

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**RECUENTO DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS DE
SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL DE MADRES SANAS**

INFORME DE TESIS

Presentado por

INGRID MIRTALA LÓPEZ CALDERÓN

Para optar el título de

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, marzo de 2008

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| I. RESUMEN | 1 |
| II. INTRODUCCIÓN | 3 |
| III. ANTECEDENTES | |
| A. Células progenitoras | 5 |
| 1. Tipos de células progenitoras | 5 |
| B. Células progenitoras hematopoyéticas | 7 |
| C. Transplante de células progenitoras hematopoyéticas | 8 |
| 1. Tipos de transplante de progenitores hematopoyéticos | 12 |
| D. Fuentes de células progenitoras hematopoyéticas | 12 |
| 1. Médula ósea | 12 |
| 2. Sangre periférica | 13 |
| 3. Cordón umbilical | 14 |
| E. Banco de sangre de cordón umbilical | 16 |
| 1. Recolección de la sangre de cordón umbilical | 17 |
| 2. Concentración celular | 17 |
| 3. Crioprotección | 18 |
| 4. Congelación | 19 |
| 5. Descongelación y reinfusión de células progenitoras hematopoyéticas | 21 |
| F. Citometría de flujo | 22 |
| 1. Partes de un citómetro | 22 |
| 2. Parámetros de un citómetro de flujo | 24 |
| 3. Recuento de células CD34+ por citometría de flujo | 25 |
| IV. JUSTIFICACIÓN | 28 |
| V. OBJETIVOS | |
| A. Objetivo General | 29 |
| B. Objetivos Específicos | 29 |
| VI. HIPÓTESIS | 30 |

| | | |
|-------|---|----|
| VII. | MATERIALES Y MÉTODOS | |
| A. | Universo y muestra | 31 |
| B. | Materiales | 31 |
| C. | Recursos Humanos | 32 |
| D. | Diseño estadístico | 32 |
| E. | Métodos | 33 |
| 1. | Recolección de la muestra | 33 |
| 2. | Análisis por citometría de flujo | 33 |
| F. | Descarte de las muestras | 35 |
| G. | Aspectos éticos | 35 |
| VIII. | RESULTADOS | 36 |
| IX. | DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 40 |
| X. | CONCLUSIONES | 42 |
| XI. | RECOMENDACIONES | 43 |
| XII. | REFERENCIAS | 44 |
| XIII. | ANEXOS | 47 |
| | Anexo 1: Lugares en los que se han encontrado células progenitoras adultas y linaje celular que desarrolla una célula progenitora neural y las células progenitoras de cordón umbilical | 47 |
| | Anexo 2: Esquema general de la hematopoyesis | 48 |
| | Anexo 3: Perfil antigénico durante la hematopoyesis | 49 |
| | Anexo 4: Principales indicaciones de los trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas | 50 |
| | Anexo 5: Esquema de los pasos seguidos en el trasplante alogénico | 51 |
| | Anexo 6: Esquema de los pasos a seguir en un trasplante autólogo | 52 |
| | Anexo 7: Componentes internos de un citómetro de flujo por los que pasa la muestra para ser analizada | 53 |
| | Anexo 8: Reporte de resultados del citómetro FACSCalibur utilizando el software Cell Quest Pro 2.0 | 54 |
| | Anexo 9: Consentimiento informado | 55 |

| | |
|---|----|
| Anexo 10: Autorización del Comité de Bioética de la DIGI para la realización de la investigación | 56 |
| Anexo 10: Caja de Tukey para volumen de las 88 muestras de sangre de cordón umbilical | 57 |
| Anexo 11: Caja de Tukey para el recuento de células progenitoras hematopoyéticas (CD34+, CD45+) de sangre de cordón umbilical de madres sanas | 58 |

XIV. RESUMEN

El sistema hematopoyético, depende fundamentalmente de la existencia de células progenitoras hematopoyéticas que se auto renuevan y diferencian en células de todos los linajes hematopoyéticos maduros. Al nacimiento la sangre fetal obtenida de los vasos placentarios a través del cordón umbilical es rica en precursores hematopoyéticos que desaparecen en las primeras horas después del nacimiento, por lo que constituye una fuente alterna para los trasplantes de médula ósea, especialmente cuando hay dificultad para encontrar compatibilidad entre donador y paciente.

Para que las células precursoras hematopoyéticas sean viables para trasplantes en humanos tienen que ser obtenidas, concentradas y criopreservadas mediante procedimientos con rigurosos controles.

