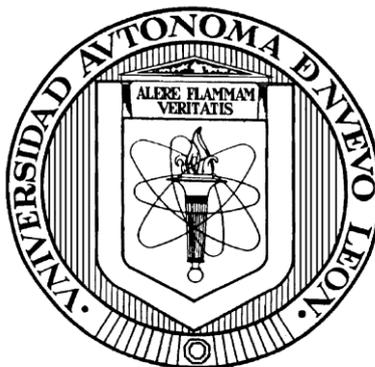


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**IMPLEMENTACION DE UNA TECNICA PARA EL DESARROLLO DE LOS
CULTIVOS CELULARES EN MUESTRAS DE CELULAS DE CORDON
UMBILICAL DEL BANCO DE CORDON DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO.**

T E S I S

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

PRESENTA:

Q.C.B. MARIA GUADALUPE CEPEDA CEPEDA

MONTERREY, N.L.

MAYO 2010

**IMPLEMENTACION DE UNA TECNICA PARA EL DESARROLLO DE LOS
CULTIVOS CELULARES EN MUESTRAS DE CELULAS DE CORDON
UMBILICAL DEL BANCO DE CORDON DEL HU.**

Aprobación de Tesis:

Dr. med. José Carlos Jaime Pérez

Dr. David Gómez Almaguer

Dr. Dionicio A. Galarza Delgado
Subdirector de
Estudios de Posgrado

TABLA DE CONTENIDO

1. GLOSARIO DE TERMINOS	7
2. RESUMEN	9
3. ANTECEDENTES	11
4. JUSTIFICACION	16
5. HIPOTESIS	21
6. OBJETIVOS	22
7. CRITERIOS DE INCLUSION	23
8. CRITERIOS DE EXCLUSION	24
9. MATERIAL Y METODOS	25
8.1. METODOLOGIA	27
10. RESULTADOS	36
11. DISCUSION	44
12. CONCLUSION	47
13. ANEXOS	48
14. REFERENCIAS	52

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1.	Esquema general de la hematopoyesis	13
2.	Distribución del cultivo en la caja de Petri	33
3.	Distribución del cultivo en la incubadora	33
4.	Figura del microscopio invertido	34
5	Muestra los tres tipos de colonias observadas en el cultivo	37

INDICE DE TABLAS

TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1.	Factores de crecimiento hematopoyéticos	14
2.	Principales factores de crecimiento mielopoyéticos	15
3.	Unidades seleccionadas para la realización del cultivo, del período 2002 al 2009	27
4.	Unidades seleccionadas para la realización del cultivo, del período de marzo a abril del 2009	28
5.	Volúmenes de siembra a utilizar en los cultivos celulares	29
6.	Hoja de trabajo de los cultivos clonogénicos	30
7.	Hoja de reporte de los cultivos	35
8.	Resultados obtenidos para poblaciones cultivadas en el período del 2009 y las poblaciones cultivadas del período 2002 al 2009.	36

INDICE DE GRAFICAS

GRAFICA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1.	Desarrollo de la E-Clone en la población de marzo del 2009	38
2.	Desarrollo de la E-Clone en la población del período del 2002 al 2009	39
3.	Correlación de la E-Clone desarrollada en los cultivos del período de la población de marzo del 2009, con las células CD34 ⁺ totales críopreservadas.	40
4.	Correlación de la E-Clone desarrollada en los cultivos del período de la población del 2002 al 2009, con las células CD34 ⁺ totales críopreservadas.	41
5.	Correlación de la viabilidad por azul de tripano contra la E-Clone del período de marzo del 2009, con las células CD34 ⁺ totales críopreservadas.	42
6.	Correlación de la Viabilidad por azul de tripano contra la E-Clone del período del 2002 al 2009, con las células CD34 ⁺ totales críopreservadas.	43

GLOSARIO DE TERMINOS ⁽⁵⁾

BFU-E: (Unidad formadora de colonias eritroides)

CFU: (Unidad formadora de colonias)

CFU-GM: (Unidad formadora de colonias granulocíticas y macrofágicas)

CFU-Mix: (Unidad formadora de colonias mieloeritroides)

CLONE: (Eficiencia clonogénica de las células CD34⁺)

GM-CSF: (Factor estimulante de colonias granulo-monocíticas)

G-CSF: (Factor estimulante de colonias granulocíticas)

CPH: (Células progenitoras hematopoyéticas)

SCU: (Sangre de cordón umbilical)

EPO: (Eritropoyetina)

CSF: (Factor estimulante de colonias)

IL: (Interleucinas)

CMH: (Célula madre hematopoyética)

TPO: (Trombopoyetina)

FCM: (Factores de crecimiento mielopoyéticos)

O₂: (Oxígeno)

CO₂: (Dióxido de carbono)

USCU: (Unidad de sangre de cordón umbilical)

CMN: (Células mononucleares)

BH: (Biometría hemática)

μL: (Microlitro)

mm: (Milímetro)

mL: (Mililitro)

CC: (Cultivo Clonogénicos)

CMH: (Células Madre Hematopoyéticas)

IMDM: (Is cove's Modified Dulbecco's Media)

PH: (Progenitores hematopoyéticos)

MO: (Medula ósea)

SP: (Sangre periférica)

FLT3-L: (Ligando de tirosina-kinasa 3 de hígado fetal)

°C: (Grados centígrados)

V/V: (Volumen/Volumen)

%: (Porcentaje)

min.: (Minutos)

Sg: (Segundos)

RESUMEN

ANTECEDENTES: La célula madre es una célula maestra que da origen a los componentes clave de la sangre y el sistema inmunitario de los seres humanos. Estas células son conocidas como células progenitoras hematopoyéticas (CPH), células troncales o células CD34⁺ y son las células sanguíneas primitivas que aun no se han diferenciado. El cultivo celular es muy adecuado como modelo para el estudio del desarrollo y la diferenciación de estas células para determinar la capacidad de diferenciación en las distintas líneas celulares.

OBJETIVO: Demostrar mediante la técnica de cultivo celular que las unidades de sangre de cordón umbilical almacenadas en el banco de células de cordón del servicio de hematología del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González son adecuadas para desarrollar unidades formadoras de colonias (UFC), para así asegurar el éxito del trasplante.

MATERIAL Y METODOS: Se analizaron 20 unidades de progenitores hematopoyéticos de sangre de cordón umbilical, de las cuales 10 fueron unidades congeladas y las 10 restantes fueron de células de SCU frescas. Se analizó la capacidad de las células de desarrollar las diferentes UFC para determinar la (E-CLONE) en cada unidad demostrando las unidades adecuadas para lograr un buen injerto en el trasplante de las células de SCU almacenadas.

RESULTADOS: Se observaron mejores desarrollos en aquellas unidades que fueron de reciente ingreso al banco de cordón umbilical y que aun no eran criopreservadas, así como también se demostró la ausencia de contaminación en las unidades cultivadas.

CONCLUSIÓN: La técnica de cultivo fue adecuada para observar el desarrollo de las células presentes en las unidades de sangre de cordón umbilical, lo que permite seleccionar unidades que reúnen los requisitos para asegurar un trasplante exitoso.

ANTECEDENTES

LA SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL (SCU)

El trasplante de sangre de cordón umbilical se ha convertido en una alternativa al trasplante de medula ósea (MO) o sangre periférica movilizada (SPM). La demostración de su capacidad de implante ha permitido desarrollar protocolos clínicos, que han servido para analizar las particularidades de esta nueva fuente de progenitores.⁽³⁾

EVOLUCIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES.

El cultivo de células tuvo su origen en el siglo XIX. Rechlinhausen en 1866, mantuvo vivas células sanguíneas de anfibio, pero fue la utilización de bloques de agar con plasma coagulado (soporte y alimento) el inicio del cultivo de células in vitro (Freshney, 1987).

El desarrollo del cultivo de células de vertebrados se inició con las observaciones de Roux (1885) en cultivos de células de embrión de pollo; posteriormente Harrison (1907) cultivó tejido nervioso de rana el cual más adelante fue reemplazada por plasma de pollo (Burrows, 1910); posteriormente se aplicó esta técnica para el estudio en animales de sangre caliente (Carrel, 1912).

Una serie de innovaciones como el desarrollo de medios de cultivo (Eagle, 1955), el uso de antibióticos, las técnicas de tripsinización para el pasaje de células (Moscona y Moscona, 1952) y la suplementación del medio con suero fetal bovino, permitieron el desarrollo y aplicabilidad de los cultivos de células de origen vertebrado.⁽¹⁾

FACTORES DE CRECIMIENTO.

