

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**LA IMPORTANCIA EN LA CUENTA LEUCOCITARIA Y
DEL VOLUMEN DE LA MUESTRA PARA LA DECISION
DE CRIOPRESERVAR CELULAS DE CORDON UMBILICAL**

**POR
Q.C.B. MAYLA YACETH CANALES ORTIZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN EL LABORATORIO DE HEMATOLOGIA**

MONTERREY, NUEVO LEON

MARZO DE 2006

TE
RB45
.C36
2006
c.1



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



LA IMPORTANCIA EN LA CUENTA LEUCOCITARIA Y
DEL VOLUMEN DE LA MUESTRA PARA LA DECISION
DE CRIOPRESERVAR CELULAS DE CORDON UMBILICAL

POR

Q.C.B. MAYLA YACETH CANALES ORTIZ

COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN EL LABORATORIO DE HEMATOLOGIA

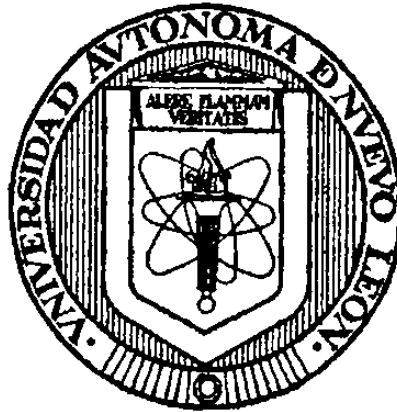
MONTERREY, NUEVO LEON

MARZO DE 2006



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**LA IMPORTANCIA EN LA CUENTA LEUCOCITARIA Y DEL VOLUMEN DE LA
MUESTRA PARA LA DECISIÓN DE CRIOPRESERVAR CELULAS DE CORDÓN
UMBILICAL**

POR:

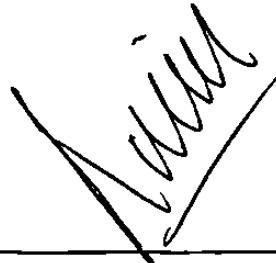
Q.C.B. MAYLA YACETH CANALES ORTIZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN
EL LABORATORIO DE HEMATOLOGIA**

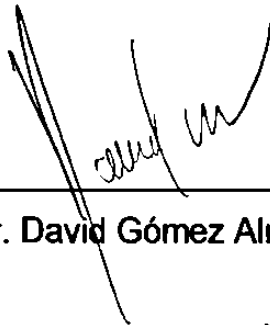
MONTERREY, N.L. A MARZO 2006

LA IMPORTANCIA EN LA CUENTA LEUCOCITARIA Y DEL VOLUMEN DE LA
MUESTRA PARA LA DECISIÓN DE CRIOPRESERVAR CELULAS DE CORDON
UMBILICAL.

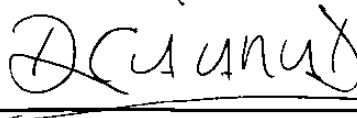
Aprobación de tesis



Dr. José Carlos Jaime Pérez



Dr. David Gómez Almaguer



Dr. Dionicio A. Galarza Delgado
Subdirector de investigación y
Estudios de posgrado

DEDICATORIA

A MIS PADRE

Arcadio Canales Calderón y Julia Ortiz Rodríguez

Por su gran ayuda dándome la oportunidad
de realizar mis estudios en otro país, y su apoyo
Incondicional, muchas gracias.

A MI HIJO

José André Corrales Canales

Tú que eres el centro de mi vida
Y el motivo de salir adelante cada
día, todo lo hago por ti, gracias hijo

A MIS HERMANOS

Por su comprensión y apoyo
Muchas gracias

A MI ESPOSO

Bany José Corrales Molina

Gracias por tu comprensión y apoyo
Incondicional a lo largo de mi especialidad

AGRADECIMIENTOS

Dr. José Carlos Jaime Pérez

Gracias por brindarme su apoyo y asesoría en la realización de mi trabajo.

Dr. David Gómez Almaguer

Por su apoyo y haberme dado la oportunidad de poder adquirir nuevos conocimientos.

Q.C.B.E.H. Rosario Salazar Riojas

Por haberme dejado ser parte de su equipo de trabajo, por compartir sus conocimientos y buenos consejos.

Dra. Carela Sandoval Villa

Gracias por haberme brindado tu apoyo en la realización de mi trabajo

A todos los maestros de la especialidad

Dr. Luis Javier marfil Rivera, Dr. José Luis herrera, Dr. Oscar Martínez Ilano, Dr. Carlos Almaguer Gaona, Dr. Cesar Homero Gutiérrez, Dra Olga Graciela Cantú
Dra. Ma. Consuelo Mancias.

A todo el departamento de Hematología.

Q.C.B Martha Ana Reyes López Q.C.B Teresa Mayagoita Fragoso. Q.C.B. Odra Lizett Martínez Q.C.B. Nidia Orta, Q.C.B. Nereyda Méndez, T.L.C. Adriana Carrasco, Maria Guadalupe Hernández, Guadalupe Cavazos, Beatriz Roque , Ana Maria Macias, Ana Sema , Claudia Monrreal, Ivonne Hernández, Milton Reyes.

A mis compañeras de especialidad

Q.F.B. Arely Eunice Hernández Alcántara, Q.C.B.Verónica Campos Cartagena.