En esta investigación se realizó el recuento de células progenitoras de cordón umbilical obtenidas durante el parto, con el propósito de establecer un estimado del número de células progenitoras hematopoyéticas viables en sangre de cordón umbilical y puedan usarse en fines terapéuticos. Para ello se realizó un muestreo por conveniencia de sangre de cordón umbilical de 97 pacientes que asistieron a control pre-natal a la clínica de madres sanas del Hospital de Gineco-obstetricia del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS). Las pacientes autorizaron la extracción de sangre de cordón umbilical por medio de consentimiento informado y se incluyó únicamente a las que cumplieron con los criterios de inclusión (ser madre con historia obstétrica normal, poseer controles serológicos de enfermedades infecciosas negativos durante la gestación, parto de evolución normal y gestación mayor o igual a 32 semanas). La sangre se extrajo en una bolsa de donación con 23 mL de anticoagulante CPD-A (citrato, fosfato, dextrosa y adenina), realizando la punción de la vena del cordón umbilical con la placenta *in utero* en todos los casos.

Las muestras fueron trasladadas a temperatura ambiente y protegidas de la luz al laboratorio del Hospital General de Enfermedades del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) para su análisis. Nueve muestras fueron descartadas por no cumplir con los criterios de inclusión, quedando un total de 88 muestras para su evaluación.

Las células progenitoras hematopoyéticas fueron cuantificadas por medio del método de citometría de flujo, considerando la guía publicada por la Sociedad Internacional de Hemoterapia e Ingeniería de Trasplantes (Siglas en inglés: ISHAGE). Se procedió a marcar las células para identificar el antígeno CD34 con ficoeritrina (PE), el CD45 con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y la viabilidad con 7-amino actinomicina (7-AAD). La metodología utilizada permitió la determinación en un solo paso lisando células sin necesidad de lavado.

Los resultados fueron obtenidos utilizando el programa BD CellQuest Pro del citómetro FACSCalibur. Fueron analizadas por medio de estadística descriptiva encontrándose un recuento promedio de 102.3 células progenitoras hematopoyéticas/ μ L de sangre completa de cordón umbilical de madres sanas, con un rango de 28.4 a 239.3 y un porcentaje de viabilidad promedio de 99.19. Después del análisis todas las muestras fueron descartadas siguiendo la normativa de bioseguridad establecida.

XV. INTRODUCCIÓN

Las células progenitoras hematopoyéticas son células capaces de autorrenovarse durante el transcurso de la vida y de dar origen a progenitores asignados que pueden diferenciarse a lo largo de todas las líneas hematopoyéticas posibles. Las células progenitoras hematopoyéticas expresan una proteína de superficie característica llamada antígeno CD34 que es de gran utilidad para reconocerlas y aislarlas (1).

Actualmente, el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas es una opción de terapia para sustituir la hematopoyesis del paciente por ser defectuosa, insuficiente o neoplásica y para permitir la recuperación hematopoyética de un paciente que ha recibido un tratamiento antineoplásico en dosis elevadas que originan mielosupresión prolongada o definitiva (1, 2).

Las fuentes de células progenitoras hematopoyéticas son: médula ósea, sangre periférica después de un estímulo específico y cordón umbilical; ésta última constituye una de las mejores alternativas terapéuticas, ya que son células que, a diferencia de las de médula ósea, producen una progenie hematopoyética sin disminuir su número. Además, estas células son tan inmaduras que aún no tienen todos los antígenos leucocitarios del individuo nacido, por lo que se disminuye la frecuencia y severidad del rechazo del hospedero (3, 4).

El número de células infundidas es la clave para que un trasplante de progenitores hematopoyéticos de cordón umbilical sea exitoso, por lo que es importante estimar la cantidad y la viabilidad tanto en el momento de su obtención, como antes de ser transplantadas. En esta investigación se estimó únicamente la cantidad de células progenitoras hematopoyéticas viables en el momento de su obtención. El método de elección para el recuento es el marcaje de los antígenos CD34 y CD45 y la determinación por citometría de flujo, por ser muy sensible y específico (5).

Los datos se obtuvieron de muestras de sangre completa de cordón umbilical de 97 mujeres durante el alumbramiento que asistieron a control pre-natal en la clínica de madres sanas del Hospital de Gineco-Obstetricia del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS). Para la realización del estudio se preparó un consentimiento informado para

autorizar la extracción de sangre del cordón umbilical de las madres que cumplieran con todos los criterios de inclusión del estudio (madres con historia obstétrica normal, controles serológicos de enfermedades infecciosas negativos durante la gestación, parto de evolución normal y gestación mayor o igual a 32 semanas).

El muestreo se llevó a cabo por conveniencia, con un diseño por cuota hasta llegar a 97 muestras. Los datos se analizaron por estadística descriptiva que permitió determinar un estimado del número de células CD34+, CD45+ viables en una muestra de sangre completa de cordón umbilical, la cual fue descartada guardando las normas de bioseguridad establecidas por el banco de sangre de dicha institución.