Los factores de crecimiento descritos por Bradley, Metcalf, Pluznik y Sachs, como los factores solubles que presentes en medios clonogénicos inducían la producción de colonias. Durante la década de los 70 y 80, fueron descubiertas las especificidades de numeroso de estos factores solubles, basados en sus propiedades de promover diferentes tipos de colonias.⁽¹⁾

Los elementos formes de la sangre (hematíes, leucocitos y plaquetas) tienen una vida de duración limitada, por lo cual se requiere su constante reposición. Ésta queda garantizada en virtud de la llamada hematopoyésis. La hematopoyésis constituye un complejo proceso que se inicia en la célula madre pluripotencial (stem cell) dotada de capacidad de autorrenovación. Este proceso comprende una sucesión de divisiones celulares, a la vez que una diferenciación hacia la línea mieloide o linfoide. La fase de proliferación se continúa de otra de maduración cuyo resultado son células sanguíneas morfológicas y funcionalmente maduras. El conocimiento de estas etapas sucesivas de proliferación y maduración se sustenta en las experiencias sobre crecimiento in vitro de las células hematopoyéticas. De este modo se han podido distinguir células precursoras comunes a varias líneas hematopoyéticas y otras con mayor grado de compromiso hacia una de ellas. Como puede verse en la **figura 1**, poco después de la primera etapa de la hematopoyésis ésta se diferencia en dos procesos: la mielopoyesis y la linfopoyesis. A través de la mielopoyesis se forman los granulocitos, los monocitos, los hematíes y las plaquetas. Por su parte, la linfopoyesis origina la producción de linfocitos. Tanto la mielopoyesis como la linfopoyesis se regulan por un complejo grupo de hormonas glucoproteicas de la familia de las citocinas: los factores de crecimiento hematopoyéticos. Estos factores intervienen en el control de la

proliferación y maduración de las células progenitoras y en funciones de los granulocitos, macrófagos y linfocitos maduros, determinantes de su papel en la defensa frente a las infecciones y de su actividad citotóxica ante células tumorales.⁽²⁾

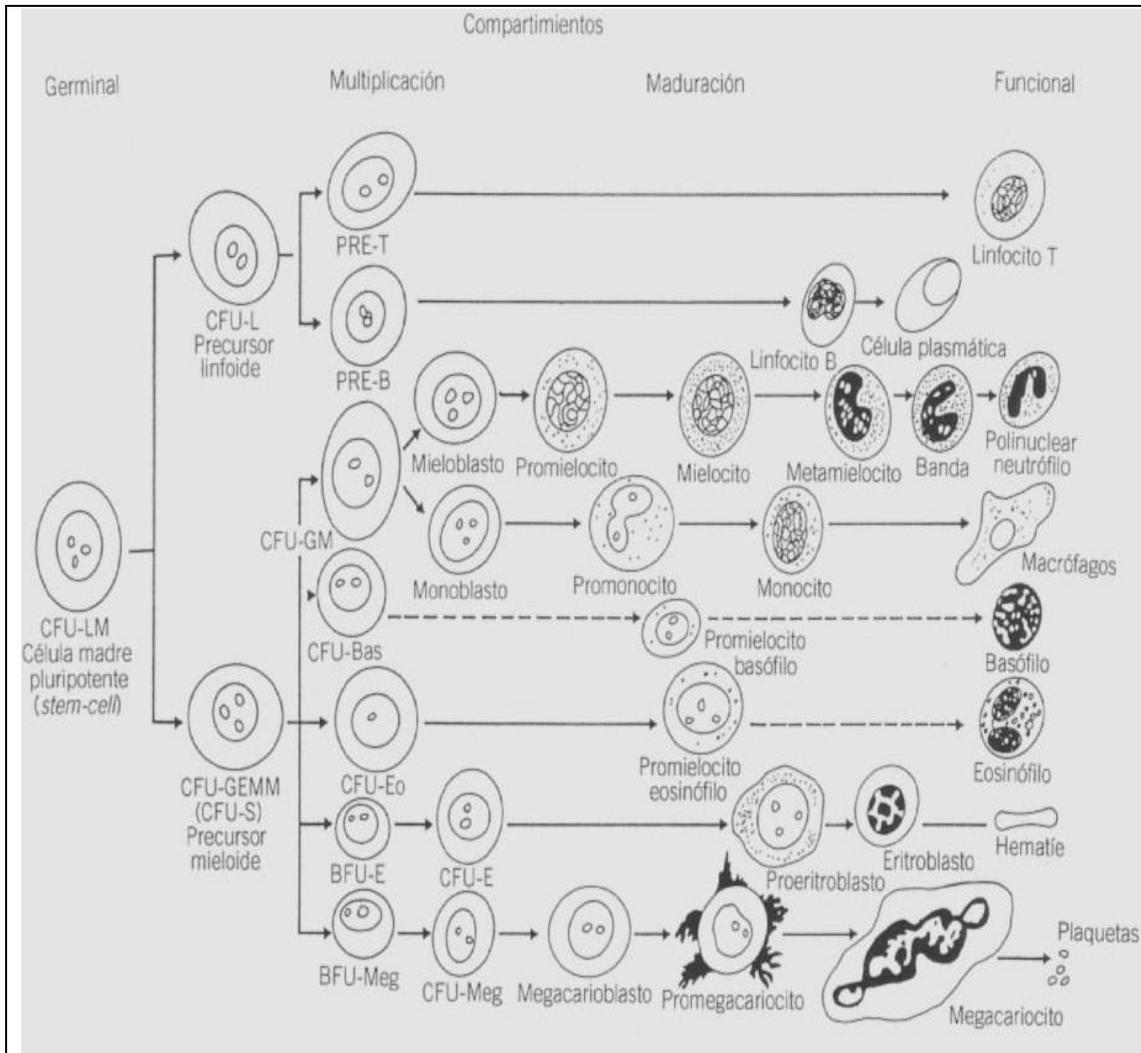


Fig. 1. Esquema general de la hemopoiesis; CFU-LM: unidad formadora de colonias linfocíticas y mielocíticas; CFU-L: unidad formadora de colonias linfocíticas; CFU-GEMM: unidad formadora de colonias de serie mielocítica; CFU-GM: unidad formadora de colonias granulomonocíticas; CFU-Bas: unidad formadora de colonias basófilas; CFU-Eo: unidad formadora de colonias eosinófilas; BFU-E: unidad formadora de colonias eritroides tempranas; BFU-Meg: unidad formadora de colonias megacariocíticas tempranas; CFU-Meg: unidad formadora de colonias megacariocíticas tardías; CFU-E: unidad formadora de colonias eritroides tardías.

Los factores estimulantes de colonias constituyen una familia de glicoproteínas que modulan la hematopoyésis y controlan la supervivencia, proliferación, diferenciación y capacidad funcional de los progenitores hematopoyéticos, con actividades frecuentemente superpuestas. Son reguladores importantes de la respuesta inmune y de la homeostasis tisular.

Clasificación de los factores de crecimiento hematopoyéticos.

En la actualidad se conocen 14 factores de crecimiento hematopoyéticos que se clasifican en tres grupos: la eritropoyetina (EPO), los factores estimulantes de colonias (CSF) y las interleucinas ([tabla 1](#)).

TABLA 1
Factores de crecimiento hematopoyéticos

EPO: eritropoyetina
GM-CSF: factor estimulante de colonias granulocítico-macrofágicas
M-CSF (CSF-1): factor estimulante de colonias macrofágicas
G-CSF: factor estimulante de colonias granulocíticas
IL-3 (multi-CSF)
LIGANDO c-kit
IL-1 alfa y beta
IL-2
IL-4
IL-5
IL-6
IL-7
IL-9
IL-11

IL = interleucina.

La EPO ejerce su actividad fundamental sobre células progenitoras de la línea eritroide. La EPO tiene un efecto estimulante invitro sobre la trombopoyésis, aunque de intensidad muy inferior al ejercido sobre la eritropoyésis. Los factores de crecimiento conocidos como CSF son cuatro: el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF), macrofágicas (M-CSF o CSF-1), granulocítico-macrofágicas

(GM-CSF) y la interleucina 3 o multi-CSF. Otras interleucinas distintas de la IL-3, como la IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9 e IL-11 también estimulan la proliferación de determinados precursores hemopoyéticos, directamente o en virtud de interacciones con los CSF; por su parte, la IL-2 tiene un importante efecto inmunomodulador que predomina sobre la acción estimulante del crecimiento hematopoyético. ⁽⁶⁾

La consecuencia de las múltiples interacciones existentes entre unos y otros factores de crecimiento es que frecuentemente se estimulan al mismo tiempo líneas celulares de estirpe linfoide y mieloide. Cabe destacar ciertos factores con efecto predominante sobre el conjunto de la mielopoyésis (que incluye la eritropoyésis, granulopoyésis neutrófila, eosinófila y basófila, hematopoyésis monocitocomacrofágica y megacariocitopoyésis) o sobre alguna de sus líneas celulares. Estos factores de crecimiento mielopoyéticos (FCM) son la EPO y los CSF, incluida la IL-3 (tabla 2). Hasta el momento sólo los FCM y excepcionalmente la IL-1 se han utilizado para estimular la hematopoyésis en pacientes con estados de insuficiencia medular. Esta revisión se centra en los principales aspectos referentes a la acción, efectos e indicaciones de los FCM. ⁽²⁾

TABLA 2
Principales factores de crecimiento mielopoyético.

Factor	Células diana
EPO	Líneas eritroide y megacariocítica
GM-CSF	Célula madre mieloide, líneas granulomonocítica, eosinófila, basófila, megacariocítica y eritroide
G-CSF	Línea granulocítica
M-CSF (CSF-1)	Línea monocítica
IL-3 (multi-CSF)	Célula madre pluripotencial, célula madre mieloide, líneas granulomonocítica, eosinófila, basófila, megacariocítica y eritroide.

EPO: eritropoyetina; GM-CSF: factor estimulante de colonias granulocítico-macrofágicas; G-CSF: factor estimulante de colonias granulocíticas; M-CSF: factor estimulante de colonias macrofágicas; IL: interleucina.

JUSTIFICACIÓN

El trasplante de células de cordón umbilical se realizó con buenos resultados por primera vez en 1989. ⁽⁵⁾

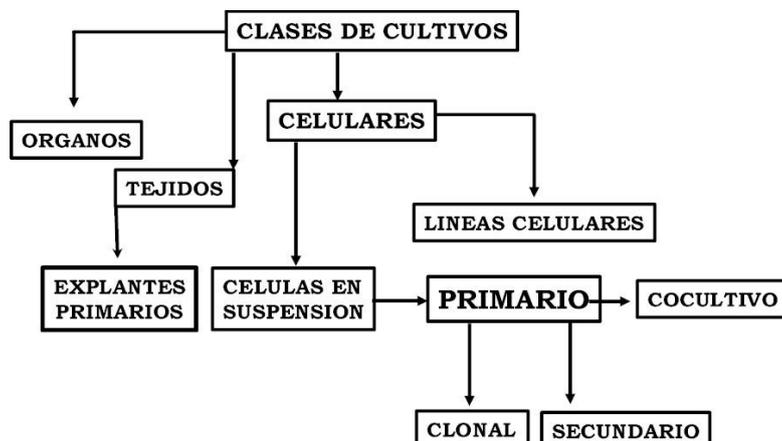
La sangre de SCU es un tejido que habitualmente es desechado, y que queda secuestrado en la placenta tras el nacimiento. Tras su recolección se convierte en un tejido hematopoyético con capacidad de ser utilizado para la regeneración de la función medular en individuos sometidos a mieloablación. ⁽³⁾

En la actualidad, pueden cultivarse en el laboratorio células procedentes de una amplia gama de tejidos y organismos diferentes. En un principio, el objetivo principal era el estudio de las propias células, cómo crecen, qué necesitan para su crecimiento, cómo y cuando dejan de crecer. Este tipo de estudios tiene hoy un gran interés científico, por ejemplo en relación con investigaciones sobre el ciclo celular, el control del crecimiento de células tumorales y la modulación de la expresión genética.

El cultivo celular es muy adecuado como modelo para el estudio del desarrollo y la diferenciación, por lo que las líneas celulares que conservan la capacidad de diferenciarse *in vitro* son objeto de un intenso estudio.

Las células de humanos y tejidos se pueden obtener de biopsias, *post-mortem*, placentas o de procedimientos quirúrgicos. Se han utilizado cultivos de células en investigaciones para el cáncer, el Parkinson, SIDA, desarrollo de medicamentos, toxicidad y Alzheimer.

TIPOS DE CULTIVO CELULAR



VENTAJAS DEL CULTIVO CELULAR

Las dos principales ventajas cuando se utilizan los cultivos celulares son:

El control del medio fisicoquímico a saber, pH, temperatura, presión osmótica, tensión de oxígeno (O₂) y gas carbónico (CO₂) de las células cultivadas y, las condiciones fisiológicas que deben ser constantes. La mayoría de las líneas celulares requieren para su buen desarrollo de suplementos en el medio en que se cultivan, ejemplo de esto es el suero, el cual provee infinidad de elementos como hormonas y otras sustancias reguladoras. El control del medio fisicoquímico y de las condiciones fisiológicas permiten el cultivo de células específicas. ⁽¹⁾

Los cultivos de células permiten someter a las mismas a una baja y definida concentración de reactivos asegurando un acceso directo en ellas, lo que ahorra en un

90% lo requerido para la inyección del reactivo *in vivo*, su excreción y su posterior distribución a los tejidos en estudio. Aunque los estudios *in vivo* resulten más económicos que los *in vitro* son descartados porque el uso de la experimentación en animales resulta cuestionado en aspectos legales, morales y éticos (Freshney, 1995).⁽¹⁾

DESVENTAJAS DEL CULTIVO CELULAR

Las técnicas de cultivo celular necesitan unas estrictas condiciones de asepsia porque las células animales crecen menos rápido que la mayoría de los contaminantes comunes como las bacterias, los mohos y las levaduras. Además las células precedentes de animales no pueden desarrollarse en medios de cultivo, por lo que es necesario agregar a los medios suplementos como suero, plasma y fluidos intersticiales, entre otros para de una manera u otra proveer a las células cultivadas un medio semejante al *in vivo* (Freshney, 1995).

Una mayor limitación en el cultivo de células es el gasto de esfuerzo y materiales para la producción de una pequeña cantidad de células o de tejido. Los costos de producir células en cultivo son diez veces más que el uso de tejido animal, ya que se invierte bastante en ensayos o procedimientos preparativos que pueden ayudar en la estandarización del proceso reduciendo tiempo de manipulación, volúmenes de muestra, tiempos de centrifugación, etc. (Brand, *et al.*, 1997).⁽¹⁾

En los cultivos celulares se dificulta relacionar las células cultivadas con las células funcionales ubicadas en el tejido del cual son derivadas, esto por que en la mayoría de los casos presentan propiedades muy diferentes; para esto es necesario utilizar marcadores de células los cuales van a ser de gran ayuda en el momento de

caracterizarlas en cultivo porque van a garantizar que las células crecidas en cultivo son las mismas que se sembraron y no otras. Además, suelen presentarse problemas de inestabilidad genética cuando se realizan varios pases de cultivos de células no transformadas, lo que va a originar una gran heterogeneidad en el crecimiento de las células y en su diferenciación (Driscoll, *et al.*, 1993).

USOS DE LOS CULTIVOS CELULARES

Para el estudio de células específicas, cómo crecen, qué necesitan para su crecimiento, cómo y cuando dejan de crecer, como es su bioquímica. Para investigaciones sobre el ciclo celular, el control del crecimiento de células tumorales y la modulación de la expresión genética. Para la búsqueda de modelos experimentales para estudios de la biología del desarrollo y la diferenciación celular. Técnicas de cultivo celular para la inserción de genes extraños en las células receptoras (animales transgénicos). La tecnología de la fusión celular y los ensayos de citotoxicidad son técnicas de cultivo celular.

FACTORES ESTIMULANTES DE COLONIAS

Los factores estimulantes de colonias (FSC), también llamados factores de crecimiento hematopoyético, controlan la producción por la médula ósea de las células sanguíneas circulantes. Algunos FSC también movilizan la liberación de células madre de la médula ósea hacia la circulación. ⁽⁴⁾

Los factores de crecimiento se pueden clasificar según su función en:

Factores linaje específico, como G-CSF, M-CSF, EPO, TPO e IL5.

Factores multilineales: IL3 Y GM-CSF.

Factores específicos de CMH: SCF y FLT3-L.

Factores sinérgicos o facilitadores: IL1, IL6 e IL11

HIPÓTESIS

El número de colonias de progenitores hematopoyéticos en el cultivo clonogénico de células de sangre de cordón umbilical correlaciona con el número de células mononucleares CD34+ críopreservadas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Implementar el cultivo clonogénico de las unidades de sangre de cordón umbilical para demostrar si las unidades procesadas y almacenadas en el banco de sangre de cordón umbilical son adecuadas para asegurar la calidad del injerto hematopoyético.

OBJETIVOS SECUNDARIOS.

- Cuantificar la cantidad de leucocitos totales finales, en las unidades almacenadas.
- Cuantificar la cantidad de células CD34⁺, en las unidades almacenadas.
- Demostrar la ausencia contaminación bacteriana en las unidades almacenadas.
- Demostrar la diferencia que existe en la capacidad de diferenciación de las células criopreservadas, contra las células SCU frescas.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Criterios de selección de las unidades para el cultivo celular.

Se revisó en forma retrospectiva los expedientes del área de criopreservación del banco de cordón umbilical del año 2000 al 2009, de los cuales se seleccionaron las unidades críopreservadas que cumplían con los siguientes parámetros:

- Disposición alogénica
- CD34⁺ en el volumen total mayor de 2×10^6
- Fácil acceso en el tanque de almacenamiento
- Se tomaron en cuenta unidades de reciente ingreso.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Unidades cuya disposición de almacenamiento fue autóloga
- CD34⁺ menor de 2×10^6 en el volumen total
- Unidades de difícil acceso en el tanque de almacenamiento

MATERIAL Y MÉTODOS

Todo el material empleado para el desarrollo de los cultivos clonogénicos fue estéril y se trabajó en la campana de bioseguridad de flujo laminar, donde se manipularon las células para evitar la contaminación. El investigador usó trajes especiales para evitar la contaminación y la generación de partículas de polvo. ⁽⁷⁾

Material a utilizar:

Agua inyectable

Agujas 18G ½

Azul de tripano

Cajas de Petri de 33mm

Cajas de Petri de 145 x 21 mm

Cámara de newbauer

Críotubos estériles

Cubreobjetos

Eppendorf

Guantes estériles

Gradillas

Gradilla térmica a 4°C

Incubadora de CO₂

Invertoscopio

Jeringa de 1 mL

Medio IMDM

Medio Metilcelulosa

Microscopio

Puntillas de 1000, 200 y 10 μ L estériles

METODOLOGÍA

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

1.- Selección de las unidades.

La selección de las unidades se realizó de dos formas, la primera fue realizando una revisión retrospectiva de todos los expedientes del año 2000 al año 2009 seleccionando de manera aleatoria todas aquellas unidades cuya disposición fuera alogénica, es decir unidades donadas al banco de cordón umbilical y que además cumplieran con una cantidad de CD34⁺ mayor a 2×10^6 en el volumen total congelado, así como de fácil acceso en los tanques de almacenamiento del banco de cordón umbilical.

TABLA 3

UNIDADES	FECHA SIEMBRA	FECHA LECTURA	VOL. IMDM	VOL. SIEMBRA	VIABILIDAD	CN/mL X106	% CD 34	CD34/uL
R35769	20/05/09	02/06/09	99.4	0.58	75	54.41	0.52	237.62
R40445	20/05/09	02/06/09	99.37	0.63	75	73.1	0.36	292.33
R49599	20/05/09	2/6/2009	99.69	0.31	80	119	0.44	505.84
R55678	20/05/09	2/6/2009	98.4	1.6	80	49.41	0.21	128.59
R1741	7/7/2009	20/07/09	95.24	4.76	75	9.45	0.37	27.5
F3750	7/7/2009	20/07/09	95.76	4.24	75	8.72	0.45	36.1
R6371	7/7/2009	20/07/09	98.83	1.17	80	61.8	0.23	46.86
R11674	7/7/2009	20/07/09	99.43	0.57	85	48.7	0.6	189.58
R13241	7/7/2009	20/07/09	99.35	0.65	80	79	0.32	195.83
R58414	7/7/2009	20/07/09	98.93	1.07	80	32.4	0.48	156.4
R60291	24/07/09	6/8/2009	99.29	0.71	87	42.4	0.55	248.8
R12423	24/07/09	6/8/2009	99.21	0.79	85	59.9	0.35	234.7

Muestra las unidades seleccionadas para la realización del cultivo, del periodo 2002 al 2009

La segunda selección se realizó tomando en cuenta, aquellas unidades que llegaron al banco con disposición de donación durante el periodo de marzo del 2009 a abril del 2009 con una cantidad de CD34⁺ mayor a 2×10^6 en el volumen total, tomando una alícuota de estas unidades antes de su congelación para la realización del cultivo (tabla 4) con la finalidad de demostrar un adecuado funcionamiento de la técnica empleada y demostrar además como afecta el tiempo de almacenamiento en el desarrollo de cada unidad..

TABLA 4.

UNIDADES	FECHA SIEMBRA	FECHA LECTURA	VOL. IMDM	VOL. SIEMBRA	VIABILIDAD	CN/mL X106	% CD 34	CD34/uL
H12258	3/12/2009	3/25/2009	99.05	0.94	98	33.8	0.52	194
R58414	3/12/2009	3/25/2009	98.9	1.07	99	32.4	0.48	156.8
H12233	3/11/2009	3/24/2009	95.39	4.61	94	19	0.19	33.8
H12612	3/11/2009	3/24/2009	98.72	1.28	92	32.5	0.4	124
H12461	3/11/2009	3/24/2009	97.56	2.44	95	34.1	0.2	82.11
H12637	3/11/2009	3/24/2009	96.78	3.22	97	23.5	0.22	49.28
R58988	3/11/2009	3/24/2009	98.35	1.65	96	31.5	0.32	101.52
R59231	3/17/2009	3/30/2009	98.09	1.91	98	22.26	0.39	77.6
R59094 A	3/17/2009	3/30/2009	99.56	0.44	99	32.1	1.16	224.2
R59094 B	3/17/2009	3/30/2009	98.56	1.44	98	19.5	0.59	61.65
R59167	3/17/2009	3/30/2009	98.78	1.22	99	34.9	0.3	106

Muestra las unidades seleccionadas para la realización del cultivo, del periodo de marzo a abril del 2009

2.- Cálculos de los volúmenes de siembra

Una vez seleccionadas las unidades a sembrar se determino el volumen de células de SCU a sembrar y el volumen de IMDM a adicionar al cultivo. Para la determinación del volumen se tomo en cuenta la cantidad de CMN de la biometría final de cada unidad congelada, así como la cantidad de CD34 total y el porcentaje de CD34.

Los cálculos del volumen se sustentan en el desarrollo de 50 colonias por cada placa de 33mm.

La formula para determinar el volumen de muestra es la siguiente.

$$50UFC \times \frac{100CD34}{30UFC} \times \frac{1000 \mu L}{XCel} \times \frac{100Cel}{YCD34} = \text{Volumen de siembra en } \mu L$$

En donde:

Xcel: corresponde al valor de la BH final del proceso de pre congelación.

Y CD34⁺: corresponde al valor en % de CD34 TOT⁺ de la citometría pre congelación.

Por cada mL de metilcelulosa se agregaron 100 μ L de IMDM con todo y muestra problema. Por lo tanto el volumen de siembra de la muestra se debe de descontar del volumen de 100 μ L.

100 μ L IMDM - X μ L de muestra problema = volumen final de IMDM.

Los volúmenes de siembra se varían entre 0 - 100 μ L, para realizar siembras de menos de 0.8 μ L se realizara una siembra indirecta, esto con el fin de evitar errores de precisión al dispensar volúmenes pequeños con las micropipetas, los volúmenes de siembra se realizaron como se muestra en la tabla 5.

TABLA 5:

Muestra los volúmenes de siembra a utilizar en los cultivos celulares

Rangos de siembra	Volumen de siembra	# de tubos de metilcelulosa a utilizar	Vol. Adicionado de metilcelulosa
0.8 - 100 μ L	Directo	1	No
0.4 - 0.8 μ L	0.8	2	V/V
0.2 - 0.4 μ L	1	2	250 μ L
< 0.2 hasta 0.1	1	2	100 μ L
< 0.1 hasta 0.05	1	3	100 μ L V/V

Todos los cálculos para determinar el volumen de siembra y el volumen de IMDM a utilizar se realizaron en la hoja de trabajo para cultivos clonogénicos que se muestra en la tabla 6.

TABLA 6:

Código de siembra	Código de muestra	Fecha de siembra	Fecha de lectura	control	CN/mL finales X 106	% CD34+ total	CD34+ total μ L	Volumen de IMDM	Dilución	Volumen de siembra	viabilidad
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L

Volumen de siembra en microlitos = $50 \text{ UFC} \times \frac{100 \text{ CD34}}{30 \text{ UFC}} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{F \times 106} \times \frac{100 \text{ Cel}}{G \% \text{ CD34+TOT}} = \underline{\quad M \quad} \mu\text{L de muestra}$

Volumen final de IMDM = $100 \mu\text{L IMDM} - \underline{\quad N \quad} \mu\text{L de muestra problema} = \underline{\quad O \quad} \mu\text{L de IMDM}$

Resultado de la lectura por microlitro de muestra sembrada

CFU-GM= $\underline{\quad P \quad} = \text{CFU-GM}/\mu\text{L} = \underline{\quad T \quad} = \underline{\quad X \quad}$ CFU-T X 106 = $\underline{\quad BB \quad}$

BFUE= $\underline{\quad Q \quad} = \text{BFUE}/\mu\text{L} = \underline{\quad U \quad} = \underline{\quad Y \quad}$

CFU - MIX= $\underline{\quad R \quad} = \text{CFU-MIX} = \underline{\quad V \quad} = \underline{\quad Z \quad}$ E-CLONE= $\underline{\quad CC \quad} \frac{\text{CFU-T}/\mu\text{L}}{\text{CD34+ TOT } \mu\text{L}}$

TOTAL= $\underline{\quad S \quad} = \text{CFU-T}/\mu\text{L} = \underline{\quad W \quad} = \underline{\quad AA \quad}$

Hoja de trabajo de los cultivos Clonogénicos para determinar el volumen de siembra y el volumen de IMDM, en donde: A Indicar el número de código de siembra, B Indicar el número de código de barras de la muestra a sembrar, C Indicar la fecha de la siembra, D Indicar la fecha de lectura de las placas, E Indicar el control utilizado, F Indicar el número de células nucleadas finales x 106, G Indicar el % de CD34+ totales de la muestra, H Indicar el número de CD34+ por μ L, I Indicar el volumen de IMDM a añadir, J Indicar la dilución si es que existe dilución, K Indicar el volumen de siembra de la muestra, L Indicar la viabilidad calculada, M Indicar el volumen calculado de muestra a sembrar, N Indicar el volumen calculado de muestra a sembrar, O Calcular el volumen de IMDM a añadir, P Indicar el número de unidades formadoras de colonias granulomonocíticas observadas al microscopio, Q Indicar el número de unidades formadoras de colonias eritroides, R Indicar el número de unidades formadoras de colonias mixtas, S Realizar la suma de todas las colonias observadas e indicarlas, T Dividir el número de CFU-GM totales en el volumen de muestra inoculada, U Dividir el número de B-FUE totales en el volumen de muestra inoculada, V Dividir el número de CFU-MIX totales en el volumen de muestra inoculada, W Determinar el número de CFU-T/ μ L, X Colocar el resultado del cálculo del inciso T, Y Colocar el resultado del cálculo del inciso U, Z Colocar el resultado del cálculo del inciso V, AA Colocar el resultado del cálculo del inciso W, BB Calcular el número de CFU-T x 106 multiplicando el número de CFU-T/ μ L x 21000, CC Determinar el valor de eficiencia clonogénica.

3.- Obtención de la alícuota

De los tanque del banco de cordón umbilical se tomaron las 10 unidades a sembrar y se colocaron en un recipiente con nitrógeno líquido, de las cuales solo se tomo el fragmento proximal a la bolsa y el resto de la unidad se almacenó en su lugar de origen en el tanque, el fragmento se coloco en un criótubo identificado con el numero de unidad a cultivar y la identificación de cultivo clonogénico.

Todas aquellas unidades recién ingresadas al banco de cordón para su criopreservación se analizaron y se seleccionaron 10 unidades que cumplieran con los criterios de inclusión, de las cuales se tomo una alícuota de 50µL antes de su criopreservación para la realización del correspondiente cultivo celular.

4.- Siembra de las unidades

- Se sacaron los tubos que contienen Metilcelulosa y el IMDM para atemperarlos.
- Se tomo el tubo que contiene la USCU y se coloco en una gradilla térmica, en el caso de no contar con un tubo control se realizara una siembra por duplicado de la muestra en estudio.
- Se coloco el fragmento en una caja petri, se añadió cloruro de benzalconio y se cortó con un bisturí la orilla, para extraer el volumen total con una puntilla estéril y se deposito en un criótubo estéril, el criótubo se coloco en una gradilla térmica.
- Se añadieron 50µL de azul de tripan en un tubo eppendorf y el volumen calculado de la muestra a sembrar, se homogeniza la mezcla y se llena la

cámara de newbauer, se observo al microscopio a 40x donde se contaron 100 células y se determino la viabilidad, las células vivas se observaron de color amarillo brillante y las células muertas de color azul.

- En el caso de viabilidad menor de 70% hasta 35% se sembró el doble del volumen calculado en la formula y menor de 35% sembrar el cuádruple del volumen calculado.
- En siembra directa se adiciono el volumen de muestra calculado y el volumen de IMDM calculado para cada muestra en el tubo que contenía la metilcelulosa perfectamente identificada con el código de la muestra y se mezclo en vortex durante 15 segundos y se dejo reposar la mezcla por 10 min.
- Se marcaron las cajas de siembra con la fecha y con los números de identificación de las unidades a sembrar.
- Con una jeringa de insulina estéril de 1 mL y una aguja hipodérmica de 18G se tomo todo el volumen del tubo cónico que contenía la mezcla a sembrar y se distribuyo homogéneamente todo el medio en la caja Petri identificada con el código y fecha de siembra.
- Una vez sembradas la cajas Petri por duplicado se colocaron con una caja de agua, dentro de otra caja Petri grande perfectamente identificada con la fecha de siembra, en el caso de no contar con caja grande utilizar cajas Petri convencionales y colocar una caja pequeña con agua por cada dos cajas sembradas.(Fig.2)

FIGURA 2



Se colocaron las cajas dentro de la incubadora de CO₂ a 37°C, con 5.0% CO₂ y 80% de humedad por un período de 10 a 14 días. (Fig.3)

FIGURA 3



Una vez transcurridos los 14 días de incubación se corroboró la ausencia de contaminación y la presencia de agua en el medio, además se verificó que no existiera daño del cultivo.

- Se colocó la caja Petri sobre una base de acetato graduada, la cual funcionó como guía para evitar la confusión de las colonias y realizar la lectura identificando así cada una de las UFC en un microscopio invertido con los objetivos de 2x-4x-10x. (Fig.4)

FIGURA 4

MICROSCOPIO INVERTIDO



Las características de las colonias son las siguientes:

CFU-GM: Son colonias blancas que presentan un centro compacto con una radiación periférica han de estar formadas como mínimo por 50 células. ⁽⁹⁾

BFU-B: se han descrito dentro de este grupo dos tipos. BFU-E maduras y BFU-E primitivas, en el día 14 generalmente estas células tienen una ligera coloración roja. ⁽⁹⁾

CFU-Mix: son colonias multilíneas. Hay que visualizar siempre elementos de la línea eritroide y de la línea blanca para contabilizarlas como mixtas. Dispersas en muchos casos con una coloración no muy bien definida. ^(6,9)

LECTURA DE LOS CULTIVOS.

Se contó en número de colonias desarrolladas con la ayuda de un microscopio invertido utilizando los objetivos de 2x-4x-10x, el número de colonias contadas se reporto en la hoja de trabajo, donde se realizo el calculo para obtener el valor de la E-CLONE de cada unidad cultivada, la cual debe ser mayor del 6% para que pueda ser una unidad aceptable para el transplante, de no ser así se repitió el proceso del cultivo para dar un veredicto final, para uso en el transplante la E-CLONE no debe ser menor de 6% en caso contrario el uso de unidades que no cumplan con el porcentaje indicado serán responsabilidad del medico a realizar el transplante decidir si la unidad es apta para este.

TABLA 7.

REPORTE DE CULTIVOS HEMATOPOYETICOS.	
Fecha de siembra: _____ A _____	
Código de la muestra: _____ B _____	
Resultado de la lectura por microlitro de la muestra sembrada	
UFC T/ μ L	C
UFC-GM/ μ L	D
B-FUE/ μ L	E
UFC-Mix/ μ L	F
E-CLONE	G
UFC-T X106	H
DICTAMEN DE LA PRUEBA	I
RELIZO: _____	
AUTORIZO: _____	

El reporte de la E-CLONE se realiza como se muestra, donde se reporta el número de unidades formadoras de colonias, donde A Indicar la fecha de siembra, B Indicar el código de la muestra, C Indicar el valor de la UFC Totales / μ L, D Indicar el valor de UFC-GM/ μ L, E Indicar el valor de BFUE/ μ L, F Indicar el valor de E-CLONE, G Indicar el número de UFC-T X106, H Indicar el dictamen de la prueba si es aceptable o rechazado, I Indicar el nombre de la persona que realizo el cultivo, J Indicar el nombre de la persona que autorizo el cultivo.

RESULTADOS

Los resultados de las poblaciones se muestran en la tabla 8.

TABLA 8

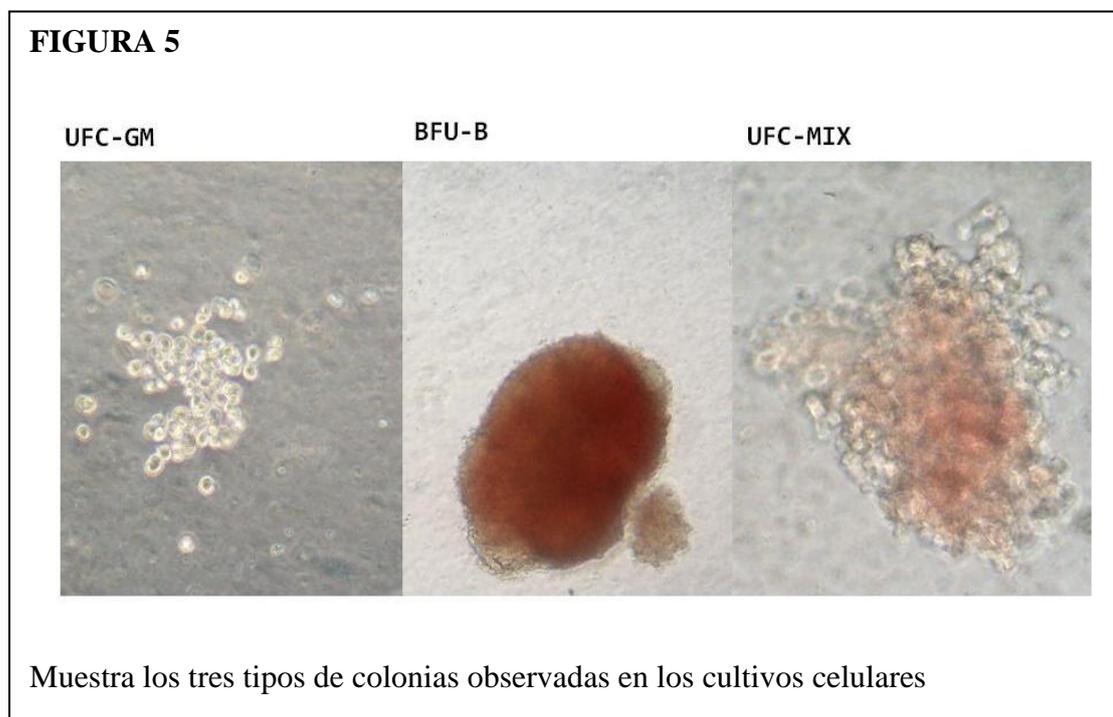
AÑO	E-CLONE	AÑO	E-CLONE
2009	10.42	2007	6.53
2009	10.13	2007	9.23
2009	10.27	2008	9.57
2009	6.30	2008	5.83
2009	14.47	2002	3.82
2009	8.19	2003	3.92
2009	7.16	2004	10.94
2009	10.12	2005	5.55
2009	21.29	2006	3.14
2009	11.26	2009	4.18
2009	10.83	2009	6.79
		2005	6.47

Muestra los resultados obtenidos para poblaciones cultivadas en el periodo del 2009 y las poblaciones cultivadas del periodo 2002 al 2009, donde se puede observar como va disminuyendo el porcentaje de la E-clone.

El crecimiento de las colonias en los cultivos celulares se observó y se contó después de un período de 14 días, estas colonias se contaron mediante la ayuda de un microscopio invertido (figura 5), donde se pudieron observar tres tipos de colonias como las unidades formadoras de colonias de CFU-GM, BFU-E y las CFU-Mix, así como también se pudo demostrar la ausencia de contaminación bacteriana y micótica obteniendo así resultados óptimos en las unidades sembradas.

El valor principal para valorar que una unidad de sangre de cordón umbilical es adecuada clínicamente para su empleo en trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas es su contenido celular, es decir el número de células progenitoras que contiene y la capacidad que tienen estas para poder desarrollarse en los diferentes tipos de tejido celular.

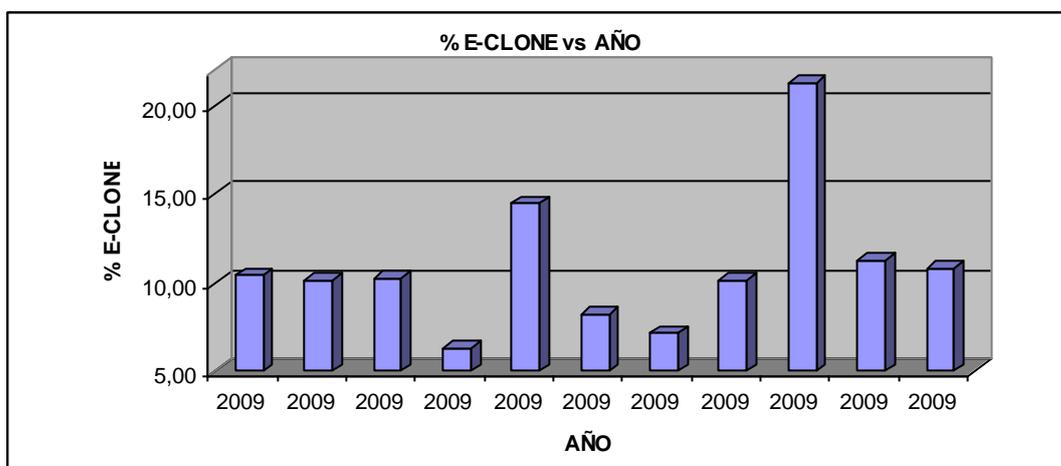
Las unidades formadoras de colonias desarrolladas en los cultivos se muestran en la figura 5.



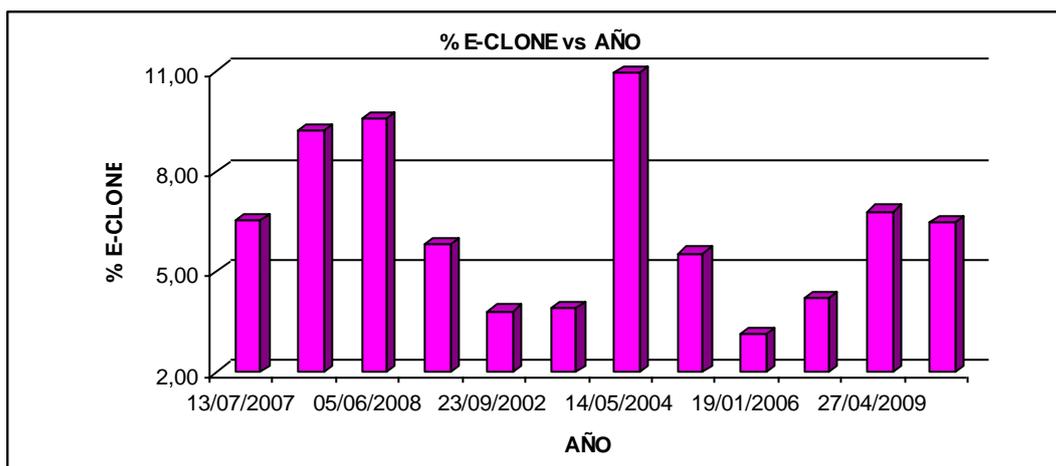
Se puede observar que la cantidad del CD34 de la muestra empleada para el cultivo celular vario entre el 0.5 al 1.1%, así como el volumen de muestra a sembrar vario entre 0.9 a 4.6 μ L y la viabilidad de las unidades sembradas siempre fue mayor del 90%, lo cual favoreció a las muestras para su adecuado desarrollo celular en los medios de cultivo.

Los resultados de la primera población que corresponden a las muestras de SCU del año 2009, en el cual se usaron muestras de sangre de cordón umbilical frescas las cuales fueron unidades que ingresaron al área de hematología especial como unidades donadas al banco de cordón umbilical. En donde se demuestró que los resultados de la E-CLONE fueron mayores al 6%, en la cual se puede observar que este valor siempre fue mayor que los resultados obtenidos en la segunda población que corresponden a las unidades de SCU del año 2002-2009.

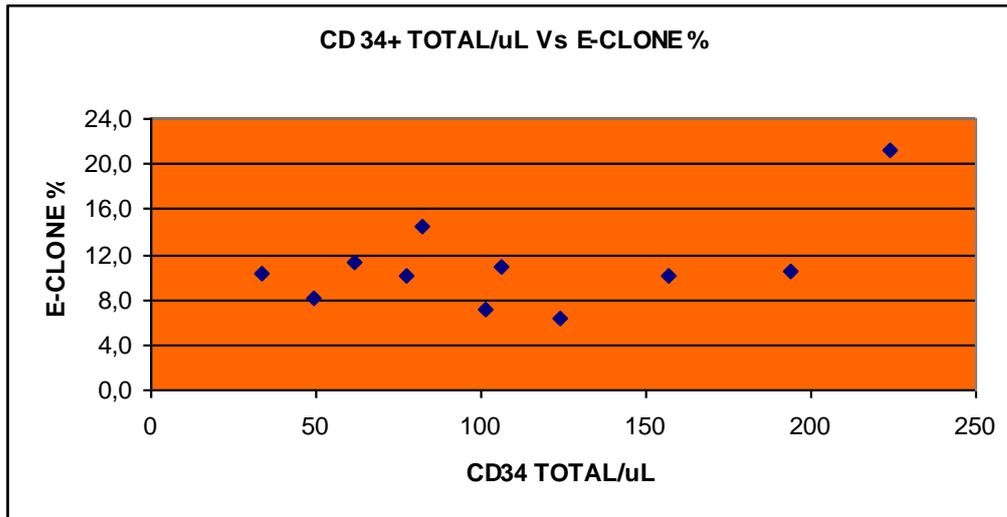
En la segunda población donde se emplearon muestras que corresponden al año del 2002 al 2009, se puede observar que la cantidad del CD34 de las muestra empleada para el cultivo celular varió de entre 0.2 al 0.6%, así como el volumen de muestra empleada para el cultivo celular varió entre 0.3 a 4.7 μ L y los valores de viabilidad varió entre 75 al 85%, donde se encontraron valores de la E-CLONE menores que los observados en la primera población del 2009.



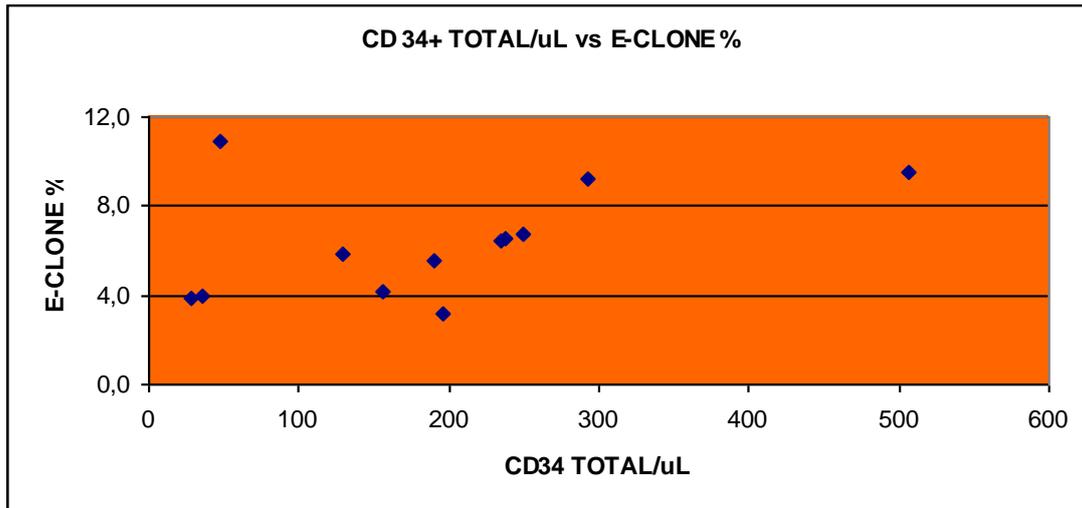
Grafica 1: Muestra el desarrollo de la E-Clone en la población de marzo del 2009



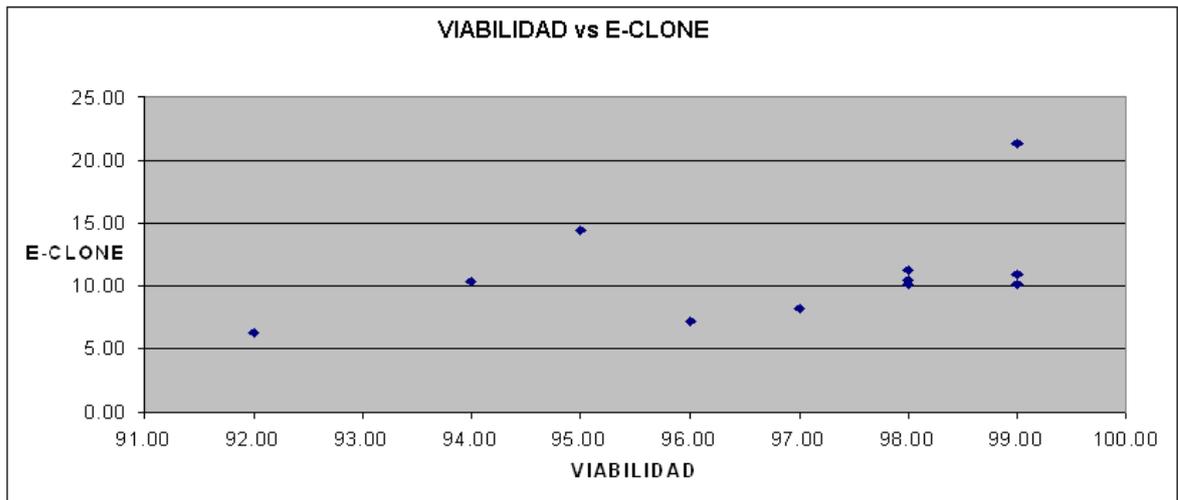
Grafica 2: Muestra el desarrollo de la E-Clone en la población del período del 2002 al 2009, donde se puede observar que existió menor desarrollo de la E-clone en aquellas unidades que fueron críopreservadas en los años del 2002 al 2006.



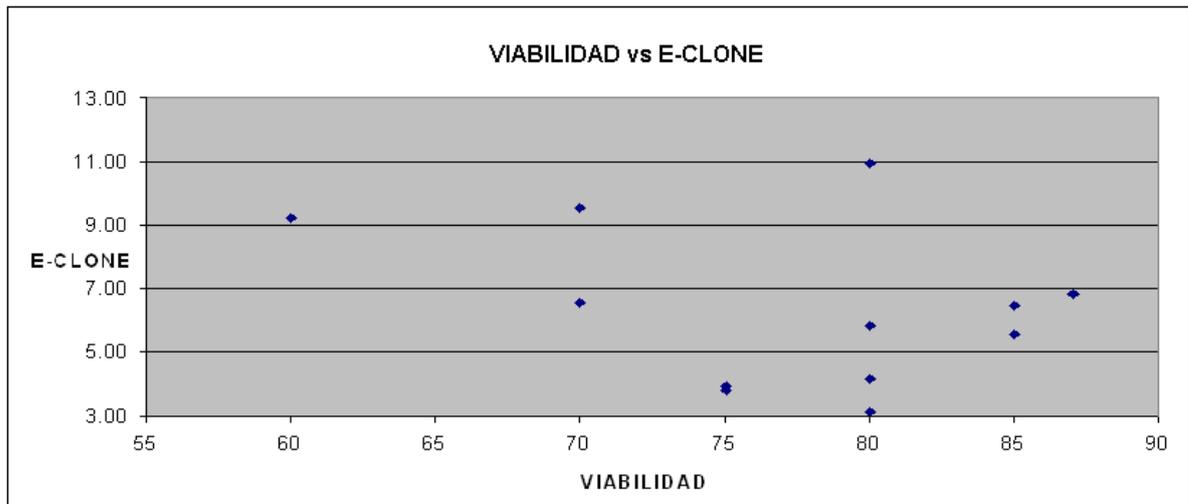
Gráfica 3: Muestra la correlación que existió entre la E-Clone desarrollada en los cultivos de la población de marzo del 2009, con las células CD34+ totales críopreservadas. Se documento una correlación de 0.24 entre las células CD34 totales críopreservadas y la E-Clone desarrollada en los cultivos de este período.



Grafica 4: Muestra la correlación que existió entre la E-Clone desarrollada en los cultivos de la población del 2002 al 2009, con las células CD34⁺ totales críopreservadas. Se documento una correlación de 0.18 entre las células CD34⁺ totales críopreservadas y la E-Clone desarrollada en los cultivos de este período.



Grafica 5: Muestra la correlación de la viabilidad por azul de tripano contra la E-Clone desarrollada en los cultivos de la población de marzo del 2009, con las células CD34⁺ totales críopreservadas. Se documento una correlación de 0.17 entre la viabilidad por azul de tripano contra la E-Clone desarrollada en los cultivos de este período.



Grafica 6: Muestra la correlación de la viabilidad por azul de tripano contra la E-Clone desarrollada en los cultivos de la población del período del 2002 al 2009, con las células CD34⁺ totales criopreservadas. Se documento una correlación de 0.10 entre la viabilidad por azul de tripano contra la E-Clone desarrollada en los cultivos de este período.

DISCUSION

Las células se cultivaron y se mantuvieron a una apropiada temperatura y mezcla de gases (habitualmente, 37°C, 5% CO₂ y 95% O₂) en un incubador celular. Las condiciones de cultivo varían ampliamente para cada tipo celular, y la variación de las condiciones para un tipo celular puede dar lugar a la expresión de diferentes UFC.

En este estudio, la temperatura y la mezcla de gases fue el factor que más varió en los sistemas de cultivo. Las recetas para los medios de crecimiento pueden variar en pH, concentración de glucosa, factores de crecimiento y la presencia de otros componentes nutritivos. Los factores de crecimiento usados para suplementar a los medios derivan a menudo de sangre animal, como el suero bovino. ⁽¹⁰⁾

Durante el cultivo se mantuvieron las condiciones de temperatura y presión de CO₂, sin embargo la humedad fue el factor más difícil de controlar la cual se pudo mantener entre 92 a 102% de humedad, con lo cual se observó que esta variación no afectaba al desarrollo de los cultivos.

Aclarar que el cultivo clonogénico en el banco de cordón umbilical demostró la viabilidad de las células CD34 en el 74% de los casos, lo cual garantiza que el proceso de manipulación de sangre de cordón umbilical se hace de acuerdo a los estándares internacionales establecidos para que dicho producto sea empleado como injerto en el trasplante hematopoyético.

La mayor desventaja de usar la sangre de cordón umbilical, como una alternativa para el trasplante de células madres hematopoyéticas es el bajo número de células presentes en una sola unidad de sangre, siendo necesario emplear más de una unidad para un trasplante adecuado. ⁽⁸⁾ Por lo tanto para poder desarrollar esta técnica, solo

se eligieron aquellas unidades que cumplían con los estándares establecidos para un trasplante, como lo es la cantidad del CD34⁺, la cual deberá ser mayor de 2×10^6 .

El medio básico empleado consiste en un medio semisólido y nutrientes solubles en agua, incluyendo FCS, ⁽⁹⁾ al cual fue necesario adicionarle un medio con alto contenido de glucosa, piruvato de sodio y aminoácidos, lo que proporcionó un soporte óptimo para el desarrollo de progenitores eritroides, progenitores de granulocitos y monocitos.

Las células precursoras formadoras de colonias de diferentes líneas celulares y estados de maduración requieren diferentes factores de crecimiento solos o en combinación; los factores de crecimiento empleados fueron CFU-GM, BFU-E y las CFU-Mix, las cuales se desarrollaron favorablemente durante los 14 días de incubación.

Los cultivos celulares tienen una serie de ventajas innegables, pero al mismo tiempo poseen desventajas que hay que tener en consideración.

Ventajas

Permiten un control preciso y fino del medio ambiente. En un cultivo se pueden controlar todos los factores del medio: Físico-químicos (pH, temperatura, presión osmótica, niveles de O₂, CO₂, tensión superficial), y fisiológicos.

Durante el desarrollo de los cultivos se pudo observar que el medio fue muy estable, ya que no hubo cambios de pH, temperatura y presión de CO₂, el factor mas variable fue la humedad, pero este no afecto el desarrollo de las colonias celulares.

Desventajas

Las técnicas de cultivo celular necesitan condiciones de asepsia para evitar el crecimiento de contaminantes como las bacterias, los mohos y las levaduras.

Una mayor limitación en el cultivo de células es el gasto de esfuerzo y materiales para la producción de una pequeña cantidad de células, ya que se invierte demasiado en ensayos o procedimientos que pueden ayudar en la estandarización del proceso reduciendo tiempo de manipulación y volúmenes de muestra.

Durante el desarrollo de este estudio se pudieron controlar estos factores, evitándose el crecimiento de contaminantes por medio del empleo de un medio que inhibe el crecimiento de hongos el cual fue colocado dentro de la incubadora, además de que se restringió la entrada del personal a la sala del cultivo.

Esta técnica requiere del uso de materiales con los que muchos laboratorios no cuentan.

CONCLUSIONES

-El cultivo clonogénico es una técnica adecuada para observar el desarrollo de las células presentes en las unidades de sangre de cordón umbilical

-Permite una adecuada selección de las unidades para asegurar un buen trasplante.

-Las unidades del año 2009 cultivadas presentaron una E-Clone mayor al 6%, lo que demostró que aun tiene la capacidad de diferenciarse a las diferentes líneas celulares, siendo unidades aptas para realizar un adecuado trasplante y asegurar el éxito de este.

-De lo documentado en las unidades que se cultivaron de los años 2002-2008 se puede concluir que el porcentaje de la E-Clone va disminuyendo con el paso del tiempo, esto probablemente fue causado por el efecto de las altas temperaturas de almacenamiento, lo que ocasiona muerte celular y por lo que estas unidades no serian aptas para utilizarse en un trasplante.

-Además se demostró que no existía correlación entre las células CD34⁺ totales y la E-Clone desarrollada en los cultivos en ninguna de las dos poblaciones, así como también se observó que no hubo correlación entre la viabilidad por azul de tripano con la E-Clone.

-Se pudo demostrar que el cultivo clonogénico es una técnica adecuada para tomar una decisión en la selección de la unidad a transplantar sin tomar en cuenta solo la cantidad de CD34 total y la viabilidad celular, sino también se debe de tomar en cuenta el desarrollo de las E-Clone mediante este cultivo, ya que permite observar el desarrollo de las unidades formadores de colonias de eritrocitos, granulocitos y monocitos.

ANEXOS

Lista de verificación de cultivos clonogénicos.

Hoja de trabajo para cultivos clonogénicos.

Hola de reporte para cultivos clonogénicos.

LISTA DE VERIFICACION CULTIVOS CLONOGENICOS

Fecha: _____

Número de muestra					
Volumen de muestra a sembrar					
Volumen de IMDM a sembrar					
Extraer los tubos de metil celulosa e IMDM para a temperarlos					
Extraer unidad del nitrógeno					
Colocar en recipiente con nitrógeno					
Extraer el tubo a sembrar y descongelar (descongelar con las manos si es fragmento, a 37°C si es tubo)					
Colocar los tubos en gradilla térmica fría					
Identificar los tubos de metil celulosa con el numero de muestra					
Colocar en un tubo eppendorf el volumen de muestra calculado y 50µL de azul de tripan					
Determinar la viabilidad de la muestra					
Si la viabilidad es menor de 70% hasta 35% sembrar el doble del volumen					
Si es menor de 35% sembrar el cuádruple del volumen calculado					
Vortexear y dejar reposar por 10 minutos					
Colocar en la caja Petri, homogenizar y romper burbujas					
Extraer todo el volumen con jeringa de insulina					
Colocar las cajas en una charola con dos cajas Petri con agua inyectable estéril					
Incubar a 37°C 5% CO ₂ , por 14 días					

Realizó: _____



Código de siembra	Código de muestra	Fecha de siembra	Fecha de lectura	Control	CN/mL finales X 106	% CD34+ total	CD34+ total μL	Volumen de IMDM	Dilución	Volumen de siembra	Viabilidad

$$\text{Vol. de siembra en } \mu\text{L} = 50\text{UFC} \times \frac{100\text{CD34}}{30\text{ UFC}} \times \frac{1000\ \mu\text{L}}{x106} \times \frac{100\text{Cel}}{\% \text{CD34+TOT}} = \text{_____} \mu\text{L de muestra}$$

$$\text{Vol. final de IMDM} = 100\ \mu\text{L IMDM} - \text{_____} \mu\text{L de muestra problema} = \text{_____} \mu\text{L de IMDM}$$

Resultado de la lectura por microlitro de muestra sembrada

$$\text{CFU-GM} = \text{_____} = \text{CFU-GM}/\ \mu\text{L} = \text{_____} = \text{_____} \quad \text{CFU-T X 106} = \text{_____}$$

$$\text{BFUE} = \text{_____} = \text{BFUE}/\ \mu\text{L} = \text{_____} = \text{_____}$$

$$\text{CFU - MIX} = \text{_____} = \text{CFU-MIX} = \text{_____} = \text{_____} \quad \text{E-CLONE} = \frac{\text{CFU-T}/\ \mu\text{L}}{\text{CD34+ TOT } \mu\text{L}} = \text{_____}$$

$$\text{TOTAL} = \text{_____} = \text{CFU-T}/\ \mu\text{L} = \text{_____} = \text{_____}$$

HOJA DE REPORTE DE LOS CULTIVOS CLONOGÉNICOS

ID DE MUESTRA _____ CODIGO CULTIVO _____

<u>SIEMBRA</u>	<u>LECTURA</u>
FECHA DE SIEMBRA _____	FECHA DE LECTURA _____
VOLUMEN DE SIEMBRA _____	
CN/mL pos-descong. (10E6) _____	GM _____ CFU-GM/ μ L _____
Viabilidad (%) _____	BFU _____ BFU-E/ μ L _____
CN/mL en fresco (10E6) _____	Mix _____ CFU-Mix/ μ L _____
CD34 (%) _____	EClone _____
CD34/ μ L _____	Recuperación CN _____
Fdo. Técnico _____	Fdo. Técnico _____

Observaciones:

REFERENCIAS

1. <http://javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/cultivos.htm>
2. Sierra y C. Rozman. Indicaciones del tratamiento con factores de crecimiento mielopoyetico.
3. Sergio Querol Giner, Tesis Doctoral, Expansion Ex Vivo de Progenitores Hematopoyeticos de Sangre de Cordon Umbilical para el Transplante
4. Bath PMW, Sprigg N. Factores estimulantes de colonias (incluidos eritropoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos y análogos) para el accidente cerebrovascular (Revisión Cochrane traducida). En: *La Biblioteca Cochrane Plus, número 3, 2008*. Oxford, Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de *The Cochrane Library*, Issue . Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.).
5. José Carlos Jaime Pérez, David Gómez Almaguer, Hematología, La Sangre y sus Enfermedades. Mc Graw Hill, 1ra edicion.
6. Human Colony-Forming Cell Assays Using MethoCult, Technical Manual, Catalogo numero 28404.
7. Nagy A Habib, Natasa Levicar, Myrtle Y Gordon, Long Jiao, Nicholas Fisk, STEM CELL REPAIR and REGENERATION, volumen 2, imperial college London, UK.
8. Hematopoietic stem cell expansion. *Haematologica/the hematology journal*/2005; 90(2)/153/

9. Catherine Nissen-druey, Andre Tichelli, Sandrine Meyer-Monard, Human Hematopoietic Colonies in Health and Disease, KARGER
10. http://es.wikipedia.org/wiki/Cultivo_celular