



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

“La eficiencia de una Unidad de Terapia Celular y Progenitores Hematopoyéticos dentro del programa de trasplantes en el Hospital General Naval de Alta Especialidad”

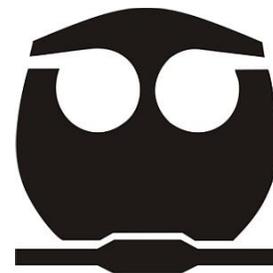
T E S I N A

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN BIOQUÍMICA CLÍNICA**

PRESENTA:

HUGO HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

México, DF 2014





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: Dr. Rodolfo Pastelin Palacios

Vocal: M. en C.: María Guadalupe Ortiz López

Secretario: MASS Eva Delia Calderón Garcidueñas

Primer suplente: Dr. Fernando Montiel Aguirre

Segundo Suplente: MASS Enrique Gómez Morales

Esta Tesina fue realizada en la Unidad de Terapia Celular y Progenitores Hematopoyéticos del Hospital General Naval de Alta Especialidad, bajo la asesoría de la MASS Eva Delia Calderón Garcidueñas.

MASS Eva Delia Calderón Garcidueñas (Asesor del proyecto)

Q.F.B. Hugo Hernández Hernández (Sustentante)

ABREVIATURAS

7AAD	7-aminoactinomicina-D
AABB	Asociación Americana de Bancos de Sangre
ABO	Sistema de clasificación de grupo sanguíneo
BSCU	Banco se sangre de cordón umbilical
CAT	Comité de Acreditación de Trasplantes
CFU	Unidad Formadora de Colonias
CPH	Células Progenitoras Hematopoyéticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EFI	Federación europea de Inmunogenética
EICH	Enfermedad Injerto Contra Huésped
FACT	Fundación para la Acreditación en Terapia Celular
GEMM	Granulocítica, Eritroide, Monocítica y Megacarocítica
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos
HOSGENAES	Hospital General Naval de Alta Especialidad
JACIE	Comité Conjunto de Acreditación (Sociedad Internacional de Terapia Celular y Grupo Europeo para trasplante de sangre y médula ósea)
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
MO	Médula Ósea
N₂L	Nitrógeno Líquido
OMS	Organización Mundial de la Salud
PH	Precusores Hematopoyéticos
PVC	Policloruro de Vinilo
SCU	Sangre de Cordón Umbilical
SPm	Sangre Periférica movilizada
TCPH	Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas
TSCU	Trasplante de Sangre de Cordón Umbilical
Tx	Trasplante
UTCyPH	Unidad de Terapia Celular y Progenitores Hematopoyéticos
WBMT	Red Mundial para el Trasplante de Médula Ósea
WMDA	Asociación Mundial de Donantes de Médula Ósea

INDICE

I. RESUMEN	7
II. ANTECEDENTES	8
A. Terapia Celular	8
B. Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH)	8
1. Calidad y Seguridad de las CPH	9
C. Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas (TCPH)	11
1. Tipos de TCPH	12
a) Por origen de CPH	12
b) Por relación genética	13
c) Por intensidad de acondicionamiento	14
2. Indicaciones para TCPH	16
3. Normatividad Nacional y Estándares de Calidad Internacionales	17
4. Proceso de TCPH	19
a) Selección de Paciente	19
b) Pruebas de Histocompatibilidad	19
c) Recolección de CPH	22
d) Obtención de CPH de Sangre de Cordón Umbilical	26
e) Procesamiento de CPH	28
D. Recomendaciones para el empleo de TCPH	33
E. Efectividad del TCPH	37
F. Situación actual de TCPH	39
G. El TCPH en México	41

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43
IV. JUSTIFICACIÓN	44
V. HIPÓTESIS	45
VI. OBJETIVO GENERAL	45
VII. OBJETIVOS ESPECIFICOS	45
VIII. IMPLEMENTACIÓN DE LA UNIDAD DE TERAPIA CELULAR Y PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS (UTCyPH)	47
A. Normatividad Nacional	47
B. Estándares Internacionales	48
C. Estructura Física	49
D. Protocolos de Trabajo	57
1. Protocolo de trabajo para el TCPH	57
a) Tipos de trasplantes realizados en el HOSGENAES	59
2. Protocolo de trabajo de la UTCyPH	61
a) Obtención de CPH	61
b) Procesamiento de CPH	62
c) Infusión	67
E. Controles de Calidad	70
IX. RESULTADOS	71
X. DISCUSIÓN	75
XI. CONCLUSIONES	76
XII. BIBLIOGRAFÍA	77

I. RESUMEN

El trasplante celular es la administración de productos con la intención de proporcionar células efectoras en el tratamiento de la enfermedad o el apoyo de otra terapia. Las células progenitoras hematopoyéticas (CPH), son aquellas capaces de autoreplicarse, proliferar y diferenciarse, en los elementos de la sangre y hacia diversos linajes celulares especializados. Se identifican por el fenotipo CD34+.

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) se ha usado para reconstituir la hematopoyesis. Es un tratamiento estándar para pacientes con desórdenes congénitos o adquiridos del sistema hematopoyético, el cual se logra reestablecer por el injerto exitoso de las CPH en el paciente. El injerto de estas células, depende de mantener su calidad y seguridad en cada proceso del trasplante, que abarca la obtención, procesamiento, criopreservación e infusión.

México no cuenta con normatividad que respalde el buen funcionamiento de los programas de TCPH, por lo que las unidades que inician la práctica de este tratamiento se basan en estándares de calidad internacionales como los proporcionados por el Comité de Acreditación para la Trasfusión Sanguínea (CAT), Fundación para la Acreditación de Terapia Celular-Comité Conjunto de Acreditación FACT-JACIE. Al adaptar dichos estándares a las posibilidades del país y ejercerlos junto con la normatividad correspondiente se puede garantizar el injerto del producto celular y así mejorar la eficiencia del TCPH.

II. ANTECEDENTES

A. Terapia Celular

La Fundación para la Acreditación de Terapia Celular (FACT) define como trasplante celular a la administración de productos con la intención de proporcionar células efectoras en el tratamiento de la enfermedad o el apoyo de otra terapia; entendiendo como productos, a las CPH provenientes de médula ósea, sangre periférica y sangre de cordón umbilical.

B. Células Progenitoras Hematopoyéticas

Las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) o troncales, son aquellas capaces de autoreplicarse, proliferar y diferenciarse, en los elementos de la sangre y hacia diversos linajes celulares especializados. Conocidas también como “stem cells”, representan menos del 1% de las células de la médula ósea. No son identificables morfológicamente (son semejantes a las células mononucleares de sangre total), por lo que deben ser identificadas por el inmunofenotipo (CD34+, CD38-) y adicionalmente (CD90+, CD117+ y HLA-DR-), o ser evaluadas en su capacidad proliferativa en medios de cultivo “in vitro” (1).

Las tres propiedades características de las CPH son: multipotencialidad, capacidad de auto-renovación y de proliferación. Por lo tanto, las CPH pueden ser definidas como células con potencial clonogénico pues poseen la propiedad de renovarse a sí mismas, de proliferar y de diferenciarse hacia todos los tipos de células sanguíneas y a otras líneas celulares conforme a las condiciones del microambiente (12).

En medios de cultivo, reciben el nombre de unidad formadora de colonias mieloides y linfoides (CFU-ML) pues dan origen a las líneas celulares del mismo nombre. A partir de la línea mieloide se producen las CFU-GEMM (granulocítica, eritroide, monocítica y megacariocítica) “comprometidas” a CFU-GM (granulocito, monocito) y CFU-MegE (megacariocito, eritroide); y posteriormente se generan de manera específica las CFU-G, CFU-M, CFU-E, CFU-Meg (20).

Las células troncales hematopoyéticas humanas se identifican en base a los marcadores de superficie CD34+, CD38-, HLA-DR-, bajos niveles de Thy-1 y la ausencia del marcador de linaje: “Lin-”. Estas células poseen la capacidad de proliferar a múltiples líneas en medios de cultivo “in vivo” e “in vitro” a largo plazo (LTC-IC) y son capaces de mantener su propiedad de auto-renovación en ensayos de repoblación celular en un segundo huésped (12, 20).

1. Calidad y seguridad de las CPH

La eficiencia de las CPH está en función de dos aspectos: calidad y seguridad.

- **Calidad**

Se basa en la identificación de células con el marcador específico CD34+, así como en la determinación de viabilidad y funcionalidad, debido a la importancia de infundir una dosis de células CD34+ viables para asegurar la eficacia del trasplante, y a que, la cinética de recuperación de las células hematopoyéticas funcionales está relacionada con la cantidad de células infundidas. La Sociedad Internacional de Hemoterapia e Ingeniería de Trasplantes (ISHAGE) establece la realización de 4 mediciones: el volumen total de muestra disponible, el número

absoluto de células nucleadas por unidad de volumen, el porcentaje de células CD34+ del total de células nucleadas y el porcentaje de viabilidad (1,10).

La citometría de flujo constituye el método de elección empleado para determinar el número absoluto de células nucleadas, el porcentaje de células CD34+ y la viabilidad celular (10).

La funcionalidad de estas células se evalúa con cultivos clonogénicos, realizados generalmente en medios semisólidos de metilcelulosa, enriquecidos con suero fetal bovino y factores de crecimiento, incubando a 37°C y 5%CO₂ durante 10 días. Posteriormente se calcula la Efectividad clonogénica (Eclone) que debe ser mayor al 10%, y que es la correlación entre el número de UFC generadas en el cultivo respecto al número de CD34+ en la muestra sembrada.

- Seguridad

El proceso, desde la obtención hasta la infusión de CPH, debe realizarse bajo procedimientos establecidos que, a través de la mínima manipulación del producto, eviten su contaminación y la pérdida de células útiles, garantizando así la seguridad del producto. Estos procedimientos deben fundamentarse en los estándares internacionales FACT-JACIE, que indican los requisitos para un sistema de gestión de calidad, y la organización de unidades de obtención, procesamiento y/almacenamiento de CPH.

La unidad de progenitores hematopoyéticos debe contar con la infraestructura y equipo necesarios para el correcto procesamiento de los productos, así como con personal capacitado que realice su trabajo según las buenas prácticas. De esta

manera, las actividades realizadas dentro del área, las llevará a cabo personal que trabaje con el equipo seguridad requerido, en condiciones ambientales optimas, con los equipos adecuados y material suficiente, logrando que las CPH sean seguras en cada etapa de su procesamiento, manteniendo la dosis, viabilidad y ausencia de contaminantes microbiológicos.

C. Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas (TCPH)

Es la infusión de Células Progenitoras Hematopoyéticas, con el fin de reconstituir la hematopoyesis, por lo tanto es un tratamiento estándar para pacientes con desórdenes congénitos o adquiridos del sistema hematopoyético o con enfermedades malignas y no malignas, que sean quimio, radio o inmunosensibles; requiere de altos estándares de calidad y de cuidados especiales para su aplicación.

Una vez efectuado el trasplante, la recuperación se inicia cuando el injerto del trasplante ha ocurrido; el injerto inicia en el momento en que ocurre el prendimiento del trasplante, reflejado por un conteo de neutrófilos mayor a $0.5 \times 10^9/L$ (500neutrófilos/ μL), durante tres días consecutivos. El primer día es considerado el día de injerto.

La mayor parte de los injertos ocurre entre el día 15 y 18 post-trasplante. Posteriormente aparece la recuperación eritroide, documentada por la presencia de reticulocitos y finalmente la plaquetaria, que puede retrasarse por una o dos semanas, depende de la reserva medular del paciente.

A pesar de que la técnica para obtener e infundir las CPH es relativamente sencilla, los problemas relacionados con el trasplante alogénico como la histocompatibilidad y el aislamiento del paciente por la necesidad de prevención y tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped (EICH) y de las infecciones oportunistas post trasplante, convierten al TCPH en uno de los más complejos tratamientos modernos.

1. Tipos de TPH

Los TPH, pueden clasificarse por el origen de los precursores, con base a la relación genética donador-receptor determinada por los estudios de histocompatibilidad y por la intensidad del tratamiento de quimio-radioterapia de acondicionamiento (3).

Según el origen de los Precusores Hematopoyéticos (PH)			
Tipo	Descripción	Ventajas	Desventajas
Médula Ósea	Obtenida mediante múltiples punciones y aspiración de la sangre de la médula ósea (crestas ilíacas y ocasionalmente esternón o meseta tibial).	Obtención de buen número de progenitores.	Método agresivo para el donante.
		a) Por el origen de	
Sangre Periférica	Se movilizan los progenitores hematopoyéticos y se recolectan por citoaféresis. La movilización puede hacerse en la fase de recuperación de la aplasia que sigue a quimioradioterapia intensiva y también después de la administración de diversos factores de crecimiento hematopoyético (Factor estimulante de colonias de granulocitos).	Método menos agresivo para el donante. Obtención de un mayor número de progenitores. Recuperación hematopoyética e inmunológica más rápida.	Necesidad de administrar factores de crecimiento al donante. Puede requerir colocación de catéter central. Mayor incidencia de EICH crónica.
	precusores. La fuente clásica de progenitores	Facilidad de obtención e inocuidad del donante.	Cantidad limitada de progenitores hematopoyéticos.
Sangre de Cordón Umbilical	Inmediatamente después del parto, tras cortar el cordón umbilical es posible recolectar alrededor de 100 a 250 mL de sangre del cordón umbilical unido a la placenta, fuente rica en progenitores hematopoyéticos	Disponibilidad más rápida. Conocimiento previo de la celularidad. Mayor actividad citogénica de los progenitores. Menos actividad inmunológica (menos EICH)	Imposibilidad de una segunda donación. Posible transmisión de enfermedades genéticas.
	hematopoyéticos para trasplante		

Tabla 1. Clasificación de TCPH según el origen de los precursores hematopoyéticos

es la médula ósea, pero también se emplean células provenientes de sangre periférica movilizadas por citocinas o de sangre del cordón umbilical.

b) Con base a la relación genética donador-receptor:

El trasplante alogénico se establece por la relación donador – receptor de familiar relacionado, de acuerdo a las características de los antígenos de histocompatibilidad, clase I (antígenos A, B y C) y clase II (en DR). Cuando se trata de un trasplante de donador no relacionado con sangre de cordón umbilical estos antígenos se deben procesar con técnicas de alta resolución y cuando se trata de donadores voluntarios no relacionados se agregan a los antígenos clase I, los antígenos clase II DR, DP y DQ todos ellos realizados con metodología de alta resolución.