INDICE DE CONTENIDO

PORTADA	I
COMISION DE TESIS	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
INDICE DE TABLAS	VIII
ABREVIATURURAS Y SIMBOLOGIA	IX
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
III. HIPOTESIS	11
IV. OBJETIVO GENERAL	12
V. OBJETIVO ESPECIFICO	13
VI. CRITERIOS DE INCLUSION	14
VII. MATERIAL Y METODOS	15
7.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LAS UNIDADES	15
7.2 CORRELACION DE DATOS	15
7.3 REGISTRO DE LA MUESTRA	15
7.4 MEDICION DEL VOLUMEN	15
7.5 MEDICION DE LEUCOCITOS Y VIABILIDAD	16
7.6 RECOLECCION DE CELULAS MONONUCLEARES	17

7.7 TRANSFERENCIA DE LA MUESTRA (CAPA DE MONONUCLEARES) A BOLSA CRIOPROTECTORA	17
7.8 INFUSION DE MEZCLA CRIOPROTECTORA	18
7.9 CONGELACION	18
7.10 ALMACENAMIENTO	19
7.11 PROCEDIMIENTO DE CD34 +	19
VIII. RESULTADOS	22
IX. DISCUSION	26
X. CONCLUSIONES	27
XI. BIBLIOGRAFIA	28

INDICE DE TABLAS

TABLA	DESCRIPCION	PÁGINA
1.	critérios de inclusión usados por otros Bancos de sangre de cordón umbilical	21
2.	Rango y mediana de volumen, leucocitos totales Y células CD34+	23
3.	Correlación entre volumen y leucocitos totales	24
4.	Correlación entre leucocitos totales y células CD34+	25

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

HLA.....	Antígeno Leucocitario Humano
BMDW.....	BONE MARROW WORLDWIDE
TMO	Transplante de médula ósea
CPH.....	Células Progenitoras Hematopoyéticas
SCU.....	Sangre de cordón umbilical
BSCU.....	Banco de sangre de cordón umbilical
CU.....	cordón umbilical
ml.....	mililitro
µl.....	microlitro

I. RESUMEN

OBJETIVOS: Hay diferentes parámetros de selección de las unidades recibidas en los bancos de sangre de cordón umbilical . En este estudio se determinó la validéz de los parámetros empleados en el Banco de células de cordón umbilical del servicio de Hematología del Hospital Universitario "Dr. Jose E. Gonzalez " de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL)

MATERIALES Y METODOS: se revisaron un total de 533 unidades de sangre de cordón umbilical recibidas en el banco de sangre de cordón umbilical entre mayo del 2002 y diciembre del 2005, se determinó la correlación entre volumen y leucocitos totales comparada contra leucocitos totales y contenido de células CD34+.

RESULTADOS: se descartaron del análisis 109 muestras que no reunieron los criterios de inclusión de este estudio. Se analizaron un total de 424 unidades, el volumen medio fue de 99.9 ml y la cuenta de leucocitos totales fué de 8.37×10^8 ; el contenido total de células mononucleares CD34+ por citofluorometria fue de 1.79×10^6 , la correlación entre volumen y leucocitos totales fue de 0.73 , mientras que la de leucocitos totales y células CD34 + fue de 0.67 (esta diferencia no fue significativa).

CONCLUSIONES: aunque no existió una diferencia significativa, la selección de las unidades basada en los criterios de selección de leucocitos totales y volumen fue superior a la basada en la cuenta de células CD34+.

El empleo del método de selección de las unidades para criopreservarlas basado en la determinación de leucocitos totales y volumen es válido y representa un ahorro individual de \$170 USD por unidad y en el total de las unidades procesadas representa un ahorro aproximado de \$6,630 USD.

II. INTRODUCCION

La homeostasis del sistema hematopoyético depende fundamentalmente de la existencia de las células tronco o células tallo con capacidad para mantener la producción de células sanguíneas maduras, mediadoras de la función específicas de cada linaje hematológico.(1)

Estas células troncales, también llamadas células madre hematopoyéticas expresan diferentes moléculas o antígenos, uno de los cuales es el antígeno CD34, el cual es una proteína transmembranal que se encuentra en estas células y en el endotelio vascular (1).

Las propiedades de las células tallo quedan definidas en su concepto funcional: células capaces de autorrenovarse y diferenciarse en células progenitoras de todos los linajes hematopoyéticos. Así, en los modelos de trasplante , la infusión de células tronco y su injerto a nivel del microambiente de la médula ósea permite la reconstitución hematopoyética en individuos sometidos a tratamiento mieloablativo con quimioterapia .

En los años 70's y principios de los 80's todos los trasplantes utilizaron células recolectadas de la medula ósea de donares HLA compatibles. Los pocos trasplantes hechos con células de donadores parcialmente HLA compatibles eran relacionados con falla del injerto y una pobre evolución, excepto en algunos casos cuando la disparidad estaba limitada a un solo antígeno del sistema HLA (2).

Esto limitó la aplicación del trasplante de células hematopoyéticas al 25 -30 % de los pacientes con donadores HLA compatibles. Diferentes descubrimientos aumentaron dramáticamente la aplicabilidad del trasplante de células hematopoyéticas a los pacientes que no contaban con familiares HLA idénticos, incluyendo el uso de células autólogas, recolectadas de su propia médula ósea o sangre y el uso de donadores no relacionados.

Aunque pocos trasplantes autólogos fueron realizados antes de los años 70, el abordaje para recolectar las células de un paciente antes de la terapia con dosis altas seguida de su reinfusión no generó mucho entusiasmo hasta mediados o finales de los 80's (3).

El motivo estaba principalmente en su aplicabilidad ya que no requería la intensificación de dosis altas con soporte de células hematoyéticas en pacientes con tumores altamente sensibles a quimioterapia. El autotrasplante también se relaciona con una baja mortalidad ya que la enfermedad injerto contra huésped es menor y la recuperación inmunológica es mucho mas rápida que con el alotrasplante. De la misma manera los efectos antitumorales también están ausentes y existe alguna preocupación relacionada con la posibilidad de reinfundir células cancerosas.

Algunos estudios demostraron buenos resultados en pacientes con linfoma que fallaron en otras terapias. La tecnología se difundió rápidamente al final de los 80's y se transformó en el tratamiento de elección para pacientes con linfoma recidivante y para aquellas que tenían cáncer altamente sensible a quimioterapia pero infrecuentemente curables, como leucemia aguda, mieloma múltiple , y tumores sólidos seleccionados.

Un importante desarrollo después de la difusión de la tecnología fue la demostración que las células hematopoyéticas pueden ser recolectadas de sangre periférica en un número limitado de leucoferesis después de la movilización con quimioterapia o con factores estimulantes de colonias (granulocito, granulocito-macrofago) (4,5,6)

El producto hematopoyético resultante contiene grandes cantidades de células progenitoras y permite una rápida recuperación hematológica después del trasplante. Mientras que en 1989 – 90 el 85 % de los autotransplantes utilizaban células recolectadas de médula, en 2000-01 menos del 5 % utilizaron células de médula ósea solamente. En contraste al trasplante alogénico que aun se realiza en centros médicos de tercer nivel, los autotransplantes son realizados en un ambiente de primer nivel principalmente por la facilidad con la que el producto puede ser obtenido y parcialmente por la recuperación hematológica e inmune es más rápida y existe una menor frecuencia de complicaciones. A pesar de la disminución de los trasplantes para el cáncer de mama el número de autotransplantes aun excede el de alotransplantes.