XVI. ANTECEDENTES

A. Células progenitoras

La célula es la unidad de vida más pequeña de la que se desarrolla un ser vivo completo con todos sus órganos, gracias a múltiples divisiones y diferenciaciones celulares que tienen lugar durante el embarazo. Las primeras células que forman el embrión son todas iguales, se denominan células progenitoras porque todas las otras células se derivan directamente de ellas (1).

Las células progenitoras tienen dos características especiales: son capaces de transformarse en células especializadas para cualquier órgano o tejido del cuerpo y pueden producir más células idénticas a ellas, es decir, nuevas células progenitoras con exactamente las mismas propiedades (1, 2).

Algunas de estas primeras células progenitoras comienzan a madurar y se convierten en diferentes tipos celulares: células del cerebro, del hígado, musculares y muchas otras más que son unidades para diversos tejidos. Las células progenitoras indiferenciadas se transforman en células especializadas con tareas y funciones bien definidas. Al mismo tiempo, otras células progenitoras continúan produciendo más células progenitoras de manera que las reservas no se agoten (1, 3).

1. Tipos de células progenitoras

- a. Células embrionarias: en el embrión se puede hablar de dos tipos de células, las pluripotentes o multipotentes y también se dan las llamadas totipotentes, pero estrictamente sólo el cigoto es la única célula totipotente, pues ya en la primera división cigótica, cuando el embrión es de dos células, éstas células resultantes son distintas. La que surge próxima al lugar donde el espermatozoide ha fecundado al oocito, será la que genere toda la masa celular interna del embrión que más tarde en la gastrulación dará las tres capas principales de tejido embrionario: ectodermo, endodermo y

mesodermo. La otra célula dará los tejidos del trofoblasto, que son los tejidos extraembrionarios que darán lugar a la placenta, a las vellosidades coriónicas y al cordón umbilical, que luego servirán para la relación del feto con la madre. De tal manera en la primera división hay una pequeña diferenciación (4, 5).

Las células de la masa celular interna del blastocisto humano (embrión de 5-6 días), tienen el potencial de contribuir a cualquier linaje de células, es decir de cualquiera de las tres láminas embrionarias, y por ello se les denomina pluripotentes. Estas son las llamadas células progenitoras embrionarias (5).

Después de la anidación, el embrión pasa al estadio de gástrula. Las células pluripotentes se diferencian en las tres láminas embrionarias, con lo que dará cada una un linaje específico propio de cada lámina embrionaria. Se las denomina en este estadio células multipotentes, porque ya no pueden dar cualquier tipo de linaje de células (5).

También surge en la etapa de gastrulación, un grupo de células que reciben un nombre distinto, células germinales primordiales que son las que migran hacia una abertura hasta las crestas genitales donde darán origen a las gónadas y gametos. Las células de ese grupo también dan origen a líneas celulares pluripotentes y para distinguirlas de las células progenitoras embrionarias, se denominan células germinales embrionarias (6).

- b. Células progenitoras de adulto: existen células progenitoras en los órganos y los tejidos del cuerpo de adultos. En 1999, el equipo de Angelo L. Vescovi demostró que las células progenitoras no tienen por qué ser únicamente y necesariamente de embriones para que sean capaces de diferenciarse y dar células especializadas. En su laboratorio consiguió que una neurona de rata se diferenciara en células de la sangre. Hay células troncales en muchos tipos de tejido, aunque en pequeña cantidad, que tienen potencialidad suficiente para diferenciarse en otros tipos celulares (2, 3).

Las que han empezado una ligera diferenciación se denominan células progenitoras. La fuente principal de células progenitoras del cuerpo formado parece ser la médula ósea, pero también se han encontrado en grasa, sangre periférica, cerebro, médula espinal, en el interior de los vasos sanguíneos, piel y tejido conjuntivo, córnea, retina, hígado y el páncreas (Anexo 1) (4, 5).

- c. Células del cordón umbilical: hay un importante grupo de células pluripotentes que están en el cordón umbilical del feto, durante el desarrollo del embrión; las células progenitoras se encuentran principalmente en el hígado y en el bazo. En el último tercio del embarazo comienza la migración, trasladándose a la médula ósea por la sangre y llegando al cordón umbilical, donde en el momento del parto están presentes en abundancia. Estas células pueden producir células hematopoyéticas y algunas células mesenquimales (Anexo 1) (6).

B. Células progenitoras hematopoyéticas

La hematopoyesis es el proceso por el que las células progenitoras pluripotentes proliferan y se diferencian de forma ordenada y controlada, para generar células progenitoras, precursoras y maduras. Las células hematopoyéticas, independientemente de su linaje, linfoide o mieloide, derivan de un progenitor común (célula “stem”o troncal, hematopoyética) que es capaz de autorrenovarse y diferenciarse progresivamente (1).