Relación Genética Donante-Receptor			
Tipo	Descripción	Desventajas	Ventajas
Alogénico	Efectuado entre individuos de una misma especie.	El sistema inmunitario del receptor puede rechazar el órgano trasplantado. Se puede desencadenar la enfermedad injerto contra huésped (EICH).	Existen donadores familiares o voluntarios inscritos en registros internacionales que pueden ser compatibles con el enfermo, recomendado al no poder utilizar precursores del propio paciente.
Singénico o Isogénico	Entre hermanos gemelos univitelinos u homocigotos	Puede no disponer del beneficio del efecto injerto contra tumor.	No hay rechazo al injerto, ni EICH No requiere inmunosupresión intensa
Autólogo	Se transfunden precursores propios del paciente.	Mayor incidencia de recidivas de la enfermedad de base.	Menor morbimortalidad relacionada con el procedimiento.

Tabla 2. Clasificación de TCPH según la relación genética donante-receptor.

En el trasplante autólogo, las CPH son obtenidas del propio paciente. En el trasplante singénico, un gemelo idéntico es el donador, que se comporta inmunológicamente como un trasplante autólogo.

Las posibles causas de fracaso para obtener las CPH autólogas pueden estar relacionadas con la edad (a mayor edad, mayor riesgo), el tipo de enfermedad (en estadios avanzados y con fibrosis medular), la intensidad de tratamientos de quimioterapia combinada previos, ciertos medicamentos de quimioterapia (alquilantes, lenalidomida) y/o radioterapia previa.

c) Por la intensidad de acondicionamiento.

Para que el TCPH pueda ser exitoso se debe erradicar la enfermedad residual y el sistema inmune para que no exista rechazo, el medio para lograr este efecto es a través de la combinación de medicamentos citotóxicos, inmunosupresores y/o con radioterapia en distintas modalidades, a lo cual se denomina el régimen de acondicionamiento.

Según la intensidad de acondicionamiento.	
Trasplante mieloablatoivo.	Basado en la administración de un tratamiento citotóxico combinado en dosis altas y con o sin radioterapia intensiva.
Trasplante de intensidad reducida.	Administración de un tratamiento de acondicionamiento menos intensivo, beneficiando a pacientes que por su estado general o edad, no tolerarían un acondicionamiento convencional.

Tabla 3. Clasificación de TCPH según la intensidad de acondicionamiento

Con respecto a su efectividad y en términos generales, si se comparan ambos procedimientos, se puede concluir que:

- El TPH Mieloablatoivo tiene mayor efecto antitumoral, sin perder el efecto inmunosupresor, a expensas de más toxicidad y riesgo de mortalidad. Es el modelo clásico de Alo-TPH.
- El TPH No mieloablatoivo tiene un efecto principalmente inmunosupresor que favorece el efecto injerto contra tumor, con menor perfil tóxico, a expensas de un mayor riesgo de recaída de la enfermedad de base (3).

Por lo tanto, el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas tiene un propósito curativo si se cumplen los siguientes objetivos:

- a) Sustituir la hematopoyesis del paciente total o parcialmente cuando ésta es defectuosa, insuficiente o neoplásica (24).
- b) Permitir un tratamiento antineoplásico con dosis muy elevadas de agentes quimioterapéuticos que originan inmunosupresión prolongada y definitiva (24).
- c) En el trasplante alogénico, generar un nuevo sistema inmune a partir del donador, que puede provocar una acción antitumoral “reacción injerto contra leucemia”

Este es el fundamento por el que ciertos tumores precisan para su curación un tratamiento de mayor intensidad que produce mieloablación, la infusión de CPH restablece la hematopoyesis lo que previene la muerte. En trasplante alogénico, las CPH de un donante sano son capaces de contribuir al efecto antitumoral, sobre todo en situación de enfermedad mínima residual de tipo mieloide (3). Este efecto

se conoce como reacción del injerto contra tumor, comprobado en leucemia aguda.

Con base a estas propiedades, se muestran a continuación las recomendaciones establecidas de TCPH, realizando la selección del origen de las células, tipo de trasplante y de régimen de acondicionamiento, conforme a la combinación de los factores de riesgo que tiene cada enfermo, en el momento del trasplante. Los factores relevantes a considerar son la edad, el estadio de la enfermedad, la sensibilidad o resistencia a quimio-radioterapia y las infecciones previas que ha tenido el receptor. En trasplante alogénico, la combinación de donador receptor de distinto género, de mujer a hombre (3,24).

2. Indicaciones para el TCPH

ALOGÉNICO	AUTÓLOGO
<p>Involucra la sustitución de todas las células del organismo derivadas de la célula madre pluripotencial hematopoyética, por lo que su empleo se sugiere cuando la enfermedad se origina en una de estas células y sea capaz de curar si se sustituyen por otras sanas.</p>	<p>Tratamiento elegido cuando la toxicidad medular es el principal factor limitante para un tratamiento intensivo. Tiene el riesgo de administrar células neoplásicas residuales en el injerto de médula ósea y/o sangre periférica.</p>
<p>Neoplasias hematológicas: Leucemia aguda mieloblástica y linfoblástica, leucemia mielóide crónica y otros síndromes mieloproliferativos, enfermedad de Hodgkin y linfomas no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica y otras enfermedades linfoproliferativas crónicas, mieloma múltiple y síndromes mielodisplásicos.</p>	<p>Enfermedades sin afección medular: Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin y tumores sólidos.</p> <p>Enfermedades autoinmunitarias resistentes a los tratamientos convencionales: esclerosis múltiple, esclerosis sistémica, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide.</p>
<p>Hipoplasias medulares: Aplasia medular grave y hemoglobinuria paroxística nocturna.</p>	<p>Para intensificar el tratamiento en pacientes con leucemia aguda mieloblástica o linfoblástica, mieloma múltiple, leucemia linfática crónica u otras enfermedades linfoproliferativas crónicas, que carecen de donante compatible, o en los que el TCPH alogénico supone una toxicidad no aceptable.</p>
<p>Inmunodeficiencias (diversos tipos)</p>	<p>Amiloidosis primaria</p>
<p>Hemopatías congénitas: Talasemia, síndrome de Wiskott-Aldrich y anemia de Fanconi, entre otras.</p>	<p>Enfermedad de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, banda monoclonal y alteraciones cutáneas).</p>
<p>Otras enfermedades congénitas que afectan a la médula ósea: Enfermedad de Gaucher, osteopetrosis, mucopolisacaridosis y diversos trastornos lisosómicos.</p>	

Tabla 4. Indicaciones del TCPH por patología (Carreras et al., 2007).

3. Estándares de Calidad Internacionales y Normatividad Nacional

Diversas organizaciones internacionales, han surgido para promover y mejorar la calidad en la aplicación de la terapia celular, con el fin primordial de mantener la seguridad del paciente (7). En México, aunque no existen normas específicas para el uso de progenitores hematopoyéticos, se recomienda seguir el marco normativo de los Estándares Internacionales de Terapia Celular y se respalda con las Normas Oficiales relacionadas al proceso general, que aplica, en México, las cuales se mencionan a continuación.

Normatividad nacional		
NORMA Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012,	Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.	Establece las actividades, criterios, estrategias y técnicas operativas del Sistema Nacional de Salud, en relación con la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. La regulación de los hemoderivados, tales como la albúmina, las inmunoglobulinas, los concentrados de factores de coagulación, entre otros, obtenidos mediante procedimientos fisicoquímicos o biológicos, serán materia de otras disposiciones.
NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-168-SSA1-1998	Del expediente clínico	Sistematizar, homogeneizar y actualizar el manejo del expediente clínico que contiene los registros de los elementos técnicos esenciales para el estudio racional y la solución de los problemas de salud del usuario, involucrando acciones preventivas, curativas y rehabilitatorias y que se constituye como una herramienta de obligatoriedad para los sectores público, social y privado del Sistema Nacional de Salud.
NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002	Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.	Establece la clasificación de los residuos peligrosos biológico-infecciosos, así como las especificaciones para su manejo.

Tabla 5. Normatividad nacional relacionada al TCPH

Normatividad internacional		
Organismo	Función	Aporte en la regulación
Asociación Americana para Bancos de Sangre (AABB)	Organización internacional que desarrolla y ejecuta programas de normalización, acreditación y educativos para bancos de sangre y productos de terapia celular.	Cuenta con estándares que describen los requisitos mínimos aceptables para las instalaciones que prestan servicios de recolección, procesamiento, análisis, distribución y administración de sangre y sus componentes, células progenitoras hematopoyéticas y cordón umbilical.
Comité de Acreditación en Transfusión sanguínea (CAT)	Sistema de gestión para garantizar procesos transfusionales seguros y de calidad en el ámbito sanitario. Constituido por la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) y la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea y Terapia Celular (SETS).	Estándares de aplicación a las unidades donde se lleven a cabo actividades de obtención, procesamiento y/o almacenamiento de células progenitoras hematopoyéticas y productos celulares para su aplicación clínica en trasplante de progenitores hematopoyéticos.
Fundación para la Acreditación de Terapia Celular-Comité Conjunto de Acreditación de Terapia Celular y Grupo Europeo para trasplante de sangre y médula ósea). FACT-JACIE	Establece estándares para la alta calidad médica y prácticas del laboratorio en terapia celular, con el propósito de una inspección y acreditación voluntaria.	Los estándares aplican a todas las fases de colección, procesamiento, almacenamiento y administración de productos de terapia celular, incluyendo varias manipulaciones tales como la eliminación o el enriquecimiento de diversas poblaciones de células, la expansión de poblaciones de células hematopoyéticas, y la criopreservación.
Federación Europea de Inmunogenética (EFI)	Estándares para pruebas de histocompatibilidad	Acreditar y validar los procesos y las técnicas que se llevan a cabo en un laboratorio de histocompatibilidad, además de asegurar unos altos estándares de calidad y fiabilidad a los laboratorios que han sido acreditados y de otorgarles la posibilidad de intercambiar los resultados con países del todo el mundo.
ISO 9001:2008	Especifica requisitos para un Sistema de gestión de la calidad que pueden utilizarse para su aplicación interna.	Promueve la adopción de un enfoque basado en procesos cuando se desarrolla, implementa y mejora la eficacia de un sistema de gestión de la calidad, para aumentar la satisfacción del cliente mediante el cumplimiento de sus requisitos; sin importar si el producto o servicio lo brinda una organización pública o empresa privada, cualquiera sea su tamaño, para su certificación o con fines contractuales.
Colegio de Patólogos Americanos (CAP)	Institución de control externo de calidad.	Principal y más grande organización certificada y acreditada para evaluar la práctica en Patología, Medicina y Laboratorio Clínico.

Tabla 6. Normatividad Internacional para la calidad en el TCPH

4. Proceso del TCPH

a) Selección del paciente para trasplante

El equipo médico revisa el historial del paciente (pruebas diagnósticas, factores de riesgo, tratamiento recibido completo y la respuesta que tuvo a este, historia médica personal y familiar, así como evaluación psicológica y socioeconómica). Se solicita información sobre donadores potenciales, de preferencia hermanos de los mismos padres, aunque se pueden considerar hijos, padres y primos hermanos (12). Es importante, conocer si los posibles donadores padecen enfermedades infecto-contagiosas, o padecimientos crónicos graves o avanzados, que les impidan donar como padecimientos cardiacos o antecedentes oncológicos.

Los pacientes son informados sobre el proceso de trasplante y el método de recolección e infusión de las CPH. En esta visita se habla también de las complicaciones potenciales del procedimiento, como la toxicidad, infecciones, EICH, sus riesgos y consecuencias.

Si se encuentra un candidato a donar viable, se procede a realizar las pruebas de histocompatibilidad entre donador y receptor.

b) Pruebas de histocompatibilidad

Aproximadamente el 25% de los pacientes que requieren TCPH cuentan con un hermano HLA idéntico que puede ser donador. Los avances en el campo de la inmunogenética junto con el crecimiento del registro de donadores voluntarios y los BSCU han incrementado la oportunidad de tener un donador compatible, no relacionado (familiar), para más del 60% de los enfermos (21). La aplicación de

metodologías basadas en el análisis de ADN a la selección de donadores no relacionados (DNRs) para el TCPH ha contribuido a aumentar la supervivencia de los pacientes trasplantados, debido a la mejor comprensión de los fenómenos de aloreactividad en el trasplante y a los medios para controlar sus consecuencias (26).

El criterio de selección de DNRs está basado en la tipificación por alta resolución de alelos HLA clase I (A,B,C) y clase II (DRB1, DQB1) y busca la coincidencia entre antígenos de cada alelo. La coincidencia de los alelos en los 5 locus (correspondencia "10/10") supone menor riesgo de EICH aguda severa y de mortalidad, y se asocia a mayor supervivencia libre de enfermedad comparado con el trasplante de donadores no coincidentes (21, 26).

Cuando solamente se disponen de donadores no coincidentes conocer el locus específico ayuda a seleccionar al donador. De todos los genes clásicos de HLA, la no coincidencia entre HLA-DQB1 puede ser la más permisible. Los resultados del TCPH con coincidencia "8-8" (HLA-A,B,C y DRB1) son parecidos a los de un trasplante 10/10, lo que sugiere que en caso de no tener un donador con coincidencia total, se puede usar uno que no coincida con DQB1 (12, 24).

La mortalidad relacionada al trasplante, es un riesgo de la no coincidencia entre HLA-A, C y DRB1. Así mismo, es conveniente en TCPH de DNR considerar el alelo clase II DPB1, ya que la no coincidencia con HLA-DPB1 está asociada a rechazo del injerto y a EICH. Por ello algunos investigadores sugieren emplear los

6 haplotipos para la correcta identificación del DNR, para basar la selección en la identidad en 12/12 alelos (12, 21).

El disponer de familiares relacionados, es la mejor alternativa para elegir un donador relacionado (DR). Los hermanos comparten un haplotipo materno y paterno, que puede ser heredado al azar por el enfermo y su hermano, lo que significa tener un donador compatible. En ciertas ocasiones, existen antígenos maternos no heredados (NIMA), que son antígenos de los haplotipos no compartidos. El trasplante de madre a hijo se asocia con un bajo riesgo de EICH (aguda y crónica) y de mortalidad, indicando que hay supresión específica del donante en las respuestas de células T contra NIMAs. En contraste, el trasplante de padre a hijo se asocia con un mayor riesgo de EICH, mostrando un efecto de inmunización de antígenos paternos. La experiencia clínica proporciona un medio para optimizar los resultados del trasplante a través de la selección preferencial de los miembros de la familia que heredan haplotipos codificantes de NIMAs, este tipo de trasplantes se denomina haploidéntico y puede ser una opción inmediata cuando no se dispone de otro tipo de donador (21, 26).