Existen reportes anecdóticos sobre el uso de trasplante de células hematopoyéticas utilizando donadores HLA compatibles desde 1973 (7). Pero el polimorfismo del sistema HLA provoco que la posibilidad de encontrar un donador compatible fuera baja. A mediados de 1980 diferentes grupos nacionales e internacionales organizaron registros de donadores voluntarios de médula ósea con paneles de anticuerpos anti HLA. Actualmente existen cerca de 8 millones de donadores voluntarios de médula ósea o células tallo en el

mundo entero, permitiendo el acceso a los donadores a través de un compendio coordinado por el registro mundial de donadores de médula ósea, por su siglas en inglés (BMDW) (8). Después de encontrar la existencia de un posible donador, los donadores son localizados a través de BMDW de acuerdo a las políticas del registro en que fueron inscritos. EL registro más numeroso es el de los Estados Unidos que contiene más de tres millones de donadores (9).

Los pacientes caucásicos tienen un 80% de más posibilidades de encontrar un donador HLA compatible. Debido al menor grado de polimorfismo y a la presencia de menos donadores de grupos étnicos en el registro, pacientes no caucásicos tienen menores posibilidades de encontrar una médula compatible.

La creación de estos registros favoreció el desarrollo de más trasplantes de donadores no relacionados. En 1985 menos del 10% de los pacientes a quienes se realizó un trasplante de médula ósea (TMO) lo recibieron de donadores no relacionados, mientras que en 2000-2001 correspondió al 30% (11,12). Actualmente se realizan más de 1400 trasplantes anuales de donadores no relacionados en Estados Unidos. En algunos casos la supervivencia después del TMO de donador no relacionado es similar al de los gemelos idénticos, aunque los riesgos de enfermedad injerto contra huésped y falla del injerto es mayor (10,11).

El trasplante de médula ósea de donador no relacionado tiene un tiempo de espera mayor, lo que depende del tiempo que se requiere para la búsqueda del donador así como por la mayor dificultad que implica realizar este tipo de abordaje al principio de la enfermedad.

Experimentos y recientes estudios clínicos sugieren que la sangre de cordón umbilical es rica en progenitores hematopoyéticos y puede ser una buena fuente de células hematopoyéticas alogénicas para personas que no cuentan con un donador HLA compatible (12). La utilidad de este recurso radica en el hecho de que existen muchas unidades de cordón disponibles.

En 1974 Knudtzon (13) comunicó que la sangre placentaria poseía la capacidad de formar colonias granulocíticas. El uso potencial de estas células de cordón umbilical como fuente de células hematopoyéticas fue propuesto en 1982 en discusiones privadas por Edward Boyse, Hal E Broxmeyer y Judith Bard (14). Después de estas discusiones un número de estudios *in vitro* con cordones humanos fueron realizados para documentar esta posibilidad. Estudios iniciales utilizaron progenitores de células hematopoyéticas y sirvieron como base para los estudios de células madre y para comparar números de células primitivas en el cordón umbilical contra aquellas encontradas en la médula ósea (15). Específicamente, estos estudios evaluaron la capacidad de los obstetras no entrenados para recolectar células de cordón que fueran bacteriológica y micotícamente limpias, determinar el rango y volumen promedio de células de cordón recolectadas, y cuantificar el número total de células nucleadas y células hematopoyéticas utilizando cultivos *in vitro* tras el manejo de la unidad (15).

Durante el curso de estos experimentos un número de células de cordón umbilical fueron criopreservadas y almacenadas en taques de nitrógeno líquido en la Universidad de Indiana para un posterior uso clínico potencial. Estos estudios fueron seguidos por experimentos en los que ratones letalmente

irradiados recibieron trasplante de sangre de donadores a término o pretermino. Dado que no es posible obtener células de cordón de ratones por el tamaño de la placenta, lo mas cercano fue obtener células de productos a termino o pretermino que podría ser equivalente a la sangre de cordón.

Se demostró que la sangre de ratón a término o pretermino contenía suficiente cantidad de células hematopoyéticas capaces de reestablecer la hematopoyesis (15). El primer trasplante de cordón se realizo a un niño de 5 años de edad con anemia de Fanconi por Gluckman y colegas en Octubre de 1988 (16). El cordón de un paciente HLA idéntico fue colectado por Dirham, Gordon y Douglas en la universidad de New York y fue enviado a la universidad de Indiana donde fue criopreservada por el laboratorio de Broxmeyer y enviada mas tarde a Paris, donde el paciente recibió el régimen de preparación para el trasplante de médula ósea (17). El paciente tuvo un injerto favorable y la producción de hematopoyesis del donador y no tuvo mayor manifestación de su enfermedad de base. Años más tarde en 1994, Kurtzberg (18) y cols. efectuaron el primer trasplante con células progenitoras hematopoyéticas (CPH) de cordón umbilical (CU) no relacionado. A partir de esa fecha y en especial en la segunda mitad de la década del 90's se asiste a un aumento significativo en el número de este tipo de trasplantes. Después de este y otros ensayos, trasplantes de cordón se han realizado exitosamente. Actualmente más de 70,000 unidades de cordón umbilical se encuentran almacenadas con al menos 2000 trasplantes de cordón umbilical realizadas en el mundo entero (19,20).

Un número de técnicas han sido propuestas para una óptima recolección de células de cordón, para ser considerada una óptima unidad de células de cordón debe de contener suficiente volumen de sangre total, de células nucleadas, y células CD34+, además la unidad debe de contener un número bajo de células T maternas y estar libre de agentes infecciosos. (21).

La sangre del cordón umbilical, que habitualmente se desecha, contiene un importante número de CPH (22) unidades formadoras de colonia granulocitos macrófagos, unidades formadoras de colonia de megacariocitos, que dan origen a las distintas células de la sangre. Este hecho ha motivado que las células progenitoras hematopoyéticas contenidas en la sangre de cordón umbilical (SCU) sean consideradas como una fuente de hematopoyesis alternativa en el tratamiento de ciertas enfermedades que requieren trasplante de médula ósea.

En estudios biológicos realizados en todo el mundo entre 1985 y 1992 se encontraron importantes ventajas en la utilización de la sangre de cordón entre otras, que la proporción de las CPH presentes en la sangre de cordón umbilical era similar a la de la médula ósea del adulto, que mantenían su viabilidad durante dos o tres días a temperatura ambiente y después de ser sometidas a un proceso de criopreservación tienen una mayor capacidad clonogénica para formar colonias y que la cantidad de dichos progenitores contenidos en una sola donación era suficiente para realizar con éxito un trasplante (23).

A partir de esos estudios, aparecieron los primeros bancos de sangre de cordón umbilical (BSCU), que en la actualidad son centros dedicados a la recolección, procesamiento, estudio, criopreservación y validación de sangre de cordón para

uso clínico, principalmente en trasplante para restaurar la médula ósea. El trasplante de células de cordón umbilical constituye una invaluable oportunidad para aquellos pacientes, principalmente niños, que sufren diversas enfermedades hematológicas y genéticas: leucemias linfoides y mieloides, anemia de Fanconi, anemia aplásica. Síndrome de Hunter, síndrome de Wiskott-Aldrich, beta talasemias y neuroblastoma (24,25,26,27,28,29).

El trasplante permite conservar la vida del sujeto con un nivel aceptable de salud, reincorporarlo a su ámbito productivo y disminuir los gastos que le generan los tratamientos sustitutos .

El uso de células hematopoyéticas procedentes de cordón umbilical, es una alternativa eficaz para el tratamiento de los padecimientos antes descritos, ya que es un producto biológico fácil de obtener al momento del parto o de la cesárea, sin que se ponga en riesgo la salud de la madre o del recién nacido.

El primer banco de sangre de cordón umbilical de donadores voluntarios no emparentados se fundó en 1992 y para 1995 se fundó el grupo Eurocord (30,31), con sede en París, con la finalidad de crear un registro de trasplantes de sangre de cordón umbilical con un seguimiento de los pacientes y un foro para el desarrollo de estudios cooperativos.

Al mismo tiempo se creó el grupo NETCORD, constituido en 1998 y formalizado en 2000, que es una red internacional de bancos, capaz de buscar en todo el inventario mundial la unidad de sangre de cordón que se requiera, así como establecer normas de buena práctica y cooperación de los bancos y los centros de trasplantes. Esta red internacional ha desarrollado los estándares

NETCORD/FACT (Foundation for the Accreditation of Hematopoietic Cell Therapy), que actualmente dictan el funcionamiento de los bancos de sangre de cordón umbilical en el mundo (19). La cantidad de unidades de sangre de cordón umbilical recolectadas a nivel mundial hasta enero de 2004, según datos de NETCORD es de 78,356, de las cuales se habían efectuado un total de 2,530 trasplantes, 1674 en niños y 854 en adultos(19)..

Luego de los trabajos pioneros de Rubinstein (32) y cols. en la organización de bancos de CPH de CU, han surgido otros bancos creados en diferentes países (33,34,35) muchos de los cuales funcionan en red, tal como lo es EUROCORD.

En el año 2002 nuestro banco de células de cordón del Hospital Universitario, "Dr. Jose E. Gonzalez " de la UANL comenzó su experiencia de obtención, estudio, procesado y criopreservación de células hematopoyéticas progenitoras.

III. HIPOTESIS

- **H1**

- Existe una correlación entre el volumen obtenido, la cuenta de leucocitos totales y células CD34+ en la sangre de cordón umbilical.

- **H0**

- No existe correlación entre el volumen obtenido, la cuenta de leucocitos totales y células CD34+, en la sangre de cordón umbilical

IV. OBJETIVO GENERAL

- **Determinar cual es el volumen mínimo de sangre de cordón umbilical que se requiere para obtener una cantidad adecuada de células CD34 +, que justifique la criopreservación de la sangre de cordón umbilical.**

V. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer cuales criterios de selección en el BSCU son ideales y a la vez prácticos para criopreservar las unidades de sangre de cordón umbilical recibidas.

- Validar los criterios de selección que se emplean en este banco en la actualidad.

VI. CRITERIOS DE INCLUSION

- **INCLUSION**: se incluyeron en este estudio muestras que contaban con los siguientes datos:
 - Volumen ml.
 - Leucocitos totales $\times 10^6$
 - CD34 $\times 10^6$

- **EXCLUSION**: muestras que carecían de alguno de los datos anteriores.

VII. MATERIALES Y METODOS

7.1 Criterios de selección de las unidades

Se revisaron en forma retrospectiva los expedientes de Mayo del 2002 a Diciembre del 2005 de los cuales se seleccionaron de acuerdo a los siguientes parámetros: volumen, leucocitos totales, y células CD34 +. Las unidades que cumplieron con todos los criterios de inclusión fueron 424 (79.5%) ; ciento nueve unidades (21.5 %) fueron excluidas por no cumplir con alguno de los criterios mencionados.

La Tabla 1. muestra los diferentes criterios de inclusión empleados en otras instituciones.

7.2 Correlación de datos

Se utilizo el programa estadístico Excel usando el coeficiente de correlación y estadística descriptiva.

Procedimiento de congelación de cordón umbilical

7.3 Registro de la muestra

Se le asigno un número de registro, registrándolo en el diario de entrada del banco del diario de células hematopoyéticas dándole un folio correspondiente.

7.4 Medición del volumen

Se pesa la bolsa, quitándole el aire necesario, calculando el volumen, restando el peso de la bolsa (28.5g) entre la densidad de la sangre 1.058 g/ml. que da el total en mL. Ejemplo.

124g (peso de la bolsa con la muestra) – 28.5 g (peso de la bolsa sola) /
1.058g/ml = 90.26 mL.

7.5 Medición de leucocitos totales y viabilidad.

Se trabajó en una campana de flujo laminar usando guantes estériles y cubrebocas, se tomó una alícuota (1.5 ml) de la muestra para hacer los siguientes análisis : HLA, viabilidad, biometría hemática.

La viabilidad se realizó haciendo una dilución 1:10 50 µl de la muestra con 450 µl solución salina, y después tomando 100 µl de la dilución, y 100 µl del colorante (azul de tripano) se cargo en la cámara de Neubauer, se observó al microscopio en el recuadro de conteo de eritrocitos, contando 100 células, obteniendo un porcentaje de células vivas, las células teñidas se cuentan como muertas y las no teñidas como vivas, haciendo una regla de tres.

Ejemplo.

$$\frac{100}{95 \text{ vivas}} = \frac{100\%}{X} \quad = 95\% \text{ viabilidad}$$

La Biometría Hemática se realizo en un aparato CellDyn 3200 Abott® (Park IL., USA) calculando la cantidad de leucocitos totales, convirtiendo primero los leucocitos de microlitos a mililitros, multiplicando por el volumen total de la bolsa, ejemplo:

Cuenta de WBC totales $\times 10^8$ = cuenta WBC K/ µl $\times 1000 \times 1000 \times \text{vol. Bolsa}$

WBC = 11.5 K/ µl

Volumen de bolsa = 143.1 ml

WBC T: $11.5 \times 1000 \times 1000 \times 143.1$

WBC T: 16.4×10^8

7.6 Recolección de células mononucleares

1. Se calcula la cantidad de hidroxietilalmidón (Hestar al 6%) que se va agregar, lo cual se hace dividiendo el volumen total de la bolsa entre 5.
2. Se agrega el Hestar al 6%
3. Se transfiere la muestra a tubos falcón de 50 mL .
4. Se centrifuga a 3500 rpm por 13 min. a 6°C.
5. Se prepara la mezcla crioprotectora a un volumen total de 50 ml , con 30 ml. de medio 199 (GIBCO) , 10 ml. de DMSO al 10% (Edward Lifesciences) , 10 ml. de albúmina (Baxter) y se refrigera a 4°C por 15 minutos
6. Con una pipeta estéril se retira parte del plasma , pasándolo a tubos estériles, dejando de 2.5 a 5 ml de plasma por arriba de la capa de leucocitos.
7. Se recolecta la capa de leucocitos y juntando todas las capas en solo tubo estéril, se le tomo una pequeña alícuota para realizar el conteo de CD34+ y el porcentaje de recuperación, que debe ser mayor del 60%.

(%recuperación = WBC total en la capa X100 entre WBC inicial)

7.7 Transferencia de la muestra (capa de mononucleares) a bolsas crioprotectoras

1. Se transfieren las muestras en alícuotas de 10 ml a las bolsas crioprotectoras de 50 ml con ayuda de una aguja de raquia # 18 , y se colocan las bolsas en refrigeración a 4°C por 15 minutos.
2. Posteriormente con una jeringa de 5 ml. estéril se toma 5 mL. del plasma sobrante y se le agrega al tubo que contenía la capa recolectada, se agita y se

carga la jeringa , con esta ultima se punciona el frasco para cultivo Ruiz – Castañeda, para el cultivo microbiológico.

3. Después se toman alícuotas con pipetas estériles del plasma y el paquete globular para hace un recuento celular.

7.8 Infusión de mezcla crioprotectora

1. Se le agrega la mezcla crioprotectora en volúmenes iguales a las bolsas de criopreservación con una jeringa de 20 ml , de manera lenta y mezclando, a la mezcla se agrega en lapsos por minuto hasta agregar el total en 10 min., al terminar se eliminan las burbujas , en este paso se procesan las crio bolsas y la jeringa con la mezcla crioprotectora , sobre crio-geles para evitar que la muestra pierda temperatura afectando la viabilidad celular.

2. Se sellaron las bolsas con el sellador automático, dejando dos segmentos de aproximadamente una pulgada en la manguera para posteriormente medir la viabilidad.

7.9 Congelación

1. Se procede a la congelación en el equipo Criomed freezer de Thermo Forma (Marieta, Ohio. USA) se abre la llave del nitrógeno liquido para que este pueda entrar a la cámara .

2. Se colocan las muestras en la plancha , colocando el sensor de temperatura entre la muestra y la tapa de la plancha .

3. Se cierra la puerta y se selecciona el procedimiento “cord 1” inicial, y se oprime la tecla “run” para iniciar el paso 1.

4. Se espera que la temperatura llegue a 20 °C , oprimir la tecla "run" para proseguir con el paso 2 (los demás pasos se realizan automáticamente por el equipo que consiste en el descenso controlado de la temperatura hasta -90°C)

7.10 Almacenamiento

Al terminar la congelación, las muestras se colocan en cassettes correctamente identificados y se colocan en los racks y se sumergen en nitrógeno líquido, asignándole un lugar de almacenamiento.

7.11 Procedimiento de conteo de células CD 34+.

1. Encienda el citómetro de acuerdo a las instrucciones.
2. Seleccione el programa ProCOUNT CD34. (Beckton Dickinson San Jose CA, USA)
3. Ajuste la cuenta celular del producto de aféresis a 20 000 – 30 000 células/mm³ con diluyente FACsFlow (Beckton Dickinson San Jose CA, USA).
4. Añada a cada tubo Tru COUNT (Beckton Dickinson San Jose CA, USA) ,10 µl del anticuerpo monoclonal Dye/ CD34/45 (Beckton Dickinson San Jose CA, USA) al primer tubo y Dye/γ₁/CD45 (Beckton Dickinson San Jose CA, USA) al segundo. El anticuerpo debe añadirlo en el fondo del tubo, dejar caer la gota en la pared y sin tocar la malla metálica.
5. Agregue 50 µl de la muestra, previamente ajustada en el paso número 2, a cada uno de los tubos con la técnica del pipeteo invertido.
6. Incube por 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad.
7. Transcurrido este tiempo, añada 1,000 µl de la solución de lisis a cada uno de los tubos e incube 10 minutos a temperatura ambiente.

8. Después de éste tiempo los tubos ya están listos para leerse en el equipo citómetro de flujo (Beckton Dickinson San Jose CA, USA). Al llevar a cabo la lectura en el Citómetro de flujo, deberá leerse primero el tubo marcado como Dye/CD34/CD45 y posteriormente el Control.

9. Leerlo en el citómetro de flujo.

Tabla 1. Criterios de inclusión usados por otros bancos de sangre de cordón umbilical.

INSTITUCION	VOLUMEN	LEUCOCITOS TOTALES
Centro de la Transfusión Sanguínea, México DF.	≥80 ml	≥ 8 x 10 ⁸
Shangdong Cord Blood Stem Cell Center, China.	≥60 ml	≥8x10 ⁸
BSCU de Barcelona, España	≥80 ml	≥8 x 10 ⁸
BSCU del Hospital Universitario de la UANL, Mty, México	≥ 80 ml	≥ 8 x10 ⁸

VIII RESULTADOS

Se estudiaron un total de 533 muestras, de las cuales 109 (21.5 %) muestras fueron excluidas del análisis final por no haber cumplido con alguno de los requisitos de inclusión. Se analizaron un total de 424 (79.5 %) muestras calculando la mediana y el rango mostrados en la tabla 2.

Se hizo una correlación de datos entre volumen y los leucocitos totales encontrando una correlación de 0.73 (Tabla 3), y una correlación de 0.67 entre leucocitos totales y células CD34 + (Tabla 4). La diferencia no fue estadísticamente significativa.

Tabla 2. Rango y mediana de volumen, leucocitos totales y células CD34+.

	CORDONES ESTUDIADOS n = 424
VOLUMEN	
MÁXIMO	192.91 ml
MÍNIMO	27.5 ml
MEDIANA	99.88ml
LEUCOCITOS TOTALES X10⁸	
MÁXIMO	31.45
MÍNIMO	0.95
MEDIANA	8.37
CD34 X10⁶	
MÁXIMO	19.38
MÍNIMO	0.08
MEDIANA	1.79

Tabla 3. Análisis de la correlación entre leucocitos totales y volumen. Se documentó una correlación de 0.73

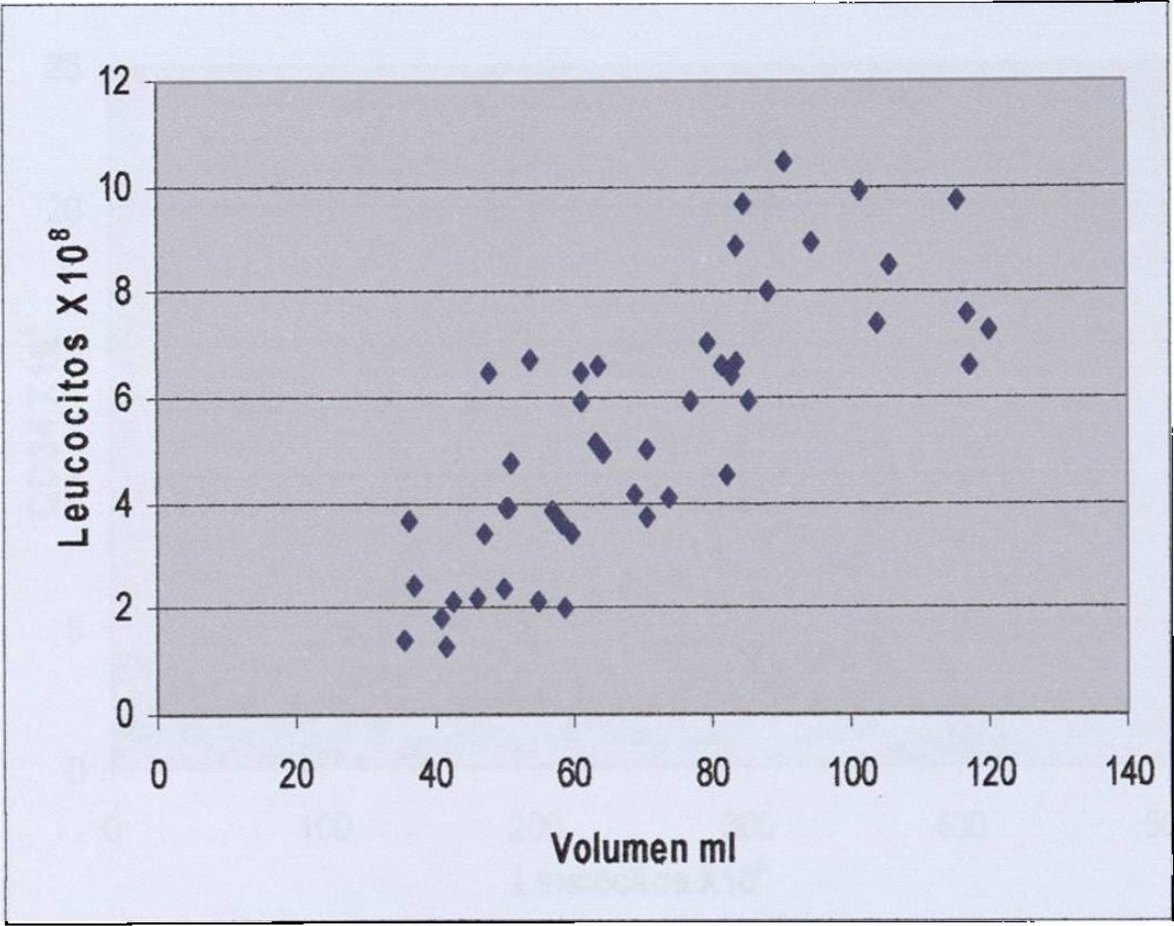
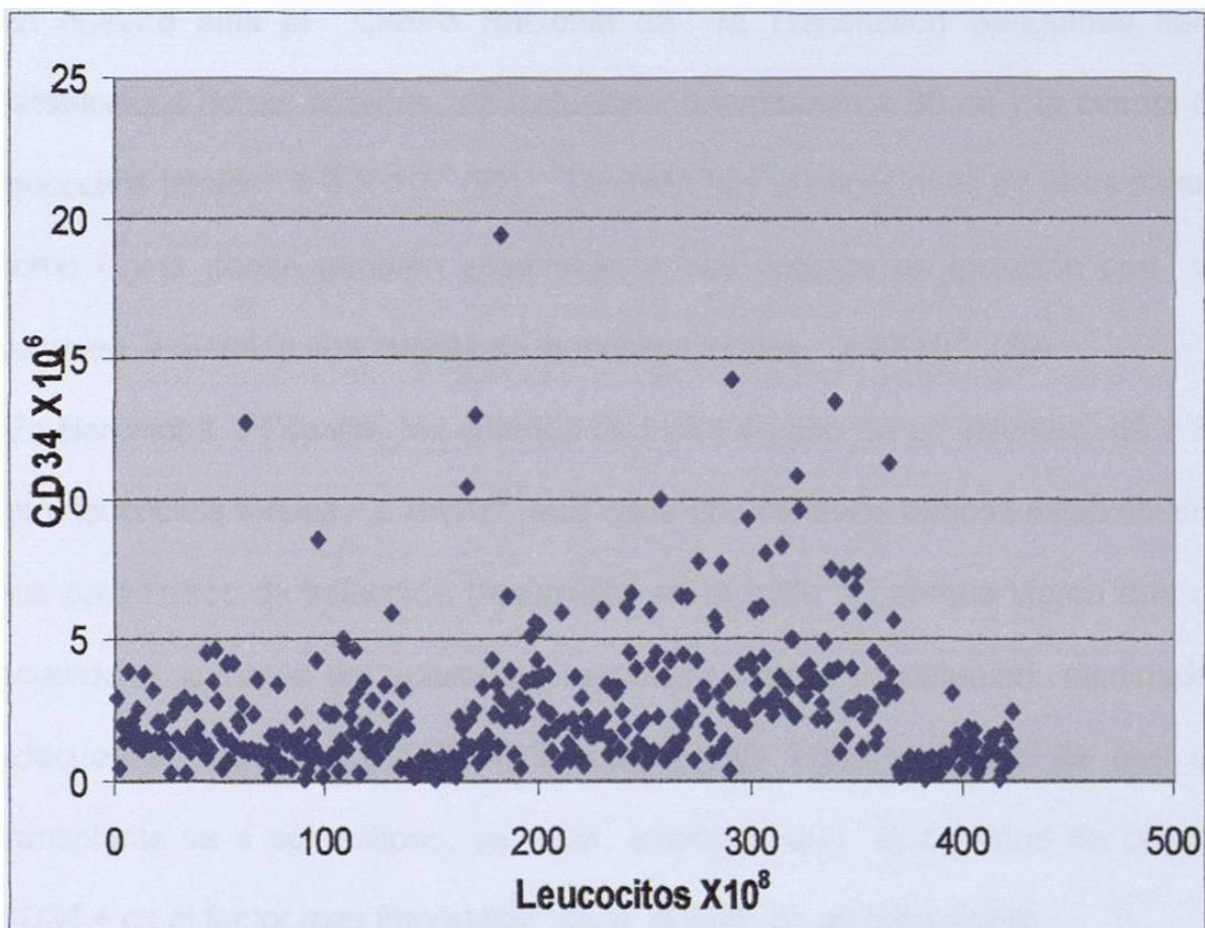


Tabla 3. Análisis de la correlación entre leucocitos totales y células CD 34 X10⁶. Se documentó una correlación de 0.67



IX DISCUSION

Diferentes estudios se realizan en distintos laboratorios, ya que cada banco hace sus estudios para validar sus parámetros de selección (36,37,38).

En nuestro país el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea tiene establecidos como criterios de inclusión un volumen ≥ 80 ml y la cuenta de leucocitos totales $\geq 8 \times 10^8$ (22) . También hay publicaciones de otros países como China donde también establecieron sus criterios de inclusión con un volumen ≥ 60 ml y una cuenta de leucocitos totales $\geq 8 \times 10^8$ (39)

En Barcelona , España los criterios de inclusión son de un volumen de ≥ 80 ml y leucocitos totales $\geq 8 \times 10^8$ (40) cada uno de estos bancos establecieron sus parámetros de selección (resumidos en la tabla 1.) porque vieron que de acuerdo al aumento del volumen y leucocitos totales se obtenían cantidades adecuadas de células CD34+, lo cual es un buen indicador de que un trasplante va a ser exitoso, ya que sabemos que la cantidad de células CD34 + es el factor mas importante para el éxito de un trasplante.

En nuestro banco de cordón del Hospital Universitario se establecieron criterios de selección que fueran fáciles de medir y de bajo costo, y que fueran indicadores de una buena cantidad de células CD34+; por lo anterior se escogieron, como en otros bancos del mundo el volumen y la cantidad de leucocitos totales. En proposito de este estudio fue de comprobar que los parámetros utilizados tenían correlación, con el numero de células CD34+, es decir que los parámetros seleccionados si son adecuados y no simplemente elegidos al azar

X CONCLUSIONES

La correlación de datos entre volumen y leucocitos totales fue mejor que entre leucocitos totales y células CD34 $\times 10^6$. Considerando que para el procesamiento de la sangre de cordón hay que tomar una decisión rápida con respecto a la congelación se tienen que emplear parámetros fáciles de medir y de bajo costo, además si se toma como criterio único o principal de selección el conteo de células CD34+ se genera un gasto más grande para el banco de sangre de células de cordón umbilical.

Estos resultados permiten comprobar que los criterios de criopreservación actuales de nuestro banco (volumen ≥ 80 ml y leucocitos totales $\geq 8 \times 10^6$) son adecuados para proceder a la congelación.

Anteriormente se tomaba el parámetro de cantidad de células CD 34+ como criterio de selección de las unidades recibidas, y esto generaba un gasto adicional, ya que cada determinación de CD34 tiene un costo de \$170 USD; si consideramos las unidades a las que no se les ha realizado el conteo de células CD34, se ha logrado un ahorro aproximado \$6,630 USD.

XI BIBLIOGRAFIA

1. Mancias Guerra C. Banco de Sangre de Cordón Umbilical, En: La Sangre y sus enfermedades, Jaime Perez JC, Gomez Almaguer. 1ª edición 2004, Mc Graw Hill, Monterrey, Nuevo León
2. Beatty PG, Clift RA, Mickelson EM et al. Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings: effect of T cell depletion. *Bone Marrow Transplant* 1991; 7: 443-52.
3. Appelbaum FR, Herzig Gp, Ziegler JL, Graw Rg, Levine AS, Deisseroth AB. Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. *Blood* 1978; 52:85-95
4. Reiffers J, Bernanrd P, David B et a al. Successful autologous transplantation with peripheral blood haemopoietic cells in a patient with acute leukaemia. *Exp hematol* 1986 ; 14:312-5
5. Korbling M, Dorken B, Ho AD, Pezzuto A, Hunstein W, Fliedner TM. Autologous transplantation of blood -derive hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood* 1986;67:529-32
6. Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Weisenberger DD. Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cells. *Exp hematol* 1986;14:192-6
7. Speck B, Zwaan FE, van Rood JJ, Eernise JG. Allogeneic bone marrow transplantation in a patient with aplastic anemia using a phenotypically HLA-identical unrelated donor. *Transplantation* 1973; 16:24-8

-
- 8 .Oudshoorn M, Leeuwen A, van Zanden HGM, Van Rood JJ. Bone marrow donors worldwide: a successful exercise in international cooperation . Bone Marrow transplant 1994;14: 3-8.
 9. Dodson KL, Coppo PA, Confer DI. The National Marrow Donor program : improving acces to hematopoietic stem cell transplantation . Clinical Transplants 1999: 121-7
 10. Ash Rc, Casper JT, Chitambar CR et al. Successful allogeneic transplantation of T-cell depleted bone marrow from closely HIA –matched unrelated donors. N. Engl J Med 1990;32:485-94.
 - 11 .Kernan NA, Bartsch G, Ash RC et al. Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program . N Engl J Med 1990;32:485-94
 12. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham MI et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. N Engl J Med 1996; 335:157-66
 13. Knudtson S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. Blood 1974; 43: 357- 61.
 14. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hemopoietic stem / progenitors cells. Proc. Natl. Acad. SCI. USA 1989; 86: 3828-32.
 15. Broxmeyer HE, Kurtzberg J, Gluckman E et al. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation . Blood Cells 1991; 17:313-29

-
16. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *New Eng. J. Med.* 1989; 321: 1174-8.
 17. Broxmeyer HE, Introduction .the past , present and future of l cord blood transplantation . In: Broxmeyer HE, ed cellular characteristics of cord blood and cord blood transplantation . Bethesda , MD : AABB Press, 1998 : 1-9.
stem and repopulating cells in human clinical transplantation . *Blood Cells* 1991; 17:313-29
 18. Kurtzberg J, Graham M, Casey J, et al. The use of umbilical cord blood in mismatched related and unrelated hemopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells* 1994; 20: 275-84.
 - 19 .Gluckman E. hematopoietic stem-cell transplant using umbilical –cord blood . *N Engl J Med* 2001;344:1860-1
 20. Ballen K. Broxmeyer HE. , McCullough J et al. Currents status of cord blood banking and transplantation in the united States and Europe . *Biol Blood Marrow Transplant* 2001 ; 7:635-45
 21. Scaradavou A, Carrier C, Mollen N, Stevens C, Rubinstein P. Detection of maternal DNA in placental/ umbilical cord blood by locus –specific amplification of the noninherited maternal HLA gene . *Blood* 1996;88:1494-500
 22. Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea
www.salud.gob.mx/unidades/cnts

-
23. Nakahata T, Ogawa M. Hemopoietic colony – forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono and multipotential hemopoietic progenitors.. J Clin. Invest. 1982; 70: 1324-
24. Advisory Committee of International Bone Marrow Transplant Registry. Report from the International Bone Marrow Transplant Registry. Bone Marrow Transplant 1989; 4:221-8.
24. Devergie A, Apperley JF, Labopin M, et al. European results of matched unrelated donor bone marrow trans-plantation for chronic myeloid leukemia. Impact of HLA-Class II matching. Bone Marrow Transplant 1997; 20: 11-9
26. Deeg HJ, Leisenring W, Storb R, et al. Long term outcome after marrow transplantation for severe anemia. Blood. 1998; 91: 3637-45.
- 27 .Goldman JM, Schmitz N, Niethammer D, Gratwohl A. Allogeneic and autologous transplantation for haema-tological diseases, solid tumors and immune disorders current practice in Europe in 1998. Bone Marrow Transplant 1998; 21: 1- 8.
28. Russell JA, Larratt L, Brown C, et al. Allogeneic blood stem cell and bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia and myelodysplasia: influence of stem cell source on outcome. Bone Marrow Transplant 1999; 11: 1177-83.
29. Armitage J. Bone Marrow Transplantation. N. Engl. J. Med. 1994; 330: 827-
- 38

-
30. Gluckman E, Roche V, Chastang C and the Eurocord Group. European result of unrelated cord blood transplants. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21 (Suppl 3): S87-S91.
31. Kögler G, Callejas J, Hakenberg P et al. Hematopoietic transplant potential of unrelated cord blood : critical issues. *J Hematother* 1996; 5: 105-6.
32. Rubinstein P, Taylor PE, Scaradavou A, et al. Unrelated placental blood for bone marrow reconstitution: organization of the placental blood program. *Blood Cells* 1994; 20: 587-600
33. Hakenberg P, Sirchia G, Garcia J, Wernet P. A location conflicts in cord blood transplantation: an evaluation of matching criteria of cord blood specimen and its impacts on the work flow within an international CB Network (Abstract). *Exp Hematol* 1997; 25: 827.
34. Sirchia G, Contreras M, Garcia J, et al. Netcord: a model of network linking placental blood banks (Abstract). *J Hematother* 1997; 6: 371.
35. Kögler G, Sarnowski A, Wernet P. Volume reduction of cord blood by Hetastarch for long term stem cell banking. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22 (Suppl 1): S14-S15
36. Pilar Solves, maternal ,Neonatal and collection Factors Influencing the haematopoietic content of cord Blood Units ,*Acta Haematol*, 2005;113:241-246
37. Col PS Dhot, Collection, Separation, Enumeration and Cryopreservation of Umbilical Cord Blood Haematopoietic Stem Cells - An Experimental Study. *MJAFI* 2003; 59 : 298-301

38. Rogers I, Sutherland Human UC-blood banking: impact of blood volume, cell separation and cryopreservation on leukocyte and CD34(+) cell recovery .Cytotherapy. 2001;3(4):269-76.

39. Zhou SL. Operating Procedure of Collection, Processing and Preservation of 3000 Units Umbilical Cord Blood in Shangdong Cord Blood Bank . Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2001 Jun;9(2):153-159.

40 .Banco de sangre de cordón umbilical de Barcelona



DONAT VO