El sistema hematopoyético depende fundamentalmente de la existencia de estas células progenitoras hematopoyéticas para mantener la producción de células sanguíneas maduras (Anexo 2). De acuerdo con el modelo de la hematopoyesis, el proceso de maduración de las células sanguíneas en médula ósea comienza con un reducido grupo celular denominado células progenitoras hematopoyéticas de largo plazo (long-term hematopoietic stem cells, LT-HSC). Las LT-HSC son necesarias para el mantenimiento del sistema hematopoyético durante toda la vida de un organismo, y dan origen a otro grupo

celular denominado células progenitoras hematopoyéticas de corto plazo (short-term hematopoietic stem cells, ST-HSC), las cuales se caracterizan por su mayor cantidad, por entrar más fácil al ciclo celular y dar origen a los progenitores comprometidos en la hematopoyesis (4, 6).

La mayoría de las células progenitoras hematopoyéticas expresan el antígeno CD34, una glicoproteína de membrana que se expresa en la superficie de las células progenitoras hematopoyéticas, así como en algunas células endoteliales y del estroma medular (Anexo 3). Estudios recientes sobre la composición bioquímica y estructural de la molécula CD34, incluido el de la secuencia de los aminoácidos y carbohidratos que la componen, han revelado que este antígeno es una molécula altamente glicosilada y ácida (punto isoelectrico < 4,0), y su peso corresponde a 110.000 daltons (7).

Otros experimentos indican que CD34 es una fosfoproteína, puesto que los procesos relacionados con fosforilación están involucrados como un mecanismo que regula el funcionamiento de las glicoproteínas de superficie y de los receptores de los factores de crecimiento, lo cual podría dar una clave del papel del CD34 como un regulador de los procesos hematopoyéticos (8).

C. Transplante de células progenitoras hematopoyéticas

El transplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) es un procedimiento terapéutico de introducción relativamente reciente en la práctica clínica y por este motivo sigue en plena evolución. Este transplante tiene dos posibles objetivos: primero, la sustitución de la hematopoyesis del paciente por ser total o parcialmente defectuosa, insuficiente o neoplásica y segundo, permitir la recuperación hematopoyética de un paciente que ha recibido un tratamiento antineoplásico en dosis elevadas que originan mielosupresión prolongada o definitiva. Adicionalmente en el TPH a partir de progenitores de un paciente sano, la celularidad inmunocompetente derivada del injerto es capaz de producir una reacción contra la neoplasia, habitualmente leucemia u otras patologías indicadas (Anexo 4) (5, 9).

Es importante mencionar que tras las primeras experiencias realizadas por E. Donnall Thomas en la década de los 50 y 60 (por lo que recibió el premio Nobel de Medicina en 1990), el trasplante de médula ósea comenzó su expansión en los años 70 para experimentar un espectacular desarrollo en las décadas de los 80 y 90 (9).

En el año 2000 se realizaron cerca de 30,000 trasplantes en el mundo, de ellos el 70% fueron autólogos y el 30% alogénicos. La sangre periférica fue la fuente de progenitores hematopoyéticos en el 90% de los trasplantes autólogos y en el 30% de los alogénicos. En el año 2003 se realizaron alrededor de 30,000 TPH en todo el mundo (9).

En la actualidad, el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas se ha expandido a un amplio grupo de modalidades terapéuticas, al ampliar las fuentes de obtención de células progenitoras hematopoyéticas. La fuente clásica de los progenitores hematopoyéticos para trasplante es la médula ósea, pero no es la única, y también se emplean para este fin células progenitoras hematopoyéticas de la sangre periférica después de un estímulo específico, del cordón umbilical o del hígado fetal (10).

A pesar de que la técnica para obtener y administrar médula ósea es muy sencilla, los problemas relacionados con los estudios de histocompatibilidad y el aislamiento del paciente por la necesidad de prevención y tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped y de las infecciones post trasplante, hacen que el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas sea uno de los más complejos en la trasplantología moderna (9).

La morbilidad y mortalidad del procedimiento ha mejorado en los últimos años gracias a un mejor conocimiento del sistema de histocompatibilidad, al desarrollo de la terapia anti-infecciosa, al uso de ambientes con escasa contaminación microbiana, al soporte hemoterapéutico y a la administración de inmunosupresores potentes (10).

Los experimentos en los que se basó el trasplante de médula ósea humano se efectuaron en ratones hace más de 40 años, aunque se plantea que comenzaron en 1891, cuando Brown le administraba a sus pacientes médula ósea por vía oral, como tratamiento para trastornos hematológicos (10).

En 1939, Rasjek y Osgood administraron a sus pacientes médula ósea intramedular y endovenosa para el tratamiento de leucemias y aplasia medular. También en este año se realizó el primer intento de recuperar la hematopoyesis mediante la administración de transfusiones en un paciente con anemia aplásica, así como una pequeña cantidad de médula ósea de su hermano, sin mediar ningún tratamiento condicionante previo (5).