El estándar actual para la selección de histocompatibilidad de unidades de SCU consiste en la determinación de antígenos HLA A, B, C y DQ por mediana resolución (2 dígitos) y DRB1 por alta resolución (4 dígitos). Bajo esta evaluación, la gran mayoría de los trasplantes de sangre de cordón umbilical (TSCU) han sido realizados utilizando unidades con relación de histocompatibilidad de 6/6, 5/6, o 4/6. La tolerancia de una no coincidencia (mismatch) más alto en el TSCU, comparado con el de células de MO y SPm se atribuye a la menor presencia de

células T maduras en la sangre de cordón umbilical y su menor capacidad de participar en respuesta a células Th1. A pesar de la incompatibilidad HLA el riesgo de EICH aguda puede ser menor después en un TSCU comparado con un TCPH de un donador no relacionado, incluso la EICH posterior a un TSCU suele ser más sensible a la terapia correspondiente (21).

La mayor limitante del TSCU, particularmente en adultos, ha sido la baja dosis de células disponible, en relación al peso del paciente; dosis bajas se relacionan no solamente con un injerto lento y con menor supervivencia, sino también con menor probabilidad de lograr el injerto a largo plazo.

c) **Recolección (Obtención) de CPH**

La seguridad del donador inicia en su selección, los cuidados de la movilización (cuando es el caso de sangre periférica) y durante la recolección de CPH, así como la vigilancia a mediano y largo plazo, de las intervenciones. De manera específica conocer el estado de inmunidad y las infecciones latentes o presentes. La dosis óptima de CPH para un trasplante requiere de su caracterización, que depende del sitio de obtención de CPH y la técnica utilizada en el procedimiento de recolección. El conocimiento de las condiciones que influyen en la dosis permite optimizar la obtención, evitando al mismo tiempo las variables posibles que podrían comprometer la seguridad del donante (11). Este conocimiento determina los métodos de preparación del producto en el laboratorio de terapia celular o los procedimientos de selección apropiados para situaciones particulares del paciente y su receptor, como en el caso de incompatibilidad al sistema ABO, para depleción de plasma y de eritrocitos, o en el caso de purificación de células

CD34+ e incluso la selección negativa de células tumorales, o depleción de células T, situación que permite alcanzar la dosis y pureza óptima de las CPH a trasplantar (6).

Las CPH están presentes de forma natural en la sangre de cordón umbilical, durante el nacimiento y en la médula ósea, de por vida. Estas pueden ser recolectadas a partir de estos sitios por punción o aspiración. También pueden ser movilizadas desde la médula ósea para ser conducidas a la sangre periférica en donde serán recogidas por aféresis, con el programa de células mononucleares que sea validado y eficiente.

La colección, el procesamiento y almacenamiento de las CPH obedecen a las guías de buenas prácticas de manufactura, incluidos en las recomendaciones desde 2004, del programa de inspección y acreditación (el Comité Conjunto de Acreditación de la ISCT y EBMT o JACIE) para la mejora de la calidad en los diferentes equipos que participan en los trasplantes hematopoyéticos, definidos como (30):

- Colección de médula ósea

Se hace después de que el donante ha sido seleccionado, apto y su consentimiento informado esté firmado. Bajo excepciones ligadas a problemas de disponibilidad o de complicaciones en el receptor, la fecha de colección coincide con la fecha del trasplante. Esto permite no tener que congelar y perder CPHs durante el proceso de congelación/descongelación, ya que puede haber pérdidas hasta del 20% (28,29).

El aspirado de médula ósea se lleva a cabo en la sala de operaciones; se toma de las crestas ilíacas posteriores mediante el uso de agujas largas especiales y comprende múltiples punciones para la aspiración de la médula ósea en distintos sitios del hueso iliaco. De cada aspirado se extrae de 4 a 5 ml de médula ósea y, para lograr una colección eficiente, el operador debe cambiar la posición de la aguja antes de cada aspirado. La asistencia técnica es necesaria para cosechar la médula ósea en jeringas con heparina y hacer el recuento de células nucleadas totales (CNT) durante el procedimiento (3,4).

El volumen en cada jeringa se coloca en una bolsa adecuada de recolección que contiene mezcla de suero / solución salina isotónica y heparina como anticoagulante (3).

El volumen total de la médula recolectada varía de 400 a 1,200 ml. El volumen total que puede tomarse depende del peso del donante (entre 10 y 20 ml/kg). Durante la colección, el anestesiólogo debe vigilar el estado hemodinámico del donante y en su caso, realizar una reposición con sustancias coloides, para mantener la estabilidad hemodinámica del donador, documentada por su presión arterial y frecuencia cardíaca. La cantidad de células necesarias para lograr la eficacia del trasplante de médula ósea es $2-3 \times 10^8$ CMN/Kg (10,11).

- Colección de sangre periférica movilizada.

La recolección de CPH de sangre periférica se puede hacer en un paciente para realizar un auto-trasplante o de un donante sano para hacer un alotrasplante (30).

La obtención de CPH periféricas ha reemplazado al de médula ósea en algunos casos, debido a que estas células reducen significativamente la duración de la aplasia y el número de transfusiones de plaquetas. El proceso de colección puede realizarse por aféresis, después de una aplasia por quimioterapia o por estimulación de la médula ósea con factores de crecimiento de granulocito (G-CSF). El desarrollo de nuevos tratamientos como el plerixafor, para cortar los vínculos entre las CPHs y las moléculas de adhesión de su microambiente en la médula ósea, mejora la eficacia de la movilización de éstas, ayudando a realizar una optimización de las dosis de CPH disponibles, que facilitan los injertos en casi todos los pacientes que lo requieran, incluyendo aquellos con factores de riesgo para fracaso en la movilización (3, 4,11).

La colección de CPH periféricas de donantes sanos se realiza después de la verificación de la ausencia de enfermedades infecto-contagiosas transmisibles, contraindicaciones para el uso de factores de crecimiento hematopoyéticos o impedimentos para realizar la aféresis ya que puede ser necesario un catéter venoso central. Se administran factores de crecimiento (G-CSF) en dosis de 10 µg/kg por día, por vía subcutánea durante cinco días, seguido de la recolección de CMN por aféresis. La colección se realiza en el momento en el que el número de células CD34+ circulantes es mayor de 20/µL en sangre periférica (4,29).

La aféresis consiste en separar los diferentes componentes de la sangre, con base a las diferencias en el tamaño, peso y las propiedades de sedimentación y retirar la capa de células mononucleares, dentro de las que se encuentran las CPH. Por lo general, se recomienda como dosis de movilización, tres volúmenes de sangre

para procesar y la cantidad de células progenitoras hematopoyéticas periféricas recogidas depende de su cantidad en la sangre periférica. Algunos equipos manejan más de tres volúmenes de sangre en un intento de recoger una mayor cantidad de células (24,28).

Existen sistemas automatizados y manuales, que ayudan a la verificación de los parámetros visuales empleados para recoger la capa correcta de CMN y optimizar la cantidad de CPH colectadas. Al final, se extrae un volumen de 200 ml de sangre periférica concentrada de CMN, la eficiencia de las máquinas suele ser del 50 a 70%. El número de CPH necesarias para alcanzar el injerto es por lo general mayor de 3×10^6 células CD34+/kg. El número de CPH necesarias para lograr un alo-injerto suele ser mayor de 5×10^6 células CD34+/ kg de peso del receptor (11,25).

En un donante sano, se pueden llevar a cabo de dos a tres sesiones de leucoaféresis, para lograr la dosis óptima de trasplante. En donantes autólogos, no existe un número máximo de aféresis, dependen de la dosis óptima colectada que puede requerir hasta tres sesiones, a intervalos cada dos a tres semanas (4).

d) Obtención de CPH de cordón umbilical a través de bancos de cordón.

Desde 1988, la sangre de cordón umbilical (SCU) ha sido utilizada como fuente de CPH para el trasplante hematopoyético alogénico. En 1991, el primer banco público de SCU se estableció en Nueva York y en 1993 se realizó el primer trasplante no relacionado de CPH provenientes de SCU. Desde entonces más de 500,000 unidades de SCU de donaciones altruistas, anónimas y gratuitas han

resultado en más de 25,000 trasplantes de SCU (TSCU) alrededor de mundo. La mayoría de los bancos participan a través de registros internacionales que enlistan, de manera pública la SCU almacenada con que cuentan; organismos como Donadores Mundiales de Médula Ósea (BMDW), la fundación Netcord y el Programa Nacional de Donadores de Médula (NMDP), entre otros registros internacionales, proporcionan acceso a todos los donadores disponibles, con que se dispone (5).

- **NETCORD (43)**

Es una organización internacional sin fines de lucro de BSCU, cuyos miembros figuran dentro de la fuente más grande de donantes de sangre de cordón de alta calidad, para los pacientes que necesitan un trasplante de CPH. Fundada en 1997, NETCORD tiene actualmente cerca de 35 bancos miembros y registros con un inventario que supera las 211,000 unidades, lo que representa alrededor del 51 % del suministro mundial de SCU en bancos públicos. Los bancos de NETCORD han proporcionado más de 10,434 unidades de sangre de cordón umbilical para el trasplante en adultos y niños.

Para garantizar una alta y uniforme calidad de todas las unidades de sangre de cordón, comenzó en 1999 una colaboración con la Fundación para la Acreditación de Terapia Celular (FACT). Juntos, en el año 2000, publicaron las primeras normas internacionales NETCORD-FACT para la colección de sangre de cordón, producción, pruebas, almacén, selección y entrega. Las nuevas ediciones de las normas se actualizan y publican a intervalos de aproximadamente tres años para

mantenerse al tanto de los últimos avances y conocimientos sobre el tema para mantener los estándares y requisitos de un BSCU de alta calidad.

Mantiene una oficina virtual para la búsqueda en línea y obtención de células compatibles, situado en **www.netcord.eu**, esto permite a los centros y coordinadores de trasplantes buscar, sin costo, en el inventario completo de los bancos miembros, y así encontrar las unidades compatibles disponibles.

La Oficina Virtual ofrece información sobre la tipificación HLA de alta resolución, la dosis de células colectadas, la viabilidad y el recuento celular de CD34+. Al presentar una solicitud de búsqueda de la Oficina Virtual, los centros de trasplante no tienen que buscar en bases de datos individuales de varios BSCU, ya que pueden recibir un solo informe de búsqueda unificada de todas las unidades que están disponibles en los bancos miembros de NETCORD; esta información ayuda a prevenir los conflictos de asignación. La recopilación y análisis de datos de los resultados clínicos y el tratamiento se coordinan con Eurocord y el Registro del Centro Internacional e Investigación de Trasplante de Médula (CIBMTR).

e) Procesamiento de CPH

- **Concentración del producto y reducción de plasma**

Un gran volumen de aféresis contiene una suspensión de células mononucleares, enriquecidas de células progenitoras hematopoyéticas, dentro de una solución de plasma mezclada con anticoagulante (13). El volumen del producto de aféresis puede exceder los 300 ml y se requiere reducirlo para concentrar las células antes de la criopreservación y/o la infusión del producto celular.

- **Criopreservación**

El proceso de criopreservación es de importancia para todos los tipos de recolección de CPH, pero tal vez es particularmente crítico para la SCU, que es obtenida en el momento del nacimiento y se utiliza en un período de tiempo indeterminado.

- **Temperatura**

Las temperaturas utilizadas para la criopresevación de CPH a lo largo de los últimos quince años han sido -196 , -156 , o - 80°C , para el almacenamiento en nitrógeno en fase líquida, vapor y de los congeladores de criopreservación, respectivamente (2).

- **Tasa de congelación**

La técnica controlada de congelación se considera estándar en el proceso, debido a que la liberación de calor en el punto de transición (eutéctico), alrededor de 4°C, se considera perjudicial para la población de células progenitoras. En este punto, las moléculas de agua dentro de la unidad son congeladas en un orden molecular preciso, lo que resulta en la liberación termodinámica de calor de fusión.

En la velocidad de congelación controlada, las células progenitoras concentradas se congelan a una velocidad de 1-2°C/min hasta un punto de temperatura de aproximadamente -40°C. Entonces, el proceso de congelación baja hasta un punto de -120 °C y se lleva a cabo a un ritmo más rápido, alrededor de 3-5 °C/min, lo que lo hace un procedimiento lento. Por otro lado, el uso de velocidades de congelación no controladas en las que el producto se enfría primero a -4 °C y

luego se deposita directamente en un congelador a -80 °C o se pone directamente en nitrógeno líquido, por lo que la criopreservación es más rápida pero compromete totalmente la calidad de las CPH (2).

- **Duración**

La durabilidad real, definido como el tiempo en que las CPH pueden ser preservadas conservando sus características y viabilidad, todavía no está bien definida.

Se han realizado varios ensayos para estimar la capacidad reconstituyente hematopoyética funcional de los productos al descongelarse. Kobylka y Mugishima demostraron la durabilidad después de 12 y 15 años, con citometría de flujo y ensayos clonogénicos, respectivamente. Broxmeyer y colaboradores llevaron a cabo una evaluación a largo plazo de las unidades de SCU, obteniendo una durabilidad de hasta 15 años, la cual se estableció mediante la reconstitución hematopoyética en ratones NOD/SCID. Se han documentado estudios preclínicos con éxito de injerto trilineaje en células de MO, almacenadas durante 7 años (2).

- **Concentración celular**

La infusión de las células criopreservadas se ha asociado con diversos efectos tóxicos, los cuales fueron parcialmente atribuibles al volumen total y los criopreservantes en la solución.

En el pasado existió preocupación por una alta concentración de células en el criopreservante que pudiera resultar en toxicidad para las células. Por lo tanto, se propuso una concentración inicial de células criopreservadas no mayor a 2×10^{-7}

CMN/mL. El cual resultaría en un volumen aproximado de criopreservación de 7 L por paciente. El espacio de almacenamiento necesario y la mano de obra para lavar el injerto antes de la infusión serían inmensos.

Después se encontraron modelos murinos iniciales seguros y se estableció que altas concentraciones de células de $5-6 \times 10^8$ células/ml en el criopreservante son bien toleradas, y no se asocian con efectos adversos significativos a las células, dando lugar a buenos resultados clínicos (2).

- **Criopreservantes**

Son aditivos necesarios para contener los concentrados de células, ya que inhiben la formación de cristales intra y extracelulares y por lo tanto la muerte celular. El criopreservante estándar es el dimetilsulfoxido (DMSO), que evita daños por congelación a las células vivas. Por lo general se usa en concentraciones al 10%, combinadas con solución salina normal y albúmina sérica, para considerarlo un agente seguro y no tóxico para las CPH. Para mejorar el efecto de la criopreservación, ha sido empleada exitosamente la combinación de DMSO y el criopreservante extracelular hidroxietilalmidón, sobre todo en células provenientes de cordón umbilical (2).

El DMSO se asocia con un perfil de efecto secundario clínicamente significativo, que incluye náuseas, vómitos y calambres abdominales en aproximadamente la mitad de los casos. Otros efectos secundarios abarcan complicaciones cardiovasculares, respiratorios, del sistema nervioso central, renales, hemolíticos y hepatotóxicos. Incluso se han reportado muertes atribuidas a toxicidad por DMSO.

