DRβ1*01, DRβ1*01, DQβ1*05, DQβ1*05	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas	39.1 %	75 %
431	4.74 x 10 ⁶	O+	A*02, A*02 B*48, B*51 DRβ1*13, DRβ1*14, DQβ1*03, DQβ1*06	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR	2.16 x 10 ⁶	O+	A*02, A*02 B*48, B*51 DRβ1*13, DRβ1*14, DQβ1*03, DQβ1*06	NEGATIVO A: NAT (HBsAg, HCV, VIH)	24.8 %	75 %
448	5.43 x 10 ⁶	O+	A*24, A*68, B*35, B*48, DRβ1*04, DRβ1*16, DQβ1*03, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR	1.35 x 10 ⁶	O+	A*24, A*68, B*35, B*48, DRβ1*04, DRβ1*16, DQβ1*03, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas	13.2 %	94 %

Tabla 3. Resultados obtenidos en el estudio de unidades de CPH estudiadas. Los cuadros sombreados reflejan resultados no satisfactorios para el control de calidad.



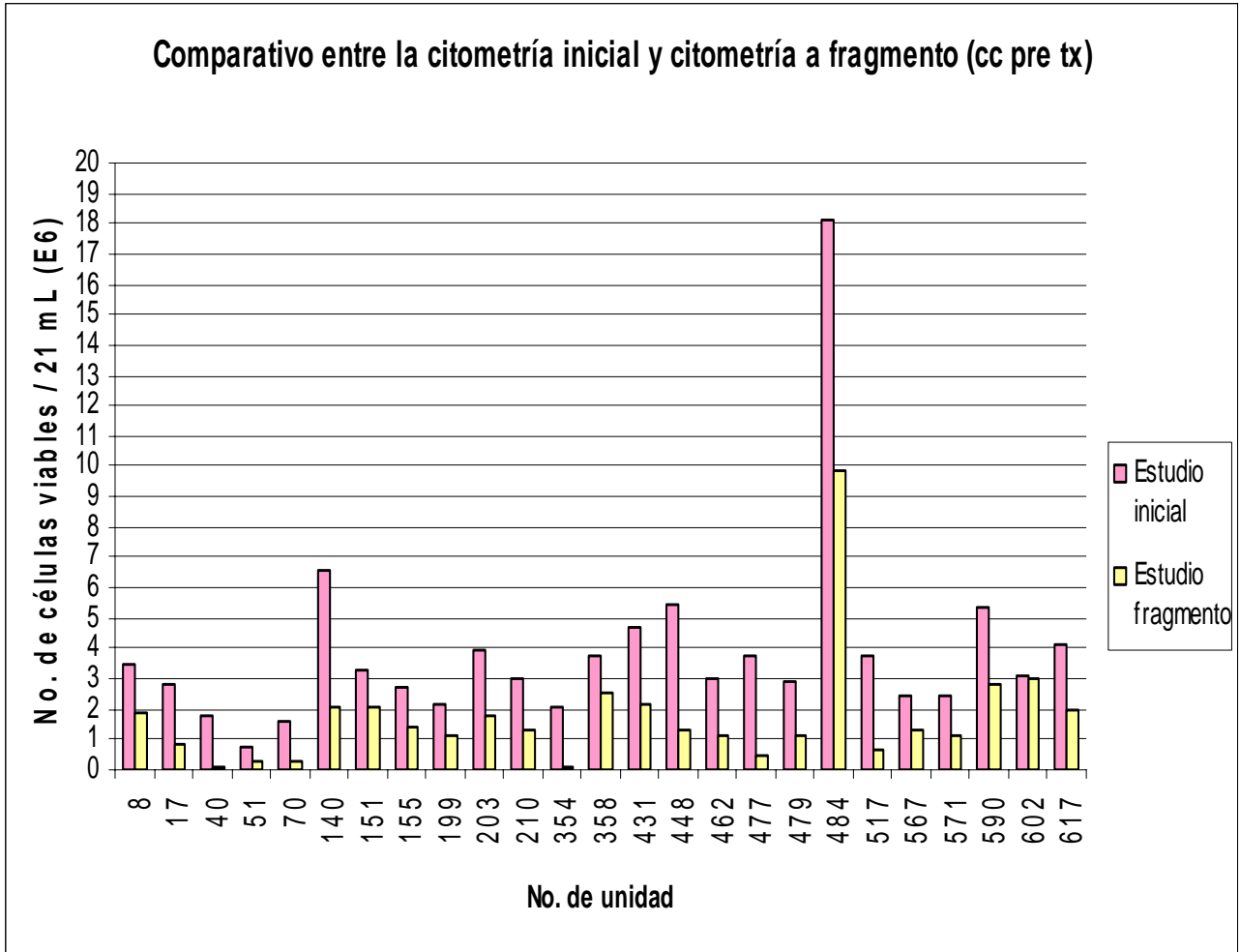
ESTUDIOS INICIALES A UNIDAD					ESTUDIOS VALIDACIÓN DE FRAGMENTO					
Número de unidad	Citometría células/21 mL	Grupo sanguíneo	HLA	Serología	Citometría células/21mL	Grupo sanguíneo	HLA	Serología	Cultivos clonogénicos E-CLONE	Viabilidad celular con azul de tripan
462	3.01 x 10 ⁶	O+	A*02, A*24 B*35, B*35 DRβ1*04, DRβ1*11 DQβ1*03, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR	1.11 x 10 ⁶	O+	A*02, A*24 B*35, B*35 DRβ1*04, DRβ1*11 DQβ1*03, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas	9.1 %	97 %
477	3.78 x 10 ⁶	A ₁ +	A*02, A*02 B*35, B*39 DRβ1*04, DRβ1*08 DQβ1*03, DQβ1*04	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR	0.512 x 10 ⁶	A ₁ +	A*02, A*02 B*35, B*39 DRβ1*04, DRβ1*08 DQβ1*03, DQβ1*04	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas	5.07 %	53 %
479	2.94 x 10 ⁶	O+	A*02, A*02 B*35, B*39 DRβ1*04, DRβ1*08 DQβ1*03, DQβ1*04	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR	1.12 x 10 ⁶	O+	A*02, A*02 B*35, B*39 DRβ1*04, DRβ1*08 DQβ1*03, DQβ1*04	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas	28 %	97 %
484	18.1 x 10 ⁶	O+	A*03, A*26, B*07, B*07, DRβ1*11, DRβ1*15, DQβ1*03, DQβ1*06	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR	9.86 x 10 ⁶	O+	A*03, A*26, B*07, B*07, DRβ1*11, DRβ1*15, DQβ1*03, DQβ1*06	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas	41.6 %	70 %
517	3.78 x 10 ⁶	O+	A*02, A*31 B*35, B*35 DRβ1*16, DRβ1*16 DQβ1*03, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR	0.678 x 10 ⁶	NO SE REALIZÓ	A*02, A*31 B*35, B*35 DRβ1*16, DRβ1*16 DQβ1*03, DQβ1*03	NO SE REALIZÓ	14.6 %	53 %

Tabla 4. Resultados obtenidos en el estudio de unidades de CPH estudiadas. Los cuadros sombreados reflejan resultados no satisfactorios para el control de calidad.



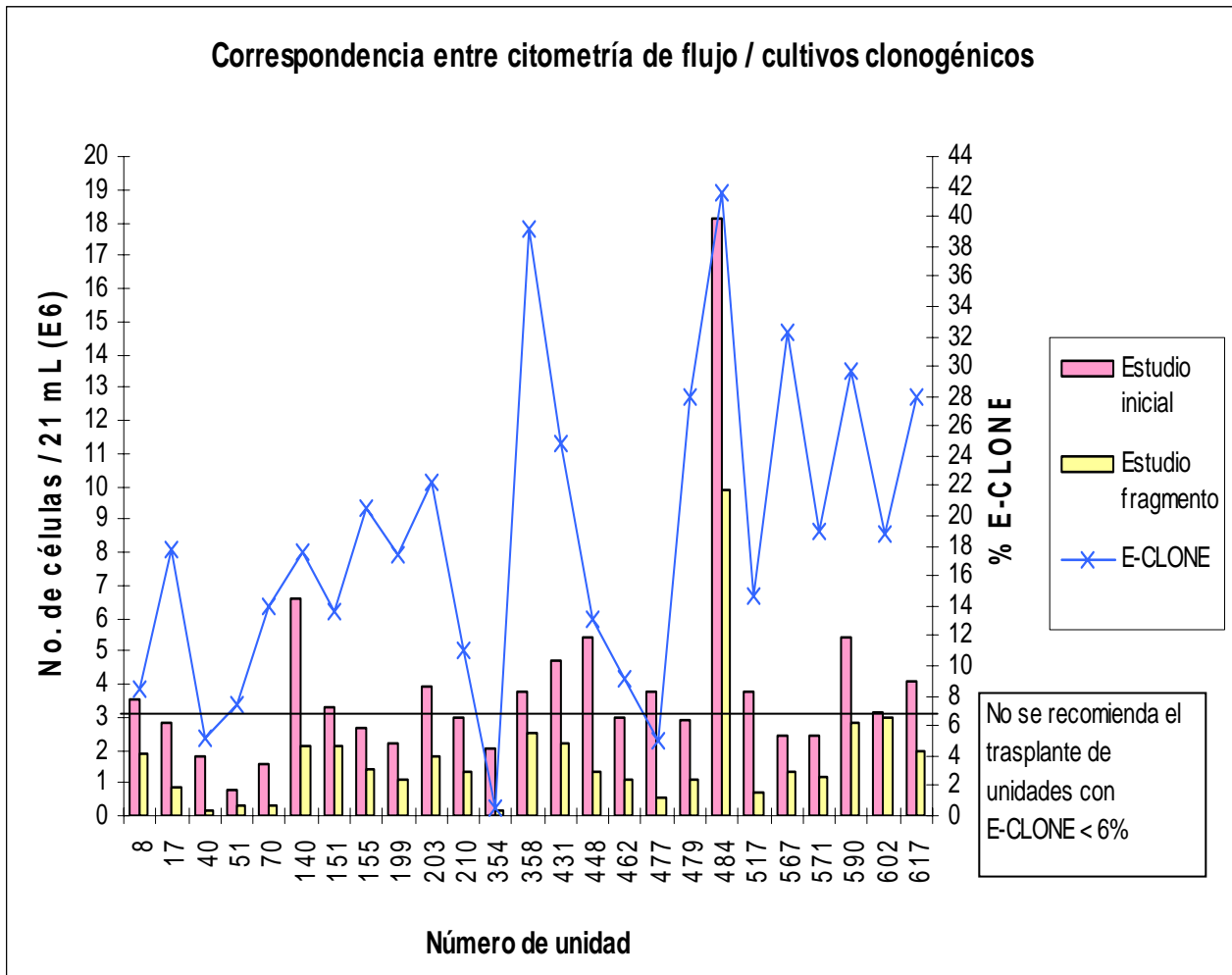
ESTUDIOS INICIALES A UNIDAD					ESTUDIOS VALIDACIÓN DE FRAGMENTO					
Número de unidad	Citometría células/21mL	Grupo sanguíneo	HLA	Serología	Citometría células/21mL	Grupo sanguíneo	HLA	Serología	Cultivos clonogénicos E-CLONE	Viabilidad celular con azul de tripan
567	2.43 x 10 ⁶	A+	A*02, A*02, B*51, B*52, DRβ1*07, DRβ1*14, DQβ1*02, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas	1.33 x 10 ⁶	A+	A*02, A*02, B*51, B*52, DRβ1*07, DRβ1*14, DQβ1*02, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas	32.19%	100 %
571	2.40 x 10 ⁶	B+	A*02, A*02/68, B*15, B*35, DRβ1*08, DRβ1*14, DQβ1*03, DQβ1*04	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas	1.16 x 10 ⁶	B+	A*02, A*02/68, B*15, B*35, DRβ1*08, DRβ1*14, DQβ1*03, DQβ1*04	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas Toxo(IgM-), CMV (IgM-)	18.9%	86 %
590	5.38 x 10 ⁶	O+	A*02, A*68, B*15, B*40, DRβ1*04, DRβ1*04, DQβ1*03, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas	2.84 x 10 ⁶	O+	A*02, A*68, B*15, B*40, DRβ1*04, DRβ1*04, DQβ1*03, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas	29.7%	77 %
602	3.14 x 10 ⁶	O+	A*02, A*68, B*15, B*39, DRβ1*04, DRβ1*04, DQβ1*03, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas	2.97 x 10 ⁶	O+	A*02, A*68, B*15, B*39, DRβ1*04, DRβ1*04, DQβ1*03, DQβ1*03	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas	18.8%	90 %
617	4.1 x 10 ⁶	B+	A*02, A*02, B*15, B*52, DRβ1*08, DRβ1*14, DQβ1*03, DQβ1*04	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas	1.96 x 10 ⁶	B+	A*02, A*02, B*15, B*52, DRβ1*08, DRβ1*14, DQβ1*03, DQβ1*04	NEGATIVO A: HBsAg, HCV, VIH, RPR, Chagas Toxo(IgM-), CMV (IgM-)	28 %	85 %

Tabla 5. Resultados obtenidos en el estudio de unidades de CPH estudiadas.



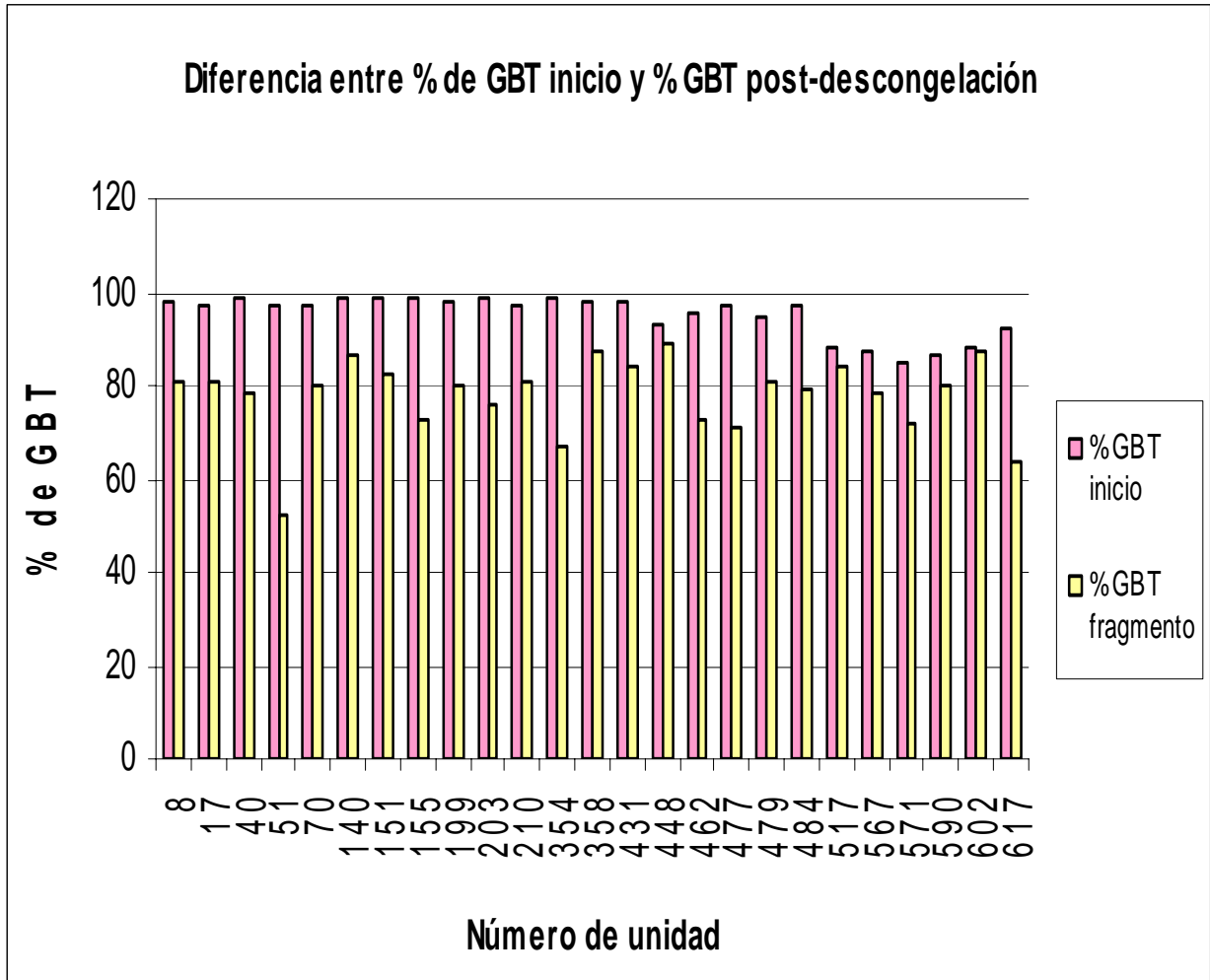
Gráfica 1. Comparativo entre la citometría inicial y la citometría al fragmento para determinación del control de calidad pre-trasplante.

En la gráfica No. 1 podemos observar el comparativo entre la citometría inicial (previa a la congelación) y la citometría del fragmento (post-descongelación). Se observa que la mayoría de ellas disminuye en 50% del valor inicial, lo cual es lo normalmente esperado después de la congelación y por el efecto de la hiposmolaridad debida a los reactivos utilizados para la citometría de flujo (45).



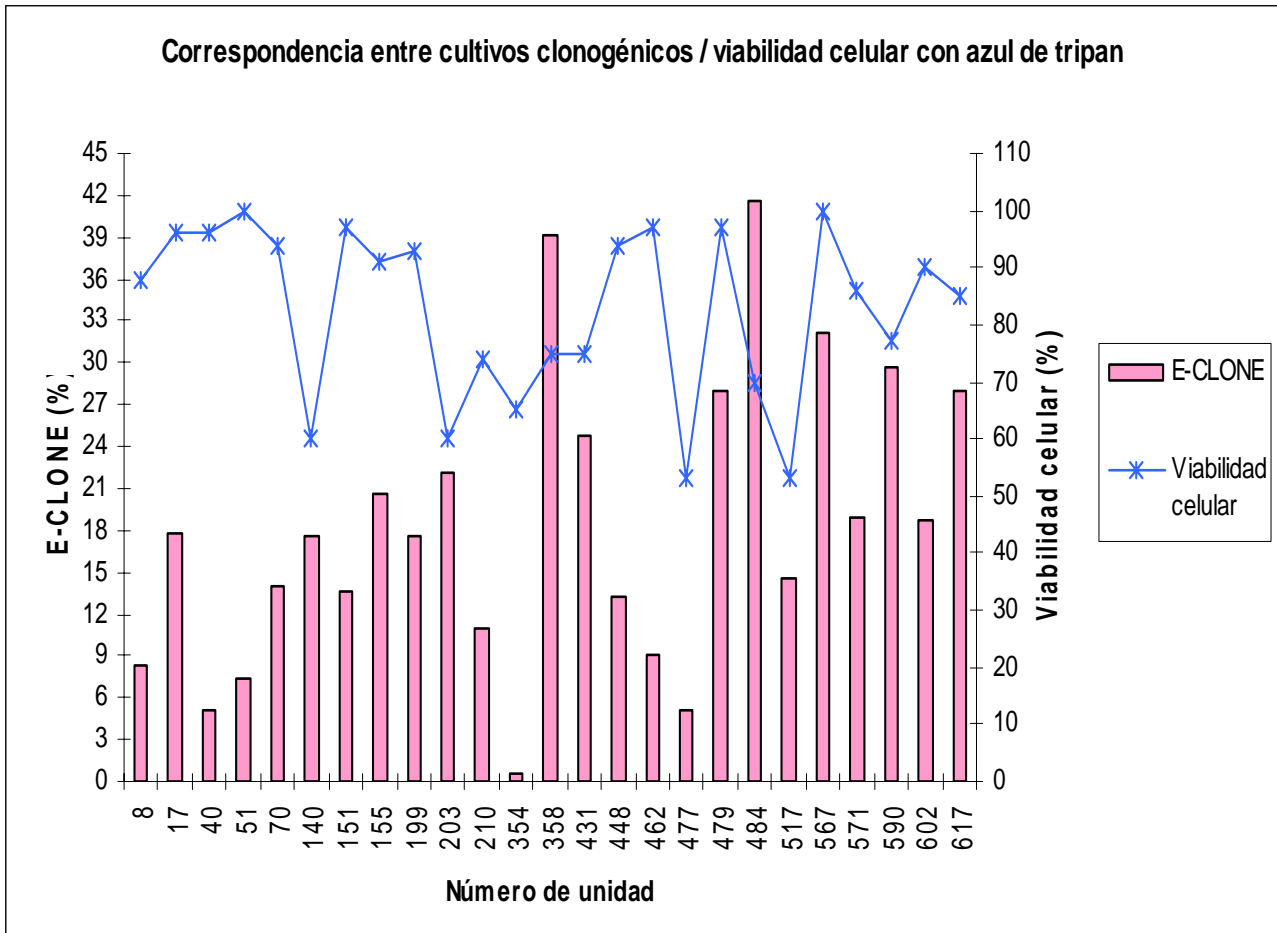
Gráfica 2. Correspondencia entre la citometría de flujo y los cultivos clonogénicos.

En la gráfica 2 podemos observar la correlación que existe entre la citometría de flujo y los cultivos clonogénicos. Se observa que en aquellas unidades en las que la citometría disminuyó más de la mitad del inicio, no cumplen con el valor mínimo de E-CLONE recomendado para la infusión.



Gráfica 2. Diferencia entra GBT al inicio y post-descongelación.

La gráfica 3 nos permite apreciar la diferencia en el porcentaje de glóbulos blancos totales al inicio y en el fragmento (post-descongelación). Se observa que en todos los resultados, el valor de GBT después de la descongelación no disminuye tan drásticamente. Es por esto que el éxito del injerto se estudia a partir del número de células CD34+ viables y no del valor total de GBT.



Gráfica 2. Correspondencia entre la viabilidad celular por azul de tripan y E-CLONE.

En la gráfica 4 observamos la relación que existe entre los cultivos clonogénicos y la viabilidad celular encontrada, para el cálculo de la siembra, con azul de tripan.



VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en las tablas muestran que:

- ☑ En cuanto al grupo sanguíneo, los resultados obtenidos en el control de calidad pre-trasplante al fragmento coinciden al 100% con los que se obtuvieron en la caracterización inicial.

- ☑ En el estudio de HLA debemos mencionar que al inicio del programa de criopreservación de células que comenzó en 2003, no se contaba con un laboratorio de histocompatibilidad dentro de banco de cordón, por lo que las muestras se analizaban a través de un proceso de mediana resolución en dos laboratorios acreditados externos.

En el año 2005 se incorporó a las instalaciones del banco el laboratorio de HLA, y a partir de esa fecha las determinaciones de los antígenos ABDRDQ de todas las unidades y, por supuesto, de los fragmentos del control de calidad pre-trasplante, se realizaron dentro del mismo banco de cordón.

Podemos observar que los resultados encontrados no correlacionan en 100%, pues en la unidad marcada con el número 070 se encuentra disparidad en uno de los alelos DR y en un alelo DQ entre los resultados reportados en un inicio y los obtenidos en la determinación del fragmento.



UNIDAD No. 070

Tipo de muestra	A	A	B	B	DR	DR	DQ	DQ
Reporte inicial del laboratorio externo	*02	*02	*35	*35	*08	*11	*04	*03
Reporte del fragmento del CNTS	*02	*02	*35	*35	*08	*08	*04	*04
Repetición del fragmento del CNTS	*02	*02	*35	*35	*08	*08	*04	*04
Reporte del vial DNAteca del CNTS	*02	*02	*35	*35	*08	*08	*04	*04
Reporte de la muestra del bebé del CNTS	*02	*02	*35	*35	*08	*08	*04	*04
Reporte de la muestra materna del CNTS	*02	*68	*35	*39	*04	*08	*04	*04

Tabla 6. Resultados obtenidos en el estudio HLA en laboratorio externo y laboratorio de BSCU del CNTS

Por este motivo se repitió el estudio de la muestra inicial (obtenida de las muestras de ADN congeladas al inicio del proceso de reducción de volumen), así como de una nueva muestra del donante, para descartar que el error fuera producido en el laboratorio del banco. Los resultados obtenidos en los 2 estudios realizados, tanto de la muestra de inicio como del donante, resultaron ser concordantes con los resultados reportados del fragmento del control de calidad.

Para descartar que no se tratara de una contaminación materna, apegados a los estándares internacionales que recomiendan efectuar el HLA materno, se realizaron los estudios de HLA a la muestra de la mamá, no encontrándose que hubiera una contaminación materna.



Estos datos indican que el error ocurrió por parte del laboratorio externo que procesó la muestra, al momento de la interpretación de las bandas. Esto se puede afirmar ya que al contar con una eficiente trazabilidad en el BSCU, no pudo haberse confundido la muestra al momento de ser enviada al laboratorio ni al congelarse, ya que al seguir la ruta de documentación de resultados, se corroboró que la muestra que fue enviada al laboratorio externo corresponde a la misma que fue extraída de la unidad en estudio.

Así pues, en este caso en particular, no fue posible que la unidad de cordón fuera suministrada al paciente, ya que habiendo un error en la tipificación inicial, la compatibilidad con el paciente disminuyó. De no haber efectuado el control de calidad pre-trasplante se hubiera puesto en riesgo al receptor, pues se expone potencialmente a un rechazo del injerto.

Se puede observar que a la unidad número 203 no se le realizó la determinación de la mayoría de las pruebas del control de calidad pre-trasplante (grupo sanguíneo, serología), entre ellas la del HLA. Esto sucedió debido a que esa unidad se encontraba ya comprometida para un paciente en el momento que se inició el estudio y lo único que se alcanzó a determinar fue la citometría y cultivos (se observa el mismo caso con la unidad 040). Es por ello que esta unidad también se decidió reportar en el estudio, para observar más claramente la importancia del control de calidad. Cabe mencionar que los reportes del paciente, posterior a la infusión, indican que no sufrió rechazo luego del trasplante (no se observaron signos evidentes), por lo que el HLA de esa unidad fue tipificado correctamente desde los estudios iniciales.

- En la determinación de los marcadores serológicos se encontró que los resultados previos a la congelación y post-descongelación, correlacionan en 100%. Las pruebas se llevaron a cabo en viales congelados al inicio del proceso, correspondientes a cada unidad. Además a algunas unidades se les



practicó la prueba de NAT, donde también se encontró que los resultados obtenidos antes y después eran negativos. Cabe mencionar que no todas las unidades cuentan con resultados de NAT debido a que se realizó en unidades al azar, como un estudio de serología infecciosa, mucho antes que se implementara el control de calidad pre-trasplante. Posteriormente, de las unidades estudiadas sólo en algunas fue posible realizar el estudio del NAT. De estas unidades en adelante, todas ellas cuentan con resultados de NAT para el control de calidad, sin embargo es importante reportar en el estudio desde las primeras unidades en las que se comenzó a implementar.

- ☑ En la cuenta de células CD34+ por citometría de flujo se observó que en todas las unidades estudiadas hay una disminución de hasta el 50% en la viabilidad celular. No así en la cuenta de GBT al inicio y post-descongelación (gráfica 4), donde la disminución no es tan dramática. Es por ello que en este estudio como en otros, la cuenta de GBT es importante, sin embargo no es la relación de viabilidad celular que se elige para continuar con el control de calidad pre-trasplante.

Retomando, el fenómeno de la disminución que se observó en la viabilidad celular lo podemos explicar apoyados en los estudios del Banco de Cordón de Barcelona (45), en donde se demostró que el cambio brusco de osmolaridad causado por las soluciones hipo-osmolares de lisis que se emplean comúnmente en la citometría de flujo, rinden viabilidades celulares entre el 50 y 60%. Esto sucede debido a que al perder líquido contenido dentro de ellas puede dañar a la célula hasta matarla, o bien, simplemente cambiar su conformación estructural, de modo que de cierta manera lleguen a "esconder" o no exponer de manera adecuada el antígeno CD34+, por lo que el aparato detecta un número menor de células viables en la muestra descongelada de las que en realidad existen.



Es por ello que es de particular atención observar que dicha disminución de la viabilidad no es observable cuando se realiza la técnica de azul de tripan en el momento de la siembra de cultivos clonogénicos. Aunque también cabe mencionar que en esta técnica se cuentan 100 células al azar en la cámara de Neubauer, por lo que -aunque es un factor poco probable- si no se llegara a homogenizar de manera correcta, los resultados de viabilidad podrían ser más altos o más bajos de lo que realmente son, por lo tanto este puede no llegar ser un parámetro tan significativo de la viabilidad celular para un estudio de este tipo como lo sería la citometría de flujo a pesar de lo antes mencionado (gráfica 3). Se asume que las muestras que aquí se reportan se trabajaron con calidad y por eso podemos decir que es un resultado confiable, que además es muy útil para el cálculo de la siembra de cultivos clonogénicos. Por supuesto también es factible decir que por la misma congelación se pierden células como un proceso natural no controlado.

Por otro lado, observamos que otro aspecto importante es la correlación entre la citometría de flujo y los cultivos clonogénicos, pues se observa que cuando la citometría arroja resultados por debajo del 50% con respecto al valor inicial, casi siempre la eficiencia clonogénica de la unidad disminuye de manera dramática (valores menores al 6%). En algunos casos no se observa así, como en la unidad No. 517, donde disminuyó aún más del 50% y su capacidad clonogénica es alta. Esto puede deberse al estado de inmadurez de las células, pues como antes se mencionó, mientras más "primitivas" sean las células, presentan una mejor capacidad clonogénica. Esto está reportado en estudios en los cuales caracterizan a las células CD34+ más inmaduras gracias a otros determinados marcadores celulares como lo son CD38-DR-, etc. (42,43,44).

- De los cultivos clonogénicos realizados se determinó el número de CFU-GM, BFUE, CFU-MIX, CFU-T/mL y la eficiencia clonogénica entre los días 10 y 15 posteriores al sembrado. Los resultados mostraron valores de E-CLONE



(correlación entre CFUt/CD34+t) promedio de 22.07% los cuales se encontraron por arriba de los límites indicados en las recomendaciones (>6%), además de que el valor promedio de UFC-T x 10⁶ es de 0.76.

Como se puede observar, algunas unidades reportadas, específicamente la No. 040, 354 y 477, no cumplen con el criterio anteriormente descrito, es decir, el valor de E-CLONE es menor de 6%, y, si observamos detalladamente, coincide con que el valor reportado de la citometría de flujo es igualmente muy bajo, con lo que corroboramos que entre ambas metodologías se encuentra una buena correlación. Con base en estos resultados, no se recomienda la infusión de estas unidades.

Finalmente, es importante resaltar que la realización de los cultivos clonogénicos en la unidad de terapia celular, previo a un trasplante, es una herramienta de control de calidad de la unidad, y el obtener resultados de E-CLONE permite tanto predecir de alguna forma el comportamiento que tendrán las CPH en el paciente y la evolución del injerto, como descartar unidades que pueden encontrarse en condiciones no óptimas para el paciente que lo requiera, aún cuando sea una unidad HLA-idéntica.



VII. CONCLUSIONES

1. La implementación de un control de calidad pre-trasplante dentro del BSCU, resulta indispensable para el aseguramiento de la calidad de una unidad de células progenitoras hematopoyéticas que requiera ser infundida, y debe ser realizada sistemáticamente en todas las unidades de CPH antes de ser liberadas para infusión.
2. La determinación de los antígenos del sistema HLA, juegan un papel primordial en cuanto al éxito del injerto, ya que si existe algún error en la interpretación inicial de los resultados, esto puede significar el infundir una unidad que pudiera parecer compatible en 4/5, 5/6 o 6/6 antígenos con respecto al receptor, y que en realidad tuviera una compatibilidad menor debido al error en la tipificación, lo que podría resultar en rechazo o pérdida del injerto.
3. La citometría de flujo post-descongelación, por sí sola, no es una metodología 100% confiable, pues el choque osmótico producido en las células progenitoras al contacto con los reactivos, hace que su viabilidad disminuya hasta en un 50%. Sin embargo aporta información relevante cuando se relaciona con la E-CLONE resultante de los cultivos clonogénicos.
4. La determinación de la E-CLONE a partir de los cultivos clonogénicos, constituye un elemento predictivo en cuanto al comportamiento de los progenitores hematopoyéticos. Una E-CLONE >10% garantiza en gran medida el éxito de injerto, mientras que un resultado < 6% obliga a descartar esa unidad para un trasplante.
5. La trazabilidad es un parámetro muy importante, ya que evita errores en la información asignada a cada una de las unidades y con lo cual se asegura que los resultados obtenidos correspondan a la unidad estudiada. Gracias a



esto, se puede brindar a los pacientes unidades completamente tipificadas y de calidad.

6. Es fundamental que todos los centros con manejo de CPH, incluyan este control de calidad pre-trasplante para garantizar la seguridad transfusional y la calidad hematopoyética de sus unidades.

**VIII. REFERENCIAS**

1. McKenzie S. **Hematología Clínica**. Ed. El Manual Moderno. México, 2000.
2. Beutler E, Coller B, Lichtman M, Kipps T. **Williams Hematology sixth edition**. Ed. Mc Graw-Hill. U.S.A. 2001
3. Parslow T, Suites D, Terr A, Imbodem J. **Inmunología Básica y Clínica**. Ed. El Manual Moderno. México, 2001
4. Miranda B, Naya M, Prat I, Ortega JJ, Castillo R, Bornstein R, García J, Galmes A, Regidor C. **Informe sobre trasplantes de sangre de cordón umbilical**. Obtenido de la página www.ont.msc.es/donacion/consenso/pdf/consenso16.pdf
5. Hogan CJ, Shapall E, Mc Nulty O, Mc Niece I, Dick JE, Shultz LD, Keller G. **Engraftment and Development of Human CD34⁺-Enriched Cells From Umbilical Cord Blood in NOD/LtSz-*scid/scid* Mice**. Blood, Vol 90, No 1, July 1, 1997: pp 85-96.
6. Cairo M, Wagner J. **Placental and/or Umbilical Cord Blood: An Alternative Source of Hematopoietic Stem Cells for Transplantation**. Blood, Vol 90, No 12 December 15, 1997: pp 4665-4678.



7. Mayani H, Lansdorp P. **Biology of Human Umbilical Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem/Progenitor Cells.** *Stem Cells Blood* 1998;16:153-165.
8. Grewal S, Barker J, Davies S, Wagner J. **Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood?** *Blood*, volumen 101, número 11, junio 1, 2003.
9. Ooi J, Iseki T, Takahashi S, Tomonari A, Ishii K, Takasugi K, Shimohakamada Y, Ohno N, Uchimaru K, Nagamura F, Tojo A, Asano S. **Unrelated cord blood transplantation for adult patients with advanced myelodysplastic syndrome.** *Blood*, 15 June 2003, volume 101, number 12.
10. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AT, et al. **Hematopoietic reconstitution in patient with Fanconi anemia from an HLA-identical sibling.** *N Engl J Med* 1989; 321:1176-1178.
11. Querol S. **El trasplante de cordón: desde el laboratorio a la clínica.** *Gac Méd Méx* Vol. 139, Suplemento No. 3, 2003. S107-S109



12. Gómez-Morales E. **Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas. Una Nueva Perspectiva.** Méx Vol. 139, Suplemento No. 3, 2003. S105 y S106.
13. García J, Amat LI y Querol S. **Los bancos de sangre de cordón umbilical: una nueva contribución al tratamiento de las enfermedades hematológicas.** Obtenido de la página <http://www.geoscopio.com/empresas/aecientificos/intereshtml/cordonumbilical/cordonumbilical.htm>
14. García J. **Situación actual de los Bancos de Sangre de Cordón Umbilical y su utilidad terapéutica.** Obtenido de la página: www.geoscopio.com/empresas/aecientificos/documentos/Bancos-Sangre-Cordon-Unbilical.pdf
15. www.netcord.org
16. Miñana D, Carbonell F, Mateu E, Encabo A. **Sangre De Cordón Umbilical Como Fuente De Células Madre Hematopoyéticas Para Trasplante.** Obtenido de la página: [www.farmaindustria.es/.../72495cad39b9be5cc1256d5c0044aff4/\\$FILE/cap%2006.pdf](http://www.farmaindustria.es/.../72495cad39b9be5cc1256d5c0044aff4/$FILE/cap%2006.pdf)



17. Wagner J, Barker J, DeFor T, Baker S, Blazar B, Eide C, Goldman A, Kersey J, Krivit W et al. **Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival.** Blood, 1 septiembre 2002, volumen 100, núm 5.
18. Ueda T, Yoshino H, Kobayashi K, Kawahata M, Ebihara Y, Ito M, Asano S, Nakahata T and Tsuji K. **Hematopoietic Repopulating Ability of Cord Blood CD34+ Cells in NOD/Shi-scid Mice.** Stem Cells 2000;18;204-213.
19. Ballen K. **New trends in umbilical cord blood transplantation.** Blood, 15 mayo 2005 , volumen 105, número 10.
20. Rodríguez Moyado H. **El Banco de Sangre y la Medicina Transfusional.** Ed. Médica Panamericana. México, D.F. 2004. Capítulo 19.
21. Gafou A, Georgopoulos G, Bellia M, Vgotza N, Maragos K, Lagiandreu T, Digenopoulou-Andrioti E. **Review in the literature of the new solutions to an old problem: human error in transfusion practice.** Haema 2005; 8(4): 598-611
22. Dzik S. **Non-infectious serious hazards of transfusion.** America's blood centers, May 2002.



23. Hochberg E, Miklos D, Neuberg D, Eichner D, McLaughlin S, Mattes-Ritz A, Alyea E, Antin J, Soiffer R, and Anovel J. **Rapid single nucleotide polymorphism (SNP)-based method for assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation.** Blood, 1 enero 2003 volumen 101, número 1.
24. Barker J, Weisdorf D, DeFor T, Blazar B, Miller J, Wagne J. **Rapid and complete donor chimerism in adult recipients of unrelated donor umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning.** Blood, 1 septiembre 2003 volumen 102, número 5.
25. Walters MC, Patience M, Leisenring W, Rogers ZR, Aquino VM, Buchanan GR, Roberts IAG, Yeager AM, Hsu L, Adamkiewicz T, Kurtzberg J, Vichinsky E, Storer B, Storb R, Sullivan KM. **Stable Mixed Hematopoietic Chimerism After Bone Marrow Transplantation for Sickle Cell Anemia.** Biology of Blood and Marrow Transplantation 7:665-673 (2001)
26. National Cancer Institute. **Los Trasplantes de Células Madre Troncales.**
Extraído de la página
<http://www.nci.nih.gov/cancertopics/understandingcancer/espanol/el-Trasplante-de-Celulas-Madre/Slide1>



27. Guardiola P, Socie´ G, Li X, Ribaud P, Devergie A, Espe´ rou H, Richard P, Traineau R, Janin A, and Gluckman E. **Acute graft-versus-host disease in patients with Fanconi anemia or acquired aplastic anemia undergoing bone marrow transplantation from HLA-identical sibling donors: risk factors and influence on outcome.** Blood, 1 enero 2004 volumen 103, número 1.
28. Jaime J, Dorticós E, Pavón V, Cortina L. **Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas: tipos, fuentes e indicaciones.** Rev. Cubana Hematol Inmunol Hemoter v.20 n.2 Ciudad de la Habana Mayo-agosto 2004.
29. Wagner J, Rosenthal J, Sweetman R, Shu X, Davies S, Ramsay N, McGlave P, Sender L, and Cairo M. **Successful Transplantation of HLA-Matched and HLA-Mismatched Umbilical Cord Blood From Unrelated Donors: Analysis of Engraftment and Acute Graft-Versus-Host Disease.** Blood, vol 88, No 3 (August I), 1996: pp 795-802
30. Vogelsang G and Hess A. **Graft-Versus-Host Disease: New Directions for a Persistent Problem.** Blood, Vol 84, No 7 (Octubre I), 1994: pp 2061-2067



31. **NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-003-SSA2-1993, "Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos".**

32. <http://www.fda.gov/bbs/topics/ANSWERS/2001/ANS01103.html>

33. Stevens C, Gladstone J, Taylor P, Scaradavou A, Migliaccio A, Visser J, N Dobrila, Carrier C, Cabbad M, Wernet P, Kurtzberg J, and Rubinstein P. **Placental/umbilical cord blood for unrelated-donor bone marrow reconstitution: relevance of nucleated red blood cells.** Blood, 1 octubre 2002 volumen 100, numero 7

34. Matsuoka S, Ebihara Y, Xu MY, Ishii T, Sugiyama D, Yoshino H, Ueda T, Manabe A, Tanaka R, Ikeda Y, Nakahata T, and Tsuji K. **CD34 expression on long-term repopulating hematopoietic stem cells changes during developmental stages.** Blood, 15 enero 2001, volumen 97, número 2

35. Rocha V, Cornish J, Sievers E, Filipovich A, Locatelli F, Peters C, Remberger M, Michel G, Arcese W, Dallorso S, Tiedemann K, Busca A, Chan KW, Kato S, Ortega J, Vowels M, Zander A, Souillet G, Oakill A, Woolfrey A, Pay AL, Green A, Garnier F, Ionescu I, Wernet P, Sirchia G, Rubinstein P, Chevret S, and Gluckman E. **Comparison of outcomes of unrelated bone marrow**



and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. Blood, 15 mayo 2001 volumen 97, número 10.

36. Leary A and Ogawa M. **Blast Cell Colony Assay for Umbilical Cord Blood and Adult Bone Marrow Progenitors.** Blood, Vol 69, No 3 (March), 1987: pp 953-956
37. DiGiusto DL, Lee R, Moon J, Moss K, O'Toole T, Voytovich A, Webster D, and Mule J. **Hematopoietic Potential of Cryopreserved and Ex Vivo Manipulated Umbilical Cord Blood Progenitor Cells Evaluated In Vitro and In Vivo.** Blood, Vol 87, No 4 (Febrero 15). 1996: pp 1261-1271
38. Pettengell R, Luft T, Henschler R, Hows J, Dexter TM, Ryder D, and Testa NG. **Direct Comparison by Limiting Dilution Analysis of Long-Term Culture-Initiating Cells in Human Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, and Blood Stem Cells.** Blood, Vol 84, No 11 (Diciembre 1), 1994: pp 3653-3659.
39. Querol S. **Tesis doctoral Expansión ex vivo de progenitores hematopoyéticos de sangre de cordón umbilical para trasplante.** Universidad de Barcelona.



40. Migliaccio AR, Adamson JW, Stevens CE, Dobrila NL, Carrier CM, and Rubinstein P. **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 octubre 2000 z volumen 96, número 8.
41. Rodríguez VM, Cuéllar A, Cuspoca LM, Contreras CL, Mercado M, Gómez A. **Determinación fenotípica de subpoblaciones de células madre derivadas de sangre de cordón umbilical.** Biomédica 2006;26:51-60.
42. Rusten LS, Jacobsen SEW, Kaalhus O, Veiby OP, Funderud S, and Srneland EB. **Functional Differences Between CD38- and DR- Subfractions of CD34⁺ Bone Marrow Cells.** Blood, Vol 84, No 5 Septiembre 11, 1994 pp 1473-1481
43. Verstegen M, van Hennik P, Terpstra W, van den Bos C, Wielenga JJ, van Rooijen N, Ploemacher R, Wagemaker G, and Wognum AW. **Transplantation of Human Umbilical Cord Blood Cells in Macrophage-Depleted SCID Mice: Evidence for Accessory Cell Involvement in Expansion of Immature CD34⁺ CD38⁺ Cells.** Blood, Vol 91, No 6 (March 15), 1998: pp 1966-1976



44. Gallacher L, Murdoch B, Wu D, Karanu F, Keeney M, and Bhatia M. **Isolation and characterization of human CD34⁺Lin⁻ and CD34⁺Lin⁻ hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7.** Blood, 1 may 2000 x volume 95, number 9
45. Rodríguez Gómez L. **Reconstitución de Productos Hematopoyéticos Criopreservados: Control de Calidad, Estabilidad Osmótica y Lavado de DMSO.** Universidad Autónoma de Barcelona, 2005.

**ANEXO**

Las metodologías descritas corresponden a:

P-IC-58	Tipificación directa del grupo sanguíneo ABO y del antígeno D del sistema Rh
P-IC-67	Determinación de HLA en Sangre
P-IC-37	Determinación de células CD34+ por Citometría de Flujo
P-IC-75	Procedimiento de cultivos clonogenicos

Y son propiedad del BSCU del CNTS. La caracterización inicial del producto, para ver si cumple con las características necesarias de volumen y número de CNT, son las siguientes:

P-IC-39	Recolección de SCU
P-IC-76	Determinación de Biometría Hemática
P-IC-41	Lavado de SCU en sistema automatizado SEPAX
P-IC-44	Criopreservación de CPH a partir de SCU