Después que se identificó a la aplasia medular producida por irradiación como una causa importante de muerte en la población japonesa expuesta a los efectos radiactivos de las explosiones de las bombas atómicas, se aceleraron las investigaciones en animales relacionadas con la cantidad de irradiación corporal que era necesaria para provocar aplasia medular y se establecieron las bases para una aplicación clínica más racional del trasplante de médula ósea (5).

Poco tiempo después, en 1951, Lorenz y otros describieron que con la infusión de células de la médula ósea de otro ratón, se podían rescatar los ratones sometidos a irradiación letal. Estos experimentos iniciales parecían demostrar que la protección a las radiaciones se debía a factores humorales. Sin embargo, Barnes y Loutit en 1954, revisando sus propios experimentos y otros realizados, concluyeron que la hipótesis química debía ser remplazada por la celular (5).

Los intentos iniciales de aplicar este método a pacientes con enfermedades hematológicas graves fueron un fracaso, ya que se desconocía la importancia de la similitud de los antígenos de histocompatibilidad entre el donante y el receptor y la necesidad de tratamiento inmunosupresor intenso. Los anticuerpos inducidos por transfusiones y embarazos que reaccionaban con los antígenos presentes en los leucocitos humanos, fueron descritos inicialmente por Miescher y Fauconnet en 1954. Más tarde, Dausset y Van Rood en 1958, utilizaron estos anticuerpos para describir los grupos de HLA (11).

En los años 50 se realizaron casi 200 trasplantes alogénicos de médula ósea en humanos, sin éxito a largo plazo. Sin embargo, durante este tiempo, se obtuvo resultados satisfactorios con el trasplante de gemelos idénticos, que sirvieron de base para el desarrollo de este proceder. En 1959 se utilizaron dosis letales de irradiación corporal

total y médula ósea de un gemelo idéntico, para trasplantar dos pacientes con leucemia linfocítica aguda (LLA) avanzada, con recuperación de la hematopoyesis en algunas semanas, pero los pacientes murieron de enfermedad progresiva (11).

Los primeros trasplantes alogénicos exitosos ocurrieron en 1968 y 1969, donde dos pacientes que sufrían de inmunodeficiencias congénitas y uno con enfermedad de Wiskott Aldrich sobrevivieron al proceder (5).

Posteriormente hubo una aceptación gradual de esta práctica durante los años 70. Los primeros trasplantes autólogos en humanos se realizaron en 1950 por Kurnick y otros, y por McGovern y otros en 1959. Estos implantes parecían proteger contra la toxicidad medular, pero su beneficio clínico era incierto, debido a la ineffectividad en la erradicación de la enfermedad de base (5).

El trasplante autólogo fue utilizado exitosamente, primero en pacientes con linfomas en los años 70, y su uso se amplió en todo el mundo en la década de los 80. Los inicios del trasplante de sangre periférica fueron en 1962, cuando Goodman y Hodgson demostraron la existencia de células progenitoras hematopoyéticas en la sangre de los ratones, las que podían recolectarse de forma exitosa, cuando comenzó a desarrollarse la tecnología de la citocentrifugación (11).

Esta fuente de células progenitoras hematopoyéticas se comenzó a utilizar en pacientes en los que no se podían obtener células progenitoras medulares, debido a su enfermedad de base o a irradiación previa y su uso se amplió después de descubrir que los factores de crecimiento hematopoyéticos causaban una liberación transitoria de células progenitoras hematopoyéticas en la sangre periférica. De esta forma, en 1981 se introdujo la sangre periférica como fuente de células progenitoras hematopoyéticas (5, 11).

La demostración de la presencia de células progenitoras hematopoyéticas en el cordón umbilical sugirió el uso de estas células para la realización de los trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas y el primer trasplante exitoso de esta fuente se publicó por Gluckman y otros en 1989. Debido a la poca probabilidad de encontrar un donante familiar compatible, se realizaron los primeros trasplantes no relacionados en los años 70. La heterogeneidad de los haplotipos HLA hizo necesaria la realización de grandes

paneles de donantes, hasta la existencia hoy del registro internacional de donantes, no familiares (12).

En Guatemala, para el año 2006 se cuenta con tres entidades privadas que ofrecen el servicio de criopreservar las células de cordón umbilical, la empresa líder capta alrededor de 28 familias mensualmente (13).

1. Tipos de TPH

a. Según el tipo de donante:

- i. Autólogo (autogénico o autotrasplante): si los progenitores son obtenidos del propio paciente con anterioridad al tratamiento antineoplásico en dosis altas.
- ii. Singénico o isogénico: a partir de un gemelo univitelino.
- iii. Alogénico: individuos de la misma especie, distintos a gemelo univitelino. Puede ser emparentado cuando el donante es un familiar habitualmente HLA idéntico o no emparentado cuando el donante no es familiar ni tiene el HLA idéntico (14).