Métodos de conservación alternativos son el propilenglicol, una combinación de alfa-tocoferol, catalasa, y ácido ascórbico y la trehalosa dímero de glucosa como crioprotector intra y extracelular, pero son poco utilizados (2).

La adición del inhibidor de caspasa zVAD-FMK como criopreservante fue sugerida después de que estudios pre-clínicos propusieran que la activación de las caspasas, particularmente durante el proceso de descongelación, puede inducir la apoptosis y por lo tanto contribuir a un crio-daño a los injertos trasplantados (2).

- **Descongelación**

Se han propuesto varias técnicas para el procedimiento de descongelación, pero el método considerado estándar es cuando el producto se mantiene en un baño de agua a 37 ° C hasta que los cristales de hielo desaparecen (2).

- **Procedimiento de lavado**

Para obtener las células progenitoras de cordón, sangre periférica y de médula ósea, es necesario un proceso estándar de lavado del criopreservante después de la descongelación, debido a que se asume que el DMSO puede tener efecto tóxico sobre las CPH. El lavado del criopreservante tiene beneficios para el paciente trasplantado, como la reducción de la toxicidad, ya que el grado de toxicidad del DMSO es proporcional a su cantidad en la solución de células infundida. También se ha sugerido que lavar de DMSO puede mejorar el injerto (28).

El protocolo estándar de lavado sigue al protocolo del Centro de Sangre de Nueva York, en el que la dilución de la unidad de CPH descongelada con 2,5% de albúmina sérica humana y 5% de dextran 40 es seguido por centrifugación a 10 °C

durante 10 min. El sobrenadante se retira y se añade nuevamente albúmina y solución de dextran, dos veces a una concentración final de DMSO menor a 1.7%. La solución lavada se infunde tan pronto como sea posible. Aunque este procedimiento ha sido establecido por ser seguro y estar asociado con una recuperación razonable de células progenitoras, también requiere de una labor muy intensa y no está libre de pérdida de células (2,28).

Es posible también usar dispositivos automatizados de lavado de células, método más empleado en la actualidad.

D. RECOMENDACIONES PARA EL EMPLEO DE TCPH

En 1999, la Sociedad Americana para el Trasplante de Sangre y Médula Ósea (ASBMT) inició el desarrollo de revisiones sistemáticas basadas en evidencia y declaraciones sobre la efectividad del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas autólogo o alogénico, para enfermedades específicas. A partir del 2009, la ASBMT determinó que estas revisiones deberían actualizarse cada 5 años. Las siguientes recomendaciones son el resultado de las revisiones realizadas hasta el 2013.

- **En leucemias linfocíticas agudas (LLA) en adultos**

El TCPH alogénico mieloablativo es un tratamiento apropiado para adultos mayores de 35 años en primera remisión completa para todos los grupos de riesgo de la enfermedad. El acondicionamiento de intensidad reducida puede producir resultados similares a los regímenes mieloablativos. El TCPH alogénico es

recomendado sobre la quimioterapia en LLA a partir de la segunda remisión, e incluso en esta etapa es mejor opción que el autólogo; los resultados de supervivencia después de un TCPH alogénico relacionado o no relacionado, son similares. En ausencia de un donador alogénico adecuado, el TCPH autólogo puede ser una terapia apropiada pero da lugar a una alta tasa de recaída; es apropiado considerar el trasplante de células de cordón umbilical para pacientes sin donadores HLA compatible; la terapia con Imatinib antes o después del TCPH (para una LLA relacionada con el cromosoma Philadelphia) produce resultados de supervivencia superiores (14)

- **En LLA en niños**

Comparado con la quimioterapia después de la primera remisión, el TCPH demuestra beneficios solamente en los trasplantes alogénicos relacionados cuando la LLA es de alto de riesgo; se recomienda para enfermos con riesgo estándar o en riesgo alto (fracaso de la inducción, hipodiploidia). En segunda remisión, tanto el trasplante alogénico relacionado como la quimioterapia son recomendados. En cuanto al trasplante autólogo purgado, en la mayoría de los pacientes que presentan recaída tardías, se logra tener supervivencia libre de leucemia, al igual que ocurren en el trasplante alogénico relacionado y no relacionado. El régimen de acondicionamiento con irradiación corporal total presenta mejores resultados que regímenes que se basan solo en quimioterapia (9).

- **En leucemia mieloide aguda en adultos**

En primera remisión, el trasplante autólogo frente a la quimioterapia no presenta ventaja significativa; pero el trasplante alogénico tiene mayor supervivencia en pacientes menores de 55 años con alto riesgo citogenético. En segunda remisión completa se recomienda un alotrasplante si hay donador disponible, de lo contrario se puede recurrir al trasplante autólogo. El trasplante alogénico es recomendado sobre el autólogo si se cuenta con un donador relacionado compatible. El trasplante autólogo de células de sangre periférica movilizada es recomendado debido a la mejora en la seguridad y en la mortalidad temprana. Los trasplantes alogénicos relacionados y no relacionados pueden proporcionar resultados equivalentes. Para enfermedades de alto riesgo el alotrasplante de células de sangre periférica movilizada se recomienda más que el de células de médula ósea; en enfermedades de bajo riesgo el resultado es el mismo (15).

- **En leucemia mieloide aguda en niños**

En primera remisión completa, tanto la quimioterapia como el trasplante autólogo presentan resultados semejantes. Sin embargo, el TCPH alogénico tiene mejores resultados en cuanto a supervivencia global y supervivencia libre de leucemia: se recomienda también en segunda recaída. El trasplante alogénico de donador compatible relacionado tiene mayor tasa de supervivencia que el autólogo después de la primera remisión; y se recomienda usar médula ósea como fuente de CPH. En segunda remisión se recomienda el trasplante alogénico de donador compatible relacionado o no (17).

- **En Linfoma Folicular**

El trasplante autólogo de CPH es considerado como terapia de rescate basado en previa administración de rituximab, con una mejora significativa de supervivencia global y supervivencia libre de progresión. El trasplante autólogo no es recomendado como tratamiento de primera línea para la mayoría de los pacientes debido a que no presenta mejora significativa en la supervivencia global. Este trasplante también se recomienda para pacientes con linfoma folicular en transformación; el acondicionamiento de intensidad reducida antes del TCPH alogénico parece ser una alternativa aceptable para un régimen mieloablatoivo. Un donador HLA compatible no relacionado es tan efectivo como un donador relacionado en el acondicionamiento de intensidad reducida en el alotrasplante (16).

- **En mieloma múltiple**

EL TCPH autólogo es preferido como terapia de “novo” sobre la quimioterapia estándar e incluso que, como tratamiento de rescate. Se prefiere el uso de sangre movilizada como fuente de CPH que el de médula ósea. Como régimen de acondicionamiento en el autotrasplante se prefiere al melfalán que al melfalán con irradiación corporal total. El TCPH puede no ser efectivo con las técnicas de purga actuales de médula ósea (8).

- **En síndromes mielodisplásicos**

El TCPH temprano es recomendado para pacientes que se clasifican “de alto riesgo” en el Sistema Internacional de Puntaje Pronóstico (IPSS) y que cuentan con un donador adecuado; o bien, para pacientes con “riesgo bajo” “pronóstico

pobre” y riesgos no incluidos por el IPSS (edad avanzada, citopenias refractarias); incluso hay datos que demuestran mejores resultados curativos en el alotrasplante de CPH ya sea relacionado o no relacionado. Es recomendado usar un donador compatible de HLA si se cuenta con él; en caso de estar en remisión completa y no contar con donador alogénico se puede recurrir a un autotrasplante y considerarlo dentro de un ensayo clínico. Los resultados en el trasplante alogénico de células provenientes de SPm y MO, en pacientes de bajo riesgo, son semejantes. Para pacientes con riesgo alto, un trasplante alogénico relacionado de células provenientes de SPm puede presentar mayor supervivencia (18).

- **En linfoma difuso de células B grandes (LDCBG)**

El TCPH autólogo como terapia de rescate es recomendado para pacientes con recaída cuando el LDCBG es quimiosensible, no se recomienda para pacientes con respuesta parcial. Tampoco se recomienda como tratamiento de primera línea para ningún grupo de riesgo, por el Índice Internacional Pronóstico; los trasplantes autólogos en conjunto o en tandem no son recomendados. La SPm es la fuente estándar para obtener CPH en autotrasplantes. La edad no es una contraindicación para el trasplante autólogo, aunque los resultados en adultos mayores no son tan buenos como en adultos jóvenes (19).

E. EFECTIVIDAD DEL TCPH, con base a la tasa de supervivencia

En 1999, el Centro Internacional de Investigación en Trasplante de Sangre y Médula Ósea (CIBMTR) informó que la supervivencia a largo plazo en un TCH alogénico es superior a 2 años, con una esperanza a 5 años del 89% (27).

En 2011, Wingard y Colaboradores, informaron tasas de supervivencia a largo plazo, por tipo de enfermedad (Fig.1.), como resultado de un estudio de más de 10 años, en centros de trasplante registrados al rededor del mundo (27).

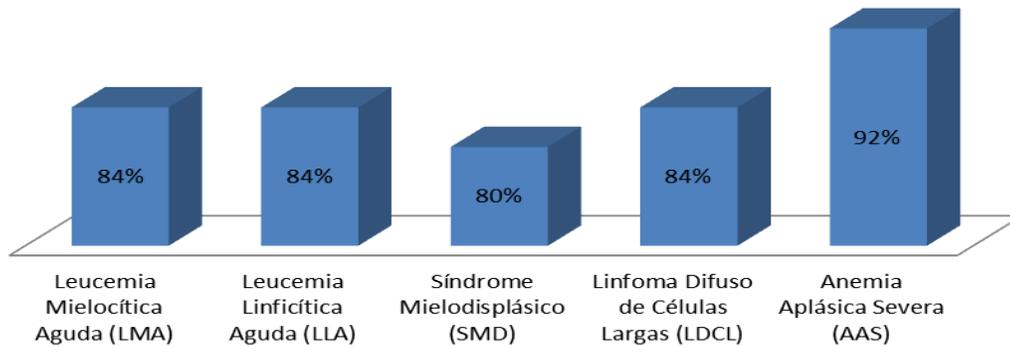


Fig. 1. Porcentaje de supervivencia, por enfermedad, a 10 años de un TCPH alogénico mieloablativo. (Wingard et al., 2012)

Los porcentajes reportados representan el resultado final de recaídas, recaídas no mortales y supervivencia libre de enfermedad (Fig.2.) en los pacientes a lo largo del estudio.

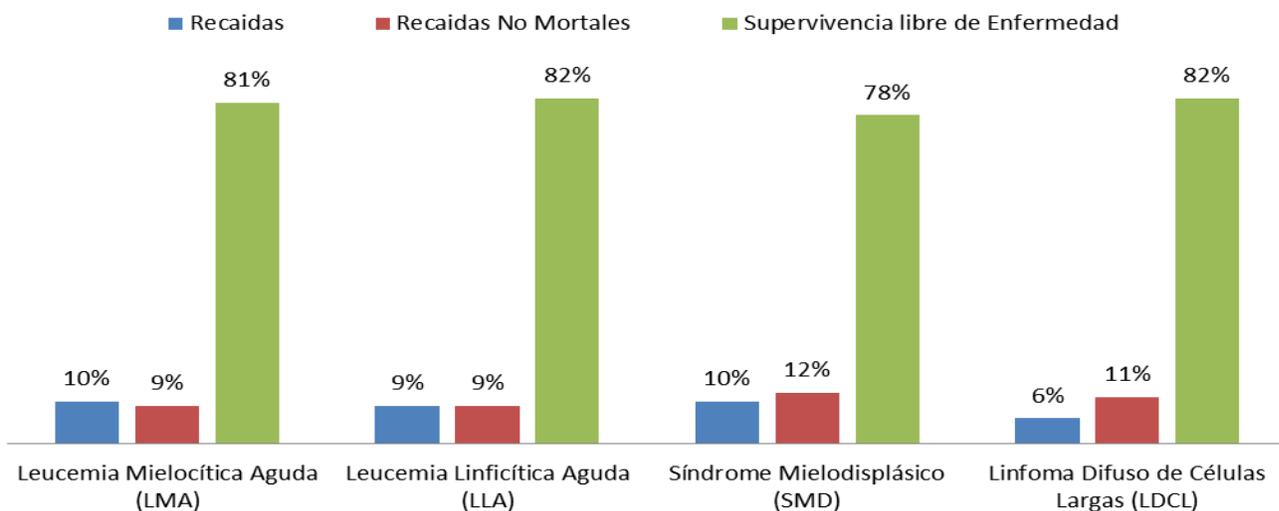


Fig.2. Porcentaje acumulado (por padecimiento) de recaídas, recaídas no mortales y supervivencia libre de enfermedad, presentes en los 10 años posteriores al TCPH (Wingard et al., 2012)

F. SITUACIÓN ACTUAL DEL TRASPLANTE DE CPH

Desde el inicio de los programas de trasplante, en los 50's, se ha observado un incremento en todos los tipos de trasplante de médula ósea, especialmente de donantes no emparentados. Este progreso se debe en gran medida a la disposición de más de 20 millones de donantes de médula ósea voluntarios de todo el mundo. Actualmente, los trasplantes de personas no emparentadas presentan el mismo éxito que aquellos que utilizan donantes familiares.

La intensa colaboración internacional ayuda a que este crecimiento sea posible. De hecho, los datos de la Asociación Mundial de Donantes de Médula Ósea (WMDA), junto con la Red Mundial para el Trasplante de Médula Ósea (WBMT), muestran que prácticamente la mitad de los trasplantes realizados con donantes no emparentados cruzan la frontera internacional. Los registros internacionales de donantes no solo amplían el número de posibles donantes, sino que ayudan al avance a nivel mundial de los trasplantes, beneficiándose del intercambio de información. En Enero del 2013, la WBMT realizó el trasplante de CPH número un millón; e informó que más de 50,000 pacientes alrededor del mundo son trasplantados anualmente y que en promedio, la distribución del millón de trasplantes fue la siguiente:

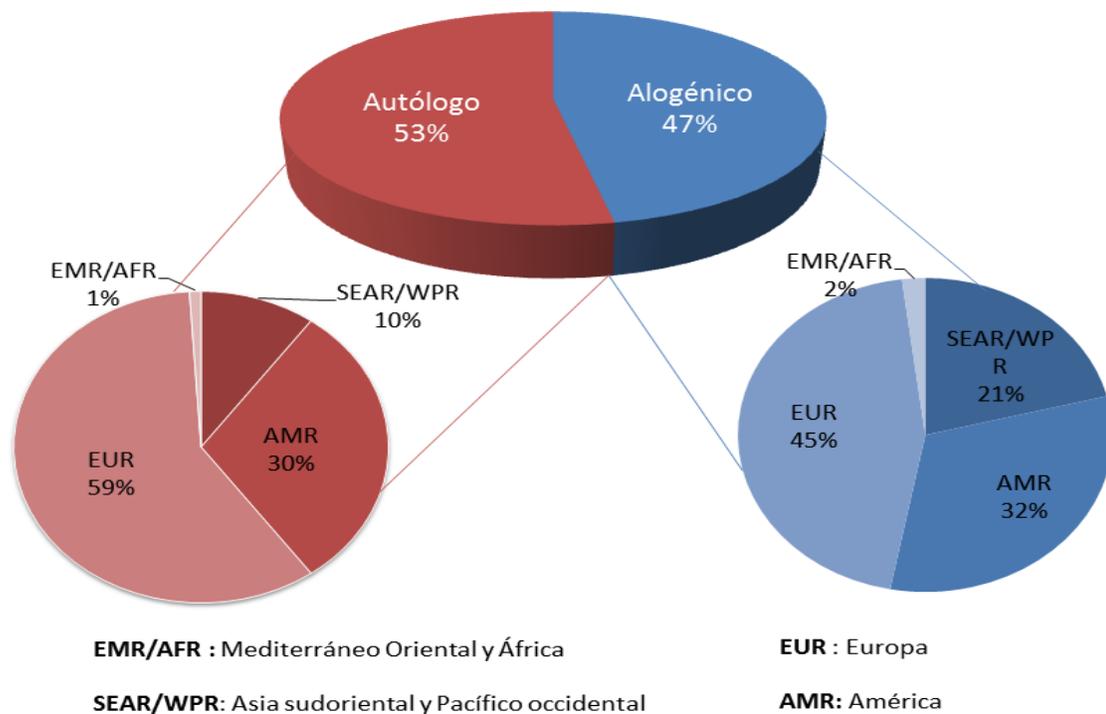


Fig. 3 Distribución del primer millón de TCPH (WBMT,2013)

Quedando la distribución final, en función las regiones establecidas por la OMS, como:

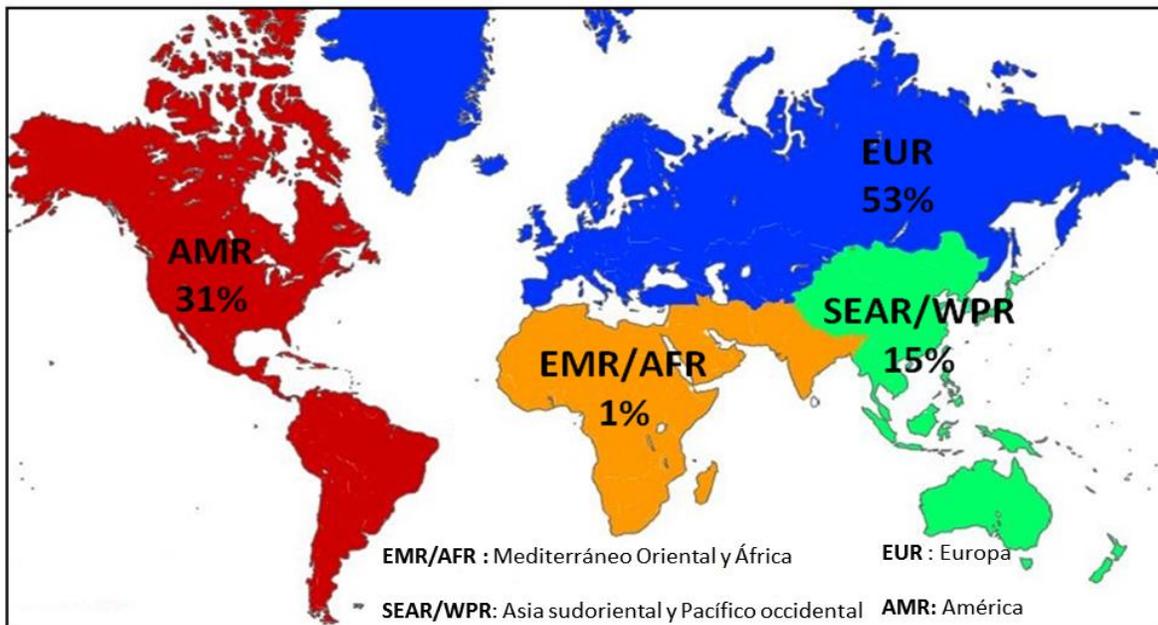


Fig. 4 Distribución, por regiones de la OMS, del primer millón de TCPH (WBMT,2013)

La Organización Mundial de la Salud ha reconocido el trasplante como un importante ejemplo de colaboración mundial, considerando a la WBMT como organización no gubernamental (ONG). Actualmente, se tratan con trasplante de médula ósea más de 70 tipos de cáncer y enfermedades no neoplásicas, ofreciendo nuevas alternativas de curación a pacientes de todo el mundo. En pacientes, con óptimas condiciones, las tasas de supervivencia esperada sin la enfermedad está superando el 90 por ciento (46,47).

G. EL TCPH EN MÉXICO

Los programas de TCPH en México, iniciaron a fines de los 70's, con una serie de casos y en una segunda etapa, reiniciaron su actividad a principios de los 90's (22). Instituciones públicas como el IMSS (Hospitales General y Especialidades de la Raza, Especialidades y Oncología del CMN Siglo XXI, H. Regional Gabriel Mancera), ISSSTE en el 20 de noviembre, INCan, INNZS, INP y HIM y privadas ofrecen esta opción terapéutica y se ha concentrado en las grandes Ciudades (DF, Monterrey, Puebla, Guadalajara principalmente) en hospitales de alta especialidad, con una actividad que varía de 10 a 50 trasplantes por año. Cada institución, dispone de recursos limitados tanto en insumos como de personal, por lo que los programas se han desarrollado de una manera lenta ante la amplia demanda de esta opción terapéutica, enfocados principalmente a enfermedades hematológicas como leucemias, mielodisplasia y anemia aplásica en trasplante alogénico y para mieloma múltiple y linfomas, con trasplante autólogo.

Los programas con SCU iniciaron en el año 2003, desde entonces hasta el 2012, el Centro Nacional de Trasfusión Sanguínea (CNTS), recolectó 4,883 unidades de SCU, de las cuales sólo 1,732 (35.50%) fueron aceptadas. Desde 2004 a diciembre de 2012, se tienen registrados 285 trasplantes, de los cuales el 70% fue en pacientes pediátricos, y la distribución por padecimiento fue (40):

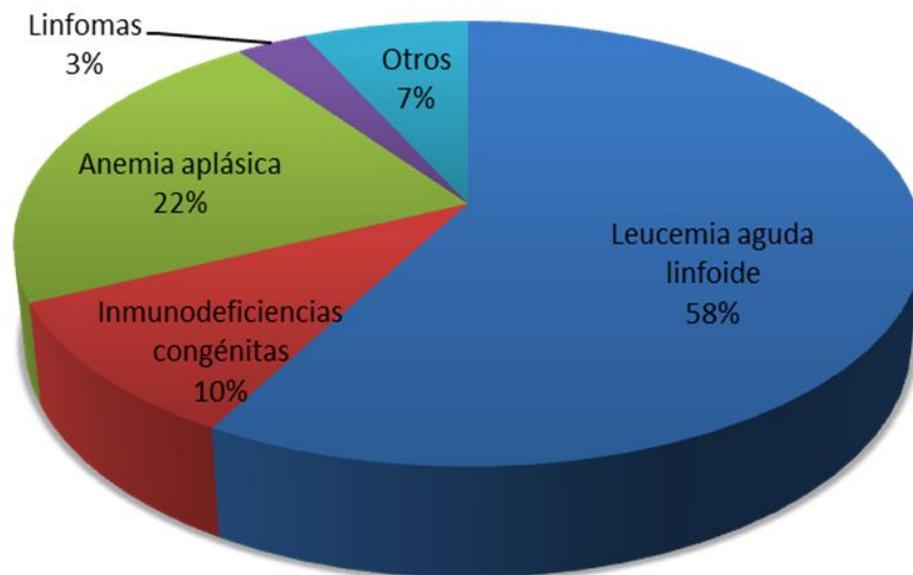


Fig. 5. Distribución, por diagnóstico, de trasplantes de SCU en México del año 2004 al 2012 (CNTS,2013)

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El TCPH es empleado para combatir enfermedades consideradas mortales. Sin embargo, fallas en el trasplante también pueden ser causa de muerte, principalmente en los primeros 2 años post-trasplante, cuando las complicaciones: infección, recaída, enfermedad injerto contra huésped (EICH), toxicidad y fracaso del trasplante, impiden la supervivencia. Si la dosis de CPH es menor a la recomendada y/o de mala calidad, es mayor el tiempo de injerto en el paciente, aumentando el riesgo de infecciones, así como el número de transfusiones requeridas y efectos de toxicidad, lo que resulta en el fracaso del trasplante. Vencer esta zona crítica nos conduce a resultados alentadores; como lo muestran Wingard et. all. en un estudio con más de 3 mil pacientes trasplantados, donde en el Registro Internacional de Trasplante de Sangre y Médula, todos los pacientes que superan los 24 meses, tienen una probabilidad del 80-93% de sobrevivir mínimo 10 años, siendo la recaída de la enfermedad el principal riesgo presentado por el 10% de los trasplantados.

IV. JUSTIFICACIÓN

La expectativa del trasplante de CPH es lograr la curación de la enfermedad. El reto inicial para lograr este resultado es obtener una dosis de CPH óptima que reúna las mejores características de seguridad y calidad en sus distintos procesos. Al tener una unidad de progenitores hematopoyéticos que trabaje bajo estándares internacionales de calidad, se logra ofrecer productos que garantizan la efectividad del trasplante; ya que contar con dosis adecuadas de CPH de calidad, evita el fracaso del trasplante al presentar un injerto rápido y por consecuencia, menos complicaciones infecciosas; e incluso, en trasplantes alogénicos, aumenta el efecto injerto contra tumor.

Las enfermedades neoplásicas, pertenecen a los padecimientos que producen gastos catastróficos, el mal empleo de los recursos o su ineficiencia, elevan los gastos con un mal resultado. Si bien, los costos necesarios para implementar estos procedimientos suelen ser muy altos, los logros terapéuticos que éste ofrece sobre enfermedades consideradas mortales y cuya incidencia es significativa, son expectativas que superan la inversión. Así, la inversión en recursos humanos especializados y materiales de alta tecnología e innovación, junto con procedimientos eficaces y efectivos, conllevan a mejorar la eficiencia de los programas de TCPH, cuyo resultado final será mejorar la calidad de vida y supervivencia de los pacientes con enfermedades, por definición, letales.

El éxito en el trasplante aumenta la supervivencia de los pacientes, logrando su reincorporación a la sociedad.

V. HIPÓTESIS

Si la Unidad de Progenitores Hematopoyéticos trabaja siguiendo los estándares internacionales de calidad, entonces será una unidad eficiente al producir CPH de alta calidad y seguridad, que logran un injerto temprano, en más del 98% de los pacientes trasplantados; asegurando el éxito del trasplante.

VI. OBJETIVO GENERAL

Establecer un método de obtención y procesamiento de células progenitoras hematopoyéticas que brinde autosuficiencia, calidad y seguridad al programa de trasplantes del Hospital General Naval de Alta Especialidad.

VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar los estándares internacionales (FACT-JACIE) en la obtención, procesamiento, validación, criopreservación, descongelación, acondicionamiento e infusión de unidades de progenitores hematopoyéticos, obtenidas de médula ósea y sangre periférica movilizada para uso en trasplante.
- Validar la metodología de los procedimientos estandarizados en la unidad de progenitores hematopoyéticos.

- Apoyar a los diversos servicios clínicos del Hospital General Naval de Alta Especialidad en:

- a) Búsqueda, requisición, envío, descongelación, acondicionamiento e infusión de unidades de sangre de cordón umbilical, cuando estas sean requeridas a través de la red internacional NETCORD-FACT.
- b) Elaboración y ejecución de nuevos protocolos clínicos en terapia celular

VIII. IMPLEMENTACIÓN DE LA UTCyPH

A. Normatividad Nacional

Para el cumplimiento de la normatividad nacional, debido a la ausencia de normas específicas del área, la UTCyPH basa su función y organización apeándose a las Normas Oficiales Mexicanas disponibles y más relacionadas al funcionamiento de la unidad, entre ellas se encuentran:

- Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-168-SSA1-1998, Del expediente clínico
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.
- Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica.

El HOSGENAES cuenta con licencia activa para trasplantes, además de la licencia para disposición de órganos, tejidos y células; lo cual le confiere, según la normatividad nacional, la capacidad para disponer de CPH y realizar el trasplante de estas. La licencia de banco de sangre se actualizó por la de banco de sangre con disposición de progenitores hematopoyéticos, por lo que los avisos de

responsiva ahora comprenden el aviso de responsable para disposición de órganos, células y tejidos y el aviso de responsable de Banco de Sangre con disposición de progenitores hematopoyéticos.

B. ESTÁNDARES INTERNACIONALES

La unidad de Terapia Celular y progenitores hematopoyéticos se diseñó basándose en los estándares de calidad de la organización internacional FACT-JACIE, que en el año 2012 publicó su quinta y más reciente edición en conjunto, al ser JACIE la contraparte europea de la asociación americana FACT, permite que los estándares puedan aplicarse a programas de trasplante en Europa y Norteamérica, promoviendo la calidad en el cuidado del paciente y las prácticas de laboratorio en el campo del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

La Unidad de Terapia Celular y Progenitores Hematopoyéticos (UTCyPH) del HOSGENAES, implementó de acuerdo a FACT, las fases de recolección, procesamiento, almacenamiento, criopreservación y administración de células progenitoras hematopoyéticas. Todos estos procedimientos se encuentran descritos en el manual de procedimientos de la UTCyPH, e incluyen explicaciones detalladas y guías para el personal.

La normatividad nacional e internacional que sustenta el proceso realizado en la unidad de progenitores hematopoyéticos garantiza el buen funcionamiento y calidad de la misma; así como la responsabilidad del personal para ofrecer servicios y resultados de nivel internacional.

C. ESTRUCTURA FÍSICA

La unidad de CPH está constituida por 5 áreas:

- Área de Procesamiento
- Área de Criopreservación
- Estación de Suministro de N₂L
- Validación del Proceso de CPH
- Unidad de búsqueda y Gestión de Datos

Distribuidas de la siguiente manera:

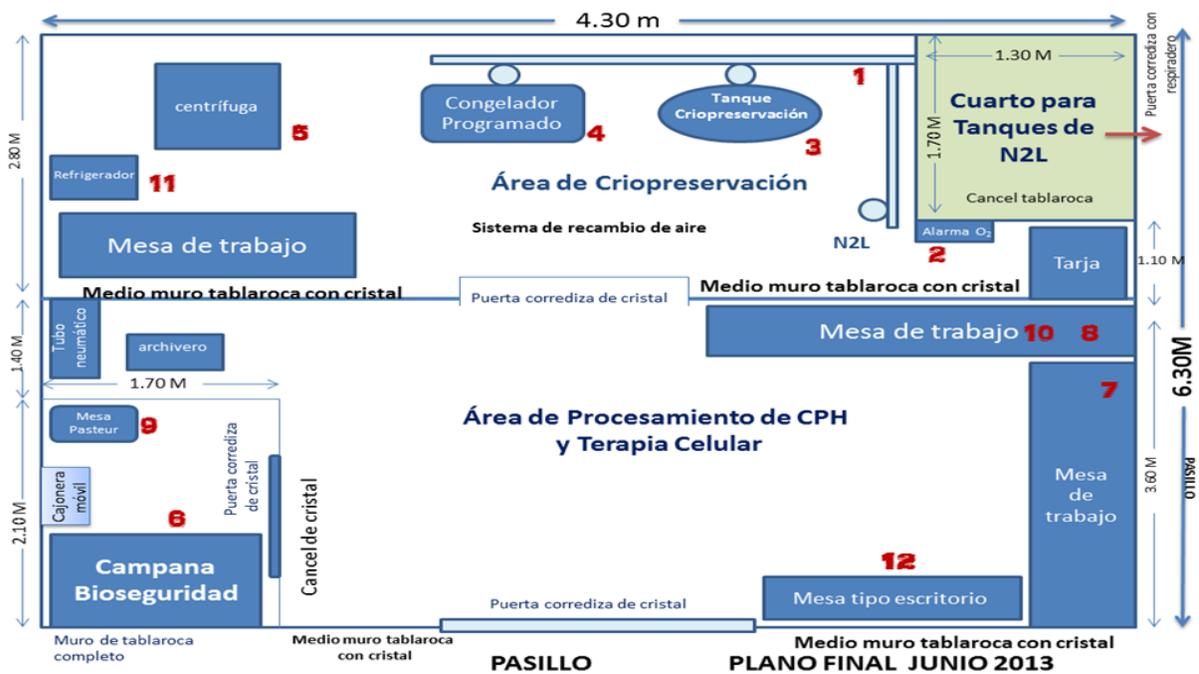


Fig. 6. Plano de la UTCyPH

- **Área de procesamiento**

En el área de procesamiento de CPH se requiere de un ambiente estéril por lo que se cuenta con una campana de bioseguridad clase II y de una mesa pasteur.

Las campanas de seguridad tipo II aportan el 99.99 % de esterilidad y protegen a los trabajadores de los materiales manipulados y al mismo tiempo, protegen dichos materiales de la contaminación externa. El área de trabajo es recorrida por un flujo descendente de aire filtrado estéril. El sistema de filtración (Filtros HEPA) del aire puede variar según los fabricantes, pero tanto el aire recirculado como el extraído deben ser filtrados al menos una vez.

El empleo de este tipo de campanas es necesario debido a la manipulación de los productos celulares. Considerando que éstos son procesados para su posterior injerto en el paciente, se debe evitar el contacto con factores que puedan contaminarlos y afectar su calidad y seguridad.



Fig. 7. Campana de bioseguridad / área de procesamiento

- **Área de Criopreservación**



Fig.8. Área de criopreservación

El área de criopreservación de las CPH procesadas cuenta con un Dry Shipper para el transporte de CPH, tanque de criopreservación y congelador programado, ambos de N₂L a -196 °C, centrifuga refrigerada, refrigerador con congelador, alarma de O₂ y suministro de N₂L. Debido al uso de N₂L el área también cuenta con un sistema de extracción de gases continuo.

Los procesos de criopreservación se realizan mediante el uso de congeladores biológicos que enfrían las muestras según unas curvas programadas de congelación a velocidad controlada.

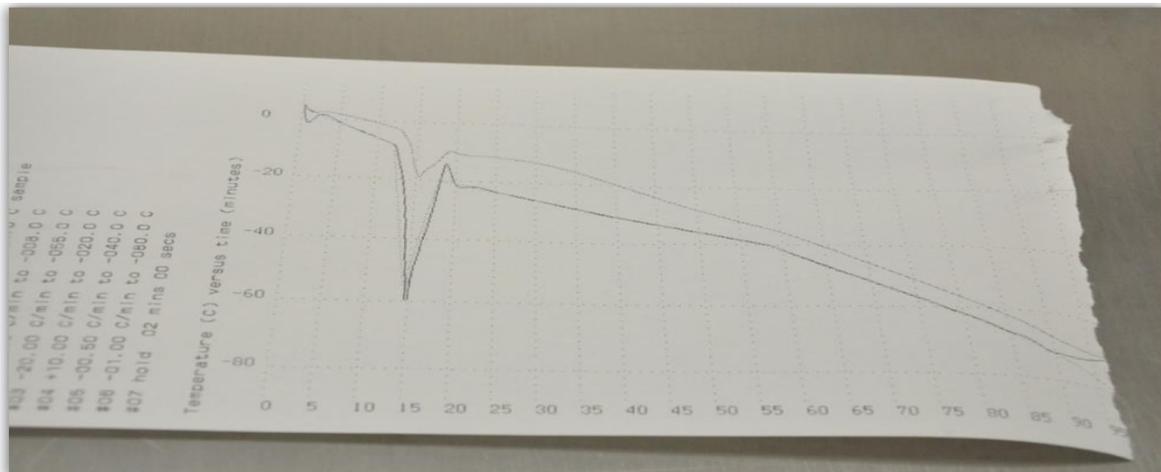


Fig. 9. Curva programada de congelación

En estos congeladores la transmisión de temperatura entre la cámara interior y las muestras a criopreservar se maximiza mediante el uso de placas metálicas que cubren las muestras dentro del congelador. Las curvas programadas de congelación se componen de segmentos cada uno de los cuales tiene una velocidad de enfriamiento ($^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$) determinada empíricamente para obtener una máxima viabilidad tras el proceso de congelación.



Fig. 10. Congelador programado (izq.) / tanque de criopreservación (der.)

Sistema de control de anoxia de medición continua, con indicación secuencial de la concentración de oxígeno de la sala y alarma de averías.



Fig. 11. Alarma de niveles de O₂

Para el suministro de N_2L los tanques de alta presión requieren de una instalación especial a base de tubería al vacío, recubierta de aislante de acuerdo a la temperatura ($-196^\circ C$); además la instalación cuenta con un sistema de venteo para eliminar el gas residual, a base de válvulas selenoides. Esta instalación garantiza un abasto continuo de nitrógeno al sistema.



Fig. 12. Instalación para distribución de N_2L

Para evitar la acumulación de nitrógeno gaseoso liberado por el uso de los equipos, en el área existe un sistema de extracción de gases, el cual permite un intercambio de gas de nitrógeno por oxígeno.



Fig. 13. Sistema de extracción de gases

Los Dry-Shippers son contenedores empleados para el transporte seguro de muestras biológicas a temperaturas criogénicas. Constan de un contenedor interno y uno externo, ambos de aluminio, con un cuello fabricado en fibra de vidrio. El aislamiento entre ambos contenedores se consigue gracias a múltiples láminas de aluminio reflectantes. También están compuestos por un material absorbente que capta el N_2L y lo libera en forma de gas. Este material poroso absorbe y conserva el nitrógeno líquido con el fin de evitar posibles derrames.



Fig. 14. Dry-Shipper

- **Estación de Nitrógeno líquido**

La estación de N_2L que funciona como fuente de suministro al área de criopreservación es un cuarto contiguo separado de la unidad por paredes; se cuenta con dos tanques y sus respectivas instalaciones para poder suministrar a los equipos que lo requieren.



Fig. 15. Tanque de N_2L

Los cilindros, llamados dewars, son recipientes sujetos a presión de doble pared, con un tanque interior que contiene un fluido criogénico y un tanque exterior. Entre los dos tanques se tiene un espacio

anular con vacío y un material con propiedades de aislamiento para evitar la transferencia de calor por conducción, convección y radiación, desde el medio ambiente exterior hasta los gases en estado líquido en su interior.

Tienen dos ventajas principales:

- Contienen un gran volumen de gas a una presión relativamente baja comparada con los cilindros de gas comprimido.
- Son una fuente de líquido criogénico que puede manejarse fácilmente.

Los tanques están almacenados en un lugar especialmente construido y bien ventilado, en contacto con una entrada de aire libre. Los tanques llenos se almacenan de tal manera que el más antiguo es usado primero. Los tanques almacenados son controlados periódicamente en cuanto a su estado general y fugas. Y su almacenamiento se diseñó evitando condiciones que puedan acelerar la corrosión. Los envases criogénicos están equipados con válvulas de seguridad para controlar la presión interna. En condiciones normales los envases ventean el producto periódicamente. Todos los venteos son canalizados al exterior del edificio.



Fig. 16. Válvulas de seguridad en estación de N₂L

- **Área de validación**

La validación del proceso de CPH se lleva a cabo en conjunto con áreas del laboratorio clínico (conteo de poblaciones CD34+, CD45 y pruebas viabilidad por citometría de flujo) y del banco de sangre (biometría hemática, grupo sanguíneo y pruebas serológicas). La conexión entre las áreas mencionadas y la unidad de terapia celular está dada por un sistema de tubo neumático.

- **Unidad de búsqueda y Gestión de Datos**

La unidad de búsqueda y gestión se encuentra dentro del área física de procesamiento y validación, cuenta con un escritorio y equipo de cómputo con disposición de internet, en donde se puede realizar la documentación requerida y la búsqueda de inventarios e información disponible en la web mundial.



Fig. 17. Unidad de búsqueda y Gestión de Datos

D. PROTOCOLOS DE TRABAJO

1. Protocolo de trabajo para TCPH

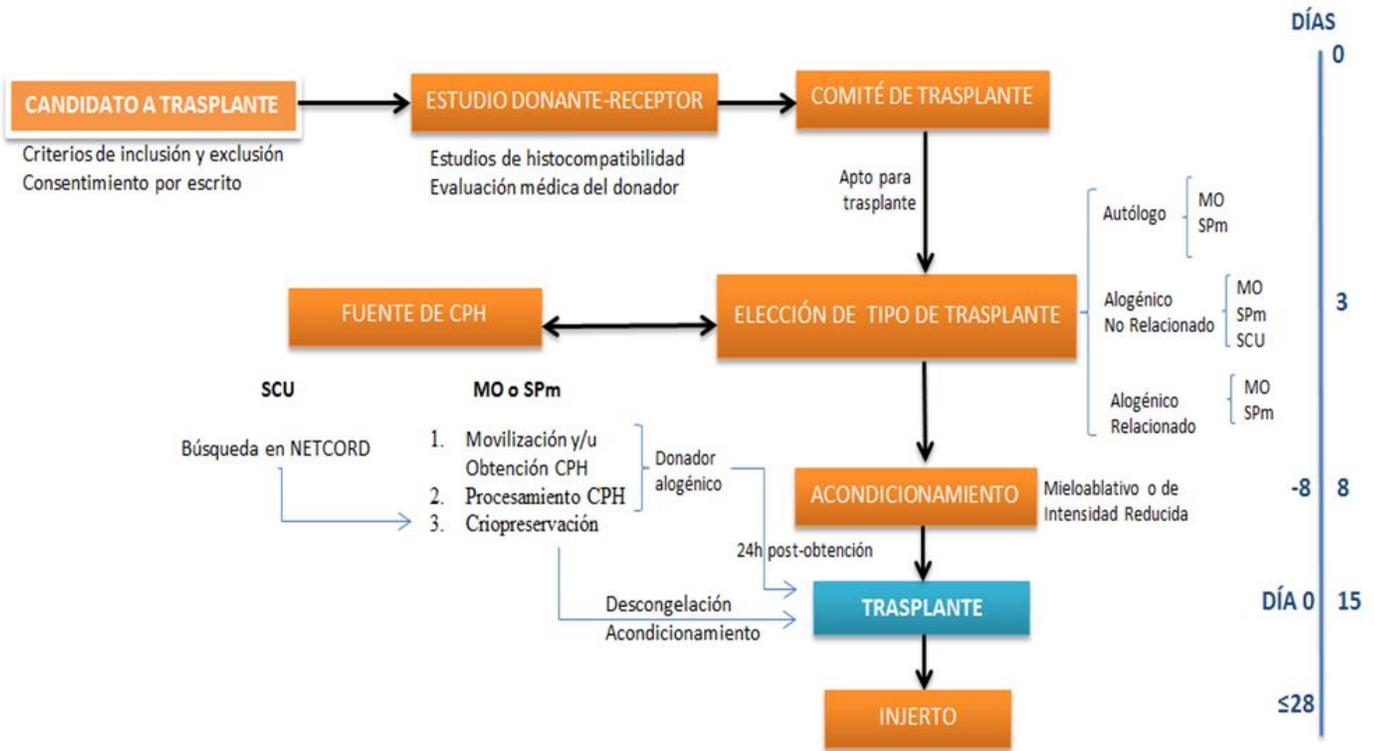


Fig. 18 Protocolo para el trasplante de CPH

Selección del Donante

La evaluación del pre-donador se realiza en el banco de sangre, donde se realizan pruebas serológicas y valoraciones médicas para determinar si la persona es apta para donar.

Según la NOM-253-SSA1-2012, las pruebas para la detección de los agentes infecciosos transmisibles por transfusión deberán incluir obligatoriamente la detección de:

- *Treponema pallidum*
- Virus B de la hepatitis

- Virus C de la hepatitis
- Virus de la inmunodeficiencia humana tipos 1 y 2
- *Trypanosoma cruzi*

Cuando por la situación epidemiológica de la región geográfica donde se encuentra el establecimiento o de la de procedencia del donante, sus antecedentes personales o sus factores de riesgo para adquirir infecciones, o bien, por las características de los futuros receptores y su susceptibilidad a adquirir o desarrollar enfermedad, el banco de sangre deberá efectuar y documentar pruebas adicionales para la detección de los agentes infecciosos transmisibles por transfusión. Las pruebas adicionales podrán incluir la detección de los agentes siguientes:

- Brucella
- Plasmodium
- Citomegalovirus
- Toxoplasma
- Retrovirus HTLV tipos I y II

Determinación de compatibilidad HLA

En la donación alogénica, es parte del proceso de selección la determinación de histocompatibilidad; proporcionada por la relación de HLA donador/paciente.

En TCPH los antígenos de HLA de mayor importancia son: de clase I (A,B,C) y de clase II (DR, DQ,DP); aunque la tipificación más empleada en el trasplante es A,B,

DR, DQ. Los antígenos A, B y DQ se pueden analizar en mediana resolución (2 dígitos), en cambio el análisis de DR es obligatorio en alta resolución (4 dígitos).

Se considera el tipo de fuente de CPH, ya que si es de SPm o MO los 8 antígenos deben ser idénticos; a diferencia de las células de SCU, donde es permisible tener hasta 2 antígenos diferentes en A,B y DQ , pero el DR debe ser idéntico en sus 4 dígitos.

El orden de prioridad en la elección de donadores no emparentados es:

- Máxima compatibilidad HLA
- Peso adecuado del donante para proporcionar 3×10^8 células mononucleares/kg de receptor.
- Edad del donante, eligiendo al más joven.
- Serología para citomegalovirus negativa.
- Preferir al donador masculino sobre el femenino.

El proceso de selección de donantes considera también el punto de vista ético para proceder con la donación.

Cuando se determina que es un donador apto se proporciona el consentimiento informado donde se explica la naturaleza de procedimiento, explicación de proceso e informar los riesgos y beneficios que tiene el donar CPH.

a) Tipos de trasplante realizados en el HOSGENAES

El tipo de trasplante es elegido según la patología del paciente, clasificándose de la siguiente manera:

Autólogo: Se transfunden precursores propios del paciente, obtenidos de MO o SPm. Es el tratamiento elegido cuando la toxicidad medular es el principal factor limitante para un tratamiento intensivo.

Las enfermedades que pueden tratarse con este tipo de trasplante son: **Linfomas, Mielomas, Tumores sólidos: neuroblastoma, tumor de Wilms, retinoblastoma, germinales, Enfermedades autoinmunes, Protocolos de terapia celular.**

Alogénico: Efectuado entre individuos de una misma especie. Involucra la sustitución de todas las células del organismo derivadas de la célula madre pluripotencial hematopoyética, por lo que su empleo se sugiere cuando la enfermedad se origina en una de estas células y sea capaz de curar si se sustituyen por otras sanas.

El trasplante alogénico puede dividirse en relacionado y no relacionado, siendo el primero cuando el donador es hermano HLA idéntico. De esta división depende la fuente de CPH, que son obtenidas de SCU, MO y SPm de un donador No Relacionado, o bien de SPm o MO, cuando el donador es relacionado.

Las patologías tratadas con este trasplante son: **Leucemias, Anemia aplásica, Hemoglobinopatias, Mielodisplasias.**

La elección de la fuente de CPH y tipo de trasplante obedece a las recomendaciones basadas en evidencias, propuestas por la ASBMT.

2. Protocolo de trabajo de la UTCyPH

a) Obtención de CPH

Las CPH se pueden obtener de 3 fuentes:

- Médula ósea

Obtenida mediante múltiples punciones-aspiraciones de sangre medular, principalmente en crestas ilíacas y ocasionalmente en esternón o meseta tibial. Se realiza en quirófano bajo condiciones absolutas de esterilidad, y con un kit de extracción de médula ósea. En el proceso, el donante se seda, se aplica analgésico local y se realiza asepsia. Las bolsas de recolección contienen heparina para evitar coagulación, las extracciones son de volúmenes pequeños (hasta 5 ml) para lograr el volumen deseado que para TCPH es de aproximadamente 1 litro.

- Sangre periférica movilizada

Se aumenta la cantidad de CPH en sangre periférica tras administrar factores de crecimiento (factor estimulante de colonias de granulocitos, G-CSF) solos, o junto con quimioterapia, si es trasplante autólogo. Se emplea también la molécula AMD 3100, logrando una buena cantidad movilizada de células CD34+ (31).

Al quinto día de movilización y al determinar que la cantidad de células en SP es conveniente, se realiza la extracción mediante aféresis en el banco de sangre. El proceso de leucoaféresis consiste en: separar la sangre del donante, en diferentes componentes, mediante centrifugación automatizada, retener las células mononucleadas y devolver el resto de los componentes sanguíneos al donante. El

procedimiento se realiza en una máquina de circuito cerrado y el donante no requiere anestesia. La cantidad de volumen extraído es variable, pero se pretende obtener al menos 2×10^6 células CD34+/Kg de receptor, que es la cantidad mínima considerada para un TCPH rápido y seguro (30,31).

- Sangre de cordón umbilical

La unidad no se encarga de la extracción de SCU ni cuenta con banco de cordón umbilical; por lo que la obtención de estas células se logra con ayuda de la organización internacional NetCord, cuando el paciente no puede ser su propio donador y no cuenta con un donador óptimo.

b) Procesamiento

Una vez obtenidas las CPH se someten a procesamiento, el cual depende del tipo de trasplante a realizar y la fuente de obtención.

1. Trasplante autólogo, células de MO o SPm

En el área de procesamiento la SPm o MO obtenida, se transfiere a una bolsa “transfer” para pesarla y saber el volumen total basándose en la densidad.

Se toman muestras iniciales para determinar la cantidad de células mononucleares por biometría hemática (BH) y determinar células CD 34+, CD 45+ y viabilidad celular mediante citometría de flujo.

El control de calidad incluye BH, células mononucleares totales, viabilidad celular, serología: *Treponema pallidum*, Virus de la hepatitis B y C, Virus de la

inmunodeficiencia humana tipos 1 y 2, *Trypanosoma cruzi*, Brucella, cultivos bacteriológicos aerobios, anaerobios y micológicos.

Cuando las células provienen de aféresis se pide una bolsa extra de plasma (300ml) del paciente para preparar la solución criopreservante (DMSO).

Los productos se centrifugan para posteriormente hacer reducción de volumen mediante un desplasmador; después, por medio de una balanza, se mide el volumen de plasma eliminado para saber cantidades exactas que se están manejando.



Fig. 19. Reducción de volumen

Una vez realizado lo anterior se sella la bolsa, quedando en ella las CMN reducidas, y es trasladada a bolsas de criopreservación que se llenan con un volumen máximo de 100 ml, a pesar de que su capacidad es aproximadamente de 250 ml, se decide no meter más de 100 ml porque el proceso de congelación provoca que el contenido se expanda aumentando el riesgo de romper la bolsa.

La solución criopreservante se prepara con plasma y DMSO al 20%, ya que la combinación con células madre se hace en relación volumen 1:1, usando el mismo

volumen de solución criopreservante y de células, por lo que la dilución finaliza al 10%.

Las unidades se someten a enfriamiento durante media hora (aproximadamente) para alcanzar una temperatura de 4°C y se colocan entre placas de gel congeladas para mantener la misma.

La adición del criopreservante se realiza en un tiempo controlado no mayor a 7 minutos, agregando el mismo volumen de solución criopreservante al volumen total de células, para mantener una relación volumen-volumen.



Fig. 20. Adición de criopreservante

A partir de este paso se debe manipular el producto en planchas de hielo, debido a que el DMSO puede producir una reacción exotérmica si aumenta la temperatura y dañar las células.



Fig. 21. Manipulación en planchas de hielo

El paso siguiente es la congelación, para lo cual se etiquetan los canisters de metal y se prende el congelador programado el cual nos da una gráfica que refleja la velocidad de congelación que sigue. Los productos se introducen al congelador mediante canisters, permaneciendo ahí durante aproximadamente hora y media, tiempo en el que la temperatura disminuye de 4 °C a -80°C.



Fig. 22. Congelación

Al alcanzar esta temperatura las bolsas se sacan utilizando guantes de criopreservación y se meten en racks al tanque de criopreservación.

Este paso debe realizarse en menos de 1 minuto, de lo contrario la temperatura sube, afectando el producto. Las unidades permanecen sumergidas en el N₂L, congeladas a -196°C hasta el día de trasplante (día cero).

De uno a dos días previos al trasplante se llena el dryshipper, con N₂L para que alcance y mantenga la temperatura deseada y poder transportar las unidades.

El día cero, se transfieren las unidades criopreservadas para el trasplante, del tanque de criopreservación al dryshipper, y en la unidad de trasplante se sacan las unidades congeladas de una en una por seguridad del paciente, pues se descongela solo el producto que se utilizará, ya que si por condiciones del paciente o indicaciones del médico la infusión tiene que esperar, se mantienen seguros los demás productos sin exponer a cambios de temperatura el DMSO. Una vez en la cabecera del paciente, se abre el cánister y se mete la unidad congelada en una bolsa ziploc previamente esterilizada, lo cual se realiza para asegurar la recuperación del producto en caso de un daño en la bolsa primaria.



Fig. 23. Transporte a quirófano

El producto se descongela en 2 minutos, se considera una señal de temperatura óptima cuando sobre la bolsa hay una ligera capa de hielo, pues a mayor temperatura el DMSO daña las células.



Fig. 24. Acondicionamiento

A continuación se realiza el proceso de acondicionamiento de la bolsa en el cual se debe asegurar que la sangre está homogeneizada y no tiene hielos, sólo debe estar fría. Se entrega a una enfermera circulante quien la conecta a catéter iniciando la infusión.

c) Infusión

El producto se infunde en 15 minutos por cada unidad, este tiempo es crítico pues al excederlo aumenta el riesgo de calentamiento del DMSO y por ende el daño celular de la unidad de progenitores.



Fig. 25. Infusión

Durante la infusión el paciente siempre está monitoreado.

2. Trasplante alogénico relacionado y no relacionado (SPm y MO)

Durante las primeras 24 horas de obtenidas, se realiza la validación de las unidades, el acondicionamiento e infusión; siguiendo el mismo procedimiento mencionado anteriormente.

3. Trasplante alogénico, células de SCU

Una vez obtenidas las CPH mediante la búsqueda en NetCord, estas se mantienen en criopreservación hasta el día del trasplante, cuando se realiza la validación de la unidad, acondicionamiento e infusión. Cada proceso se realiza siguiendo las indicaciones mencionadas inicialmente.

Proceso de Continuidad

El trasplante como se ha mencionado antes, es la infusión de Células Progenitoras Hematopoyéticas, provenientes de un donante que requieren altos estándares de calidad y para su aplicación de cuidados especiales, enfocados al manejo de la incompatibilidad en el sistema ABO (cuando es el caso, en trasplantes alogénicos), o la toxicidad por el uso de sustancias crioprotectoras, para la conservación de las células (en trasplante autólogo).

Estas particularidades hacen necesario el apego a protocolos de trasplante establecidos con base a las variables del origen celular médula ósea, sangre periférica y o sangre de cordón umbilical; y del donador del que proceden autólogo, alogénico relacionado, alogénico no relacionado, haploidéntico.

INJERTO.

Una vez efectuado el trasplante la recuperación se inicia cuando el injerto del trasplante ha ocurrido, definido por un conteo de leucocitos mayor de $0.5 \times 10^9/L$, por tres días consecutivos. Después de producido el injerto, se continua con el control de los procesos infecciosos y la recuperación del daño celular en los diversos tejidos del cuerpo, lo que permite la adecuada nutrición y autocuidado del enfermo.

RECUPERACIÓN INTEGRAL

En esta etapa comienza la recuperación de la mucosa gastrointestinal y por tanto el paciente es capaz de reiniciar su alimentación oral y el daño provocado por la

quimioterapia o radioterapia se reduce hasta llegar a la recuperación de la función orgánica específica en cada parte del cuerpo que se afectó.

PLAN DE EGRESO

Si la evaluación del paciente es satisfactoria, se reconstituye la vía oral, no hay evidencia de infección, toxicidad o alguna complicación el paciente inicia su plan de egreso. En esta condición, el grupo multidisciplinario da comienzo al plan de educación y de egreso, individualizado a las necesidades del paciente, educándole cómo será su nuevo estilo de vida, los cuidados que debe seguir, hasta reintegrarse a la sociedad.

SEGUIMIENTO AMBULATORIO.

El paciente deberá acudir a sus citas de manera ambulatoria para estudios de laboratorio y gabinete, así como a su cita médica y apegarse a los cuidados post-trasplante de acuerdo al protocolo específico.

El médico de trasplante evalúa al paciente en la consulta externa de acuerdo al protocolo de seguimiento específico para trasplante autólogo del día 100 a 180 postrasplante y en trasplante alogénico de 180 a 360 días de seguimiento.

E. Controles de Calidad

- **Conteo de CMNt:** por biometría hemática (ver tabla 7)
- **Conteo de células CD34+** por citometría de flujo (ver tabla 7)
- **Viabilidad Celular:** $\geq 90\%$ (por citometría de flujo)
- **Serología:** *Treponema pallidum*, *Trypanosoma cruzi*, *Brucella*, Hepatitis B y C, VIH 1 y 2.
- **Cultivos:** bacteriológicos (aerobios, anaerobios) y micológicos.

	Volumen recolectado	Dosis celular objetivo	Dosis óptima de células CD34+
MO	10-20 mL/kg	$>2 \times 10^8$ CNT/kg	$2-3 \times 10^6$ /kg
SPm	150-400 mL	$5-10 \times 10^6$ CD34+/kg	8×10^6 /kg
SCU	80-160 mL	$>3 \times 10^7$ CNT/kg	0.2×10^6 /kg

Tabla 7. Dosis celular de acuerdo a la fuente de CPH (EBMT,2012)

IX. RESULTADOS

La UTCyPH colabora en los protocolos establecidos de trasplante de progenitores hematopoyéticos, participando directamente en la recolección de las células madre, vía médula ósea en quirófano y en la movilización de CPH para obtención vía SPm por aféresis.

Características de la población. Del 28 de agosto de 2012 al el 21 de Enero de 2014 se trasplantaron 7 pacientes, 2 fueron mujeres y 5 varones. 5 pacientes se encontraban en remisión completa (libres de enfermedad) y 2 con enfermedad mínima residual. En leucemias en remisión, documentados por aspirados de médula ósea, biopsia de hueso, e inmunofenotipo de M.O. con menos del 5% de blastos. En enfermedad mínima residual, entre el 5 al 10% de blastos. En linfoma, con PET-CT negativo, o con actividad localizada con menos de 5 unidades. En Mieloma Múltiple con inmunofijación en suero y orina negativos.

Se documentan 5 trasplantes autólogos de SPm bajo el protocolo de filgastrin 10 mg/kg/5 dosis para la movilización en 3 casos, y con el protocolo filgastrin-plerixafor 10 µg/kg + 0.24 mg/kg por 5/2 días respectivamente para la obtención de dosis óptima de células progenitoras en 2 pacientes. Esta dosis óptima se estable por citometría de flujo al alcanzar >20 células CD34+/µL en sangre periférica. Los trasplantes alogénicos relacionados, fueron de donador sano.

Todas las unidades empleadas en los 5 trasplantes autólogos, fueron procesados siguiendo los estándares propuestos por la organización FACT-JACIE.

Las 7 unidades fueron sometidas a los controles de calidad mencionados previamente para demostrar que cumplían con las condiciones requeridas. La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos en las pruebas serológicas, microbiológicas y de viabilidad:

Tx	Dosis Celular		Viabilidad Celular (%)	Pruebas Serológicas					Cultivos	
	CD34+ / kg peso paciente	CMN/ kg peso paciente		<i>T. pallidum</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>Brucella</i>	Hepatitis (B , C)	VIH (1, 2)	Bacteriológicos	Micológicos
1	5.7 x 10 ⁶	12.2 X 10 ⁸	98	-	-	-	-	-	-	-
2	6.2 X 10 ⁶	16.3 X 10 ⁸	99	-	-	-	-	-	-	-
3	2.36 X 10 ⁶	16.1 X 10 ⁸	99	-	-	-	-	-	-	-
4	22.6 x 10 ⁶	8.43 X 10 ⁸	97	-	-	-	-	-	-	-
5	4.97 X 10 ⁶	9.72 X 10 ⁸	98	-	-	-	-	-	-	-
6	5.39 X 10 ⁶	28.52 X 10 ⁸	98	-	-	-	-	-	-	-
7	10.79 X 10 ⁶	13.14 X 10 ⁸	97	-	-	-	-	-	-	-

En cada caso se obedecieron las recomendaciones basadas en evidencias (Grupo Americano y Europeo de Trasplantes), para elegir la fuente de CPH y el tipo de trasplante, según la edad de paciente y el tipo de padecimiento.

La calidad y seguridad de las CPH obtenidas y procesadas en el HOSGENAES se refleja en el injerto temprano (<16 días post-trasplante) de los productos, en promedio al día 11 con un rango de 8 a 15 días, logrando que los pacientes atendidos tengan supervivencia libre de enfermedad desde el día del trasplante.

RESULTADOS (hasta el 02-Mayo-2014)

No. Tx	Fecha Tx	Sexo	Edad (años)	Padecimiento	Tipo Tx	Dosis Celular		Día injerto (>500 neutrófilos / μ L)	Días Post-Tx libre de enfermedad
						CD34+ / kg peso paciente	CMN/ kg peso paciente		
1	28-Ago-2012	M	62	Mieloma Múltiple III A	Autólogo SPm	5.7 x 10 ⁶	12.2 X 10 ⁸	+11	+612
2	11-Sep-2012	F	42	Leucemia Linfoblástica Aguda en primera remisión	Alogénico relacionado M.O.	6.2 X 10 ⁶	16.3 X 10 ⁸	+15	+598
3	26-Feb-2013	M	57	Linfoma no Hodking Células grandes difuso refractario	Autólogo SPm	2.36 X 10 ⁶	16.1 X 10 ⁸	+11	+430
4	25-Jun-2013	F	34	Leucemia Mieloide aguda	Autólogo SPm	22.6 x 10 ⁶	8.43 X 10 ⁸	+8	+311
5	25-Oct-2013	M	55	Linfoma no Hodking Células del manto	Autólogo SPm	4.97 X 10 ⁶	9.72 X 10 ⁸	+11	+189
6	14-Nov-2014	M	56	Mieloma Multiple	Autólogo SPm	5.39 X 10 ⁶	28.52 X 10 ⁸	+13	+169
7	21-Ene-2014	M	39	Leucemia Mieloide Aguda	Alogénico relacionado SPm	10.79 X 10 ⁶	13.14 X 10 ⁸	+10	+101

Tx: trasplante M:masculino F:femenino SPm:sangre periférica movilizada MO:médula ósea

En la tabla siguiente, se describe la edad, el género y los padecimientos de origen, que se identificaron con los criterios antes descritos, así como las dosis celulares infundidas congruentes con el injerto exitoso logrado.

Los pacientes una vez egresados, tienen seguimiento en la consulta externa, 2 veces por semana, hasta cumplir 2 meses post-trasplante, y después cada quince días hasta cumplir 3 meses, y después cada mes hasta cumplir el año. A partir del segundo año, se valora cada 3 meses hasta cumplir 5 años, documentando la remisión, utilizando los mismos criterios ya descritos anteriormente.

X. DISCUSIÓN

La participación de la UTCyPH en el protocolo de movilización, permite al área de Trasplantes, ajustar protocolos de movilización y de colección de células, para garantizar la dosis óptima a trasplantar. Lo cual de no contar con esta Unidad de Terapia Celular dentro del HOSGENAES, 2 de 5 pacientes, hubieran presentado fracaso de trasplante, al no alcanzar la dosis óptima.

El procesamiento, criopreservación y validación de las células progenitoras por parte de la Unidad de Terapia Celular, basados en estándares internacionales, en un medio ambiente ad hoc, con protocolos de trabajo consensuados, y controles de calidad, permite programar un trasplante seguro.

Una vez realizada la preparación para el trasplante, y realizada la infusión de células progenitoras, se presentaron eventos adversos leves como taquicardia o hipertensión, asociados al DMSO, eventos ya esperados y corregidos durante la infusión, sin repercusión para el paciente.

Finalmente el injerto mieloide, se logró en el transcurso en un tiempo < 15 días, definiéndose un injerto temprano, habitualmente relacionado a la dosis óptima celular en el 100% de los pacientes. Lo que representó menos riesgo de infección, menor requerimiento transfusional, estancias hospitalarias cortas y hasta el momento una sobrevida libre de enfermedad. Incluso 4 pacientes de los 7 con reintegración a la vida laboral activa.

XI. CONCLUSIONES

La UTCyPH está diseñada y equipada para poder realizar la obtención, procesamiento, validación, criopreservación, descongelación, acondicionamiento e infusión de unidades de progenitores hematopoyéticos, provenientes de médula ósea y sangre periférica movilizada para uso en trasplante; así como la búsqueda, requisición, envío, descongelación, acondicionamiento e infusión de unidades de sangre de cordón umbilical, cuando estas sean requeridas a través de la red internacional NETCORD-FACT. Además, cuenta con personal altamente capacitado y sus procesos están basados en estándares internacionales de calidad; por lo que es capaz de apoyar con productos seguros y de calidad, al programa de trasplantes del HOSGENAES.

Basando la obtención y el procesamiento de CPH en los estándares internacionales, se obtienen productos de calidad y seguridad suficientes para lograr el injerto de las células en el paciente.

Ofrecer trasplantes exitosos otorga al HOSGENAES la posibilidad de curar enfermedades, por definición, mortales; y en consecuencia, participa en la reincorporación de individuos a la sociedad.

La inversión en recursos humanos especializados y materiales de alta tecnología, junto con procedimientos eficaces y efectivos, es superada por los logros terapéuticos que el TCPH ofrece sobre enfermedades consideradas mortales.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Barnett D, Janossy G, Lubenko A, Matutes E, Newland A and J.T. Reilly (1999), "Guideline for the Flow Cytometric Enumeration of CD34+ Haematopoietic Stem Cells" Blackwell Science Ltd, 21:301–308.
2. Berz D, McCormack E, Winer E, Colvin G, Quesenberry P (2007) "Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells" American Journal of Hematology 82(6): 463–472.
3. Carreras E, Rovira M (2007). Trasplante de progenitores hematopoyéticos. Publicaciones JANO. 1671: 23-34
4. European Group for Blood and Marrow Transplantation-Nurses Group (2009) "Movilización y Aféresis de las Células Madre Hematopoyéticas: Guía Práctica para el Personal de Enfermería y otros Profesionales de la Atención Sanitaria Relacionados"
5. Gluckman E, Ruggeri A, Rocha V, Baudoux E, Boo M, Kurtzberg J, Navarrete W, Walraven S (2011) "Family-directed Umbilical Cord Blood Banking". Haematologic for Eurocord, Netcord, World Marrow Donor Association and National Marrow Donor Program 96(11):1700-1707.
6. Gratwohl A, Baldomero H, Aljurf M (2010), "Hematopoietic Stem Cell Transplantation. A Global Perspective" Journal of the American Medical Association 303(16):1617-1624.
7. Gutiérrez E (2007) "Sistemas de Gestión de la Calidad en el ámbito sanitario" Fundación Dialnet, 32 Forum Calidad 19:32-37.
8. Hahn T , Wingard J, Anderson K, Bensinger W, Berenson J, Brozeit G, Carver J, Kyle R, McCarthy Jr P. (2003) "The Role of Cytotoxic Therapy with Hematopoietic Stem Cell Transplantation in the Therapy of Multiple Myeloma: An Evidence-Based Review" Biology of Blood and Marrow Transplantation 9:4-37.
9. Hahn T, Wall D, Camitta B, Davies S, Dillon H, Gaynon P, Larson R, Parsons S, Seidenfeld J, Weisdorf D, McCarthy P (2005) "The Role of Cytotoxic Therapy with Hematopoietic Stem Cell Transplantation in the Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children: An Evidence-Based Review". Biology of Blood and Marrow Transplantation 11:823-861
10. Infante E. (2005) "Enumeración de Células Madre CD34+, Cumpliendo con las Recomendaciones ISHAGE, con Determinación de Viabilidad y Conteo Absoluto en un Paso" Becton-Dickinson.
11. Kolonin M, Simmons P (2012) "Stem Cell Mobilization Methods and Protocols" Institute of Molecular Medicine, University of Texas Health Science Center at Houston, Chapter XVI.
12. Logue M, Savani B (2013) "Understanding Basic Steps to Hematopoietic Stem Cell Transplantation Evaluation" American Journal of Blood Research, 3(2):102-106.
13. Louette M, Waller E. (2012) "Monitoring Blood for CD34+ Cells to Determine Timing of Hematopoietic Progenitor Cells Apheresis" Institute of Molecular Medicine, University of Texas Health Science Center at Houston, Chapter XVI.
14. Oliansky D, Larson R, Weisdorf R, Dillon H, Ratko T, Wall D, McCarthy P, Hahn T (2012) "Stem Cell Transplantation in the Treatment of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: Update of the 2006 Evidence-Based Review" Biology Blood Marrow Transplant 18: 18-36.
15. Oliansky D, Appelbaum F, Cassileth P, Keating A, Kerr J, Nieto Y, Stewart S, Tallman S, McCarthy P, Hahn T (2008) "The Role of Cytotoxic Therapy with Hematopoietic Stem Cell Transplantation in the Therapy of Acute Myelogenous Leukemia in Adults: An Evidence-Based Review" Biology of Blood and Marrow Transplantation 14:137-180.

16. Oliansky D, Gordon L, King J (2010). "The role of cytotoxic therapy with hematopoietic stem cell transplantation in the therapy of follicular lymphoma: an evidence-based review" *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 16:443-468.
17. Oliansky D, Rizzo J, Aplan P, Arceci R, Leone L, Ravindranath Y, Sanders E, Smith F, Wilmot F, McCarthy Jr P, Hahn T (2007) "The Role of Cytotoxic Therapy with Hematopoietic Stem Cell Transplantation in the Therapy of Acute Myeloid Leukemia in Children: An Evidence-Based Review" *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 13:1-25.
18. Oliansky D, Antin J, Bennett J, Deeg J, Engelhardt C, Heptinstall K, De Lima M, Gore S, Potts R, Silverman L, Jones R, McCarthy P, Hahn T. (2009) "The Role of Cytotoxic Therapy with Hematopoietic Stem Cell Transplantation in the Therapy of Myelodysplastic Syndromes: An Evidence-Based Review" *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 15: 137-172
19. Oliansky DM, Czuczman M, Fisher RI (2011) "The Role of Cytotoxic Therapy with Hematopoietic Stem Cell Transplantation in the Treatment of Diffuse Large B Cell Lymphoma: Update of the 2001 evidence-based review" *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 17(1):20-47.
20. Palomo I, Pereira J, Palma J (2005) "Hematología, fisiopatología y diagnóstico" Editorial Universidad de Talca, Chile.
21. Petersdorf E. (2008) "Optimal HLA Matching in Haematopoietic Cell Transplantation". *Current Opinion in Immunology Elsevier* 20(5): 588–593.
22. Ruíz-Arguellez J, (2011) "Algunas Observaciones Sobre el Rezago en la Práctica de los Trasplantes Hematopoyéticos en México" *Revista de Hematología* 12(1):1-4
23. Secretaría de Salud (2007) "Guía Para el Uso Clínico de la Sangre" Asociación Mexicana de Medicina Transfusional A.C. y Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología.
24. Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Donostia (2011) "Curso de Enfermería en el Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos (TPH)" Hospital Universitario Donostia. España.
25. Sutherland R, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I (1996), "The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Citometry" *Journal of Hemotherapy* 5:213-226.
26. Tiercy J (2012) "Unrelated Hematopoietic Stem Cell Donor Matching Probability and Search Algorithm" *Bone Marrow Research*.
27. Wingard J (2011) "Long-Term Survival and Late Deaths After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation" *Journal of Clinical Oncology* 29(16).

GUÍAS DE ACREDITACIÓN

28. Comité de Acreditación en Trasfusión, CAT (2007) "Estándares de acreditación en obtención, procesamiento y almacenamiento de células progenitoras hematopoyéticas" 3ª edición. España.
29. European Group for Blood and Marrow Transplantation (2008) "Hematopoietic Stem Cell Transplantation. The EBMT Handbook" 5ª Edición, Europa.
30. FACT-JACIE (2012) "International Standards Accreditation Manual" Fifth Edition – Version 5.3
31. Joint Accreditation Committee of ISCT-Europe and EBMT (2009) "Standards for Hematopoietic Progenitor Cell Collection, Processing and Transplantation", Europa.

32. NORMA Oficial Mexicana NOM-005-SSA3-2010 "Que establece los requisitos mínimos de infraestructura y equipamiento de establecimientos para la atención médica de pacientes ambulatorios".
33. Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011 "Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos".
34. Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012 "Para la vigilancia epidemiológica".
35. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 "Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo".
36. Norma Oficial Mexicana NOM-168-SSA1-1998 "Del expediente clínico"
37. Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012 "Para la Disposición de Sangre Humana y sus Componentes con Fines Terapéuticos".

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

38. Asociación Americana para Bancos de Sangre (AABB) EUA 2013: <https://www.aabb.org>
39. Asociación Mundial de Donadores de Médula 2013: <http://www.worldmarrow.org>
40. Centro Nacional de Trasfusión Sanguínea, México 2013:
http://cnts.salud.gob.mx/interior/bscu_estadi.html
41. Colegio de Patólogos Americanos (CAP) 2013: <http://www.cap.org>
42. Federación Europea de Inmunogenética (EFI) 2013: <http://www.efiweb.eu>
43. Fundación Internacional NetCord 2013: <http://www.netcord.org>
44. Fundación Para la Acreditación de Terapia Celular (FACT) 2013:
<http://www.factwebsite.org/ctstandards/>
45. Organismo de Certificación de la Calidad en Transfusión, Terapia Celular y Tisular (CAT) 2013: <http://www.catransfusion.es/>
46. Organización Mundial de la Salud (OMS) 2013: <http://www.who.int/es>
47. Red Mundial para el Trasplante de Sangre y Médula (WBMT) 2013: <http://www.wbmt.org>