D. Fuentes de células progenitoras hematopoyéticas

1. Médula ósea

Es la fuente tradicional de células progenitoras hematopoyéticas para el trasplante tanto alogénico como autólogo. La mayoría de los equipos que realizan el trasplante de médula ósea siguen la técnica de Thomas, en la que al donante (o al paciente en el caso de un autotrasplante), se le administra en el quirófano anestesia general o raquídea y se practican entre 100 y 200 punciones aspirativas en las crestas ilíacas, con las que se obtienen en el adulto normal entre 800 y 1,200 mL de sangre medular con un contenido de entre $1,5$ y $3,5 \times 10^8$ células por Kg del receptor. En el niño se debe obtener una muestra de 10-20 mL por Kg del receptor (5).

A medida que se extrae la médula se deposita en un medio heparinizado para al final, pasarla a través de filtros de 200 a 300 nm de luz. De esta forma, los grumos medulares se convierten en suspensiones celulares y se eliminan las esquirlas óseas. En el trasplante de médula ósea alogénico (Anexo 5) esta sangre medular se transfunde 24 horas después de finalizado el régimen de acondicionamiento por vía intravenosa (9).

Las células progenitoras hematopoyéticas son capaces de llegar o regresar a la médula en un día. Las moléculas de adhesión, tales como VLA-4 y otras, son importantes en el anidamiento celular. En el trasplante de médula ósea autólogo la sangre medular se criopreserva hasta el momento de la transfusión (Anexo 6) (9).

2. Sangre periférica

Las células progenitoras hematopoyéticas circulan en la sangre periférica en cantidades extremadamente bajas. Después de la administración de factores estimulantes de colonias (CSF) y/o quimioterapia se observa un aumento dependiente del tiempo de las células progenitoras hematopoyéticas y células progenitoras, denominado movilización (1, 5).

El régimen de movilización más habitual incluye la administración de G-CSF a 10 µg/Kg/día, seguido por aféresis al cuarto y quinto día. La administración de células progenitoras de sangre periférica movilizadas ha dado lugar a una reconstitución hematopoyética más rápida que la que se observa después de un trasplante de médula ósea. Esta ventaja reduce significativamente la morbilidad y mortalidad del trasplante, y el uso de células progenitoras de sangre periférica movilizadas ha sido ampliamente aceptado en el trasplante autólogo. La dosis óptima de células necesarias está sujeta a controversia, sin embargo la mayoría de los centros que efectúan trasplantes ha observado que los productos de células progenitoras que contienen más de 2×10^6 células CD34+/Kg producen una recuperación hematopoyética rápida (5, 6, 12).

3. Cordón umbilical

El primer trasplante alogénico de cordón umbilical exitoso se realizó en 1989, para tratar a un niño con anemia de Fanconi cuya donante fue su hermana HLA idéntica (9).

Las células CD34+ derivadas de sangre de cordón umbilical son capaces de generar gran cantidad de células maduras en cultivo sin reducir el número de células CD34+ en el mismo, mientras que las células CD34+ de médula ósea adulta disminuyen en el cultivo a medida que producen células maduras, lo que indica que las células primitivas que provienen de la médula ósea pierden su capacidad de autorrenovación *in vitro* (6, 7).

Las células de cordón son muy inmaduras por lo que no tienen casi ninguna marca específica del individuo nacido, soportan tolerancias de uno o dos antígenos leucocitarios humanos (HLA) sin concordancia, que hace que la incidencia de la enfermedad injerto contra huésped severa sea baja. Además su obtención no daña a la madre ni al niño. Al extraer la sangre del cordón umbilical poco después del parto y prepararla profesionalmente en un laboratorio especializado, estas células progenitoras se pueden conservar con seguridad durante décadas a la espera de su uso en algún paciente (5, 7).

Se ha demostrado que el cordón umbilical de recién nacidos tanto a término como pretérmino, contiene un número determinado de progenitores hematopoyéticos inmaduros y comprometidos, capaces de producir el implante en niños y adultos. Su eficacia en estos últimos está por probarse, ya que el número de células es muy pequeño para proveer un implante duradero (9).

En la actualidad, la sangre de cordón umbilical es la segunda fuente en niños y la tercera para trasplante en adultos; se ha empleado en enfermedades genéticas y malignas y se ha utilizado en pacientes con compatibilidad total o parcial, familiares y no familiares (9).

Para la obtención de estas células se necesita una serie de requisitos como: mujeres con historia obstétrica normal, controles serológicos negativos durante la gestación, ausencia de antecedentes médicos maternos o paternos que supongan un riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas o genéticas a través de la sangre del cordón, desarrollo normal del parto y consentimiento informado firmado por la madre (9).

Se debe excluir partos antes de las 32 semanas de gestación, fiebre en el momento del parto mayor a 38 °C, inmunización feto-materna y signos de sufrimiento fetal. Durante el embarazo se realiza una historia clínica y se efectúan determinaciones serológicas de enfermedades infecciosas de la madre, así como cultivo de la sangre del cordón. Al nacimiento se repiten estos exámenes serológicos y se hace un examen minucioso del recién nacido (14, 15).

Los resultados serológicos, junto con el volumen, celularidad, estudio HLA y grupo sanguíneo, se guardan en un registro confidencial autorizando el uso terapéutico de la donación. Si no cumple las características requeridas, la sangre del cordón es desechada (14, 15).

Una unidad de sangre del cordón se considera apta para el trasplante cuando presenta las condiciones siguientes:

Volumen: 40-250 mL

Recuentos de células nucleadas: $102-107 \times 10^7$ /unidad

Recuentos de CD34+: 3×10^6 /unidad ($0,5-16 \times 10^6$ CD34/unidad).

Viabilidad: 70-99%

Se sabe que las células progenitoras del cordón umbilical poseen una expansión *ex vivo* mayor que las células de la médula ósea cuando son estimuladas con factores de crecimiento. La expansión de las células CD34+ del cordón umbilical durante 14 días con interleucina 11 (IL-11) y G-CSF, es significativamente mayor que la realizada en células de la médula ósea (5).

Se ha demostrado una alteración significativa en el número de citocinas y linfocinas hematopoyéticas en la sangre obtenida del cordón umbilical, tales como G-CSF, GM-CSF, así como de IL-3 comparado con el adulto, lo que explica que el neonato está más propenso a infecciones. Esto lleva a la demora en la recuperación hematológica e inmune después del trasplante (9).

Con el objetivo de aumentar el número de células, se utilizan múltiples cordones umbilicales en combinación para lograr el injerto. Barkers y otros describieron un estudio en pacientes con hemopatías malignas de alto riesgo, que no poseían donantes relacionados y fueron trasplantados usando dos cordones umbilicales, después de un acondicionamiento

intenso, demostrando que el injerto ocurre más rápido que cuando se usa un solo cordón umbilical (9).

E. Banco de sangre de cordón umbilical

En los primeros años de la década de 1980, el Dr. Pablo Rubinstein concibió el programa de donación de sangre de placenta y cordón umbilical en la ciudad de Nueva York, para formar el primer banco de células de cordón umbilical en el mundo. Posteriormente en 1992 el programa de donación de sangre de placenta y cordón se puso en práctica. Un año después se llevó a cabo el primer trasplante de células de cordón umbilical procedente de un donador sin parentesco en la Universidad de Duke, empleando una unidad de cordón proporcionada por el New York Blood Center (1, 15).

Ésta fue la primera fuente ampliamente disponible de células progenitoras hematopoyéticas para el reemplazo de médula ósea, que además poseía ventajas significativas sobre el trasplante ordinario de médula ósea de donador no relacionado (1).

Algunas compañías privadas también ofrecen los servicios de almacenamiento de sangre de cordón, en Guatemala se cuenta con tres bancos de células privadas, dos que exportan las células para ser criopreservadas y uno que realiza la criopreservación dentro del país.

Existe una serie de datos que conviene examinar acerca de los resultados de los trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas de donadores no relacionadas por los bancos de células de cordón umbilical, primero el número de leucocitos por kilogramo de peso del receptor se correlaciona con el tiempo de prendimiento del injerto, por lo que una unidad con mayor cantidad de leucocitos, o posiblemente su expansión *ex vivo*, pueden acelerar el prendimiento. Sin embargo, el tiempo de recuperación plaquetaria es similar al que se obtiene en los trasplantes de médula ósea. Segundo la edad del paciente se correlaciona significativamente con la sobrevida libre de enfermedad, por lo que sólo el 20% de trasplantes de sangre de cordón umbilical se realiza en adultos. Tercero si hay incompatibilidad entre los antígenos del sistema HLA, las probabilidades de que el trasplante no dé buenos resultados son mayores y cuarto en lo que respecta a los

argumentos en favor de almacenar la sangre de cordón para su uso posterior en trasplantes autólogos, si se considera la posibilidad del desarrollo de una leucemia u otras enfermedades, existe el temor de la morbilidad postrasplante que incluye la enfermedad injerto contra huésped. Sin embargo, el trasplante con una médula idéntica en cuanto a HLA o autóloga se relaciona con una mayor frecuencia de recaída leucémica, ya que estos trasplantes no inducen el efecto injerto contra leucemia (1, 16).

1. Recolección de la sangre de cordón umbilical

La sangre de cordón umbilical puede colectarse ya sea *in utero* o *ex utero*. La técnica más común es la *in utero*, es decir la que se realiza previo al alumbramiento de la placenta. Para ello se pinza el cordón a 5 cm del ombligo con dos pinzas colocadas lo más cerca posible, se corta el cordón entre ellas y se realiza asepsia con etanol al 70% y tintura de yodo. El cordón se debe puncionar con aguja 16G incorporada a una bolsa de recolección con 20 mL de anticoagulante CPD-A con capacidad de 250 mL, el cordón se exprime suavemente y se deja correr la sangre venosa por gravedad en la bolsa de recolección.

Posteriormente se determina el volumen, se realizan recuentos celulares de células totales, mononucleares, CD34 y viabilidad; tipificación HLA, grupo sanguíneo y factor Rh, serologías virales y cultivo para bacterias y hongos.

En la técnica *ex utero* se cuelga la placenta y se siguen los mismos pasos que para el método *in utero* (17).

2. Concentración celular

La concentración celular utilizada en la mayoría de protocolos de criopreservación tiene como objetivo minimizar el volumen total para optimizar el espacio destinado al almacenamiento (16).

Por esta razón desde la introducción de la sangre periférica como fuente de progenitores hematopoyéticos, se recomendaron concentraciones menores de 100×10^6 células nucleadas/mL en los productos criopreservados (18).

La concentración celular se logra agregando reactivos como el almidón hidroxietil, que ayuda a sedimentar los glóbulos rojos para poder separar el plasma, este último se somete a centrifugación diferencial para obtener un volumen de aproximadamente 20 mL que contiene los progenitores hematopoyéticos (16).

Es muy importante considerar que la concentración de los progenitores hematopoyéticos se debe iniciar en menos de 48 horas después de su obtención, para lograr un buen porcentaje de viabilidad celular; así mismo debe realizarse otro recuento de progenitores hematopoyéticos y cálculo de viabilidad en el concentrado, ya que es el producto final que se criopreservará (1, 17)

3. Crioprotección

Además de una adecuada velocidad de enfriamiento, para mejorar la viabilidad celular, es necesario alterar el comportamiento físico-químico de las soluciones acuosas en las cuales tiene lugar la criopreservación, para ello se añaden al medio de congelación agentes crioprotectores (18).

Los agentes crioprotectores son sustancias muy hidrosolubles y de baja citotoxicidad, que disminuyen el punto eutéctico (temperatura mínima a la que una solución se encuentra en estado líquido) de una solución determinada. Esta disminución implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que en el momento en el que se induce la nucleación en el espacio extracelular, la célula estará más hidratada y el gradiente osmótico al que estará sometida será menor en el momento en que el espacio extracelular se congela. De acuerdo a la permeabilidad a través de la membrana los crioprotectores se clasifican en:

- a. Agentes penetrantes: son sustancias de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana, que protegen a la célula de las lesiones producidas por las congelaciones a velocidad lenta. Los más utilizados son: 1,2-propanodiol (PROH), dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol y glicerol.

Ninguno de ellos es de la misma magnitud que la permeabilidad del agua (18).

- b. Agentes no penetrantes: son sustancias de alto peso molecular, que son efectivas cuando se utilizan velocidades altas de congelación. No son crioprotectores propiamente dichos, ya que no penetran en la célula sino que ejercen su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociadas a los agentes penetrantes. Los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa, polivinil-pirrolidina (PVP), dextrano y polietilenglicol (18).

Dependiendo de la permeabilidad del crioprotector utilizado y de su citotoxicidad, la adición se realiza a 4°C, 25°C ó 37°C. Los agentes crioprotectores pueden añadirse y extraerse gradualmente o en un solo paso, lo que reduce el tiempo de exposición celular al crioprotector. Las técnicas utilizadas actualmente para uso clínico se han definido empíricamente para obtener la máxima viabilidad celular (18, 19).

4. Congelación

El objetivo principal de la criopreservación de progenitores hematopoyéticos es mantener la viabilidad y funcionalidad de los injertos a bajas temperaturas durante períodos cortos de tiempo (en el caso de aféresis y médula ósea) o incluso durante décadas (sangre de cordón umbilical). Los productos de criopreservación se almacenan a -196°C en nitrógeno líquido. A esta temperatura no existen fenómenos de difusión ni energía térmica suficiente para llevar a cabo las reacciones químicas y por tanto las dificultades de la congelación no derivan de la permanencia a temperaturas bajas sino de los procesos de congelación y descongelación (16, 17).

Antes de proceder a la disminución de temperatura en el proceso de congelación, se adiciona a las células el crioprotector de manera progresiva durante 5 minutos a 4°C con el

objetivo de permitir que la concentración de éste se equilibre entre el exterior y el interior celular (1, 17).

Posteriormente se introduce la solución con las células en un congelador biológico y se enfría la mezcla paulatinamente. Durante el proceso de enfriamiento, entre los 4°C y los -10°C, se somete a las células a temperaturas menores que las de congelación de la solución que las circunda, pero tanto las células como el líquido extracelular se mantienen sin congelar. El hielo se forma preferentemente en la solución extracelular (17, 20).

Al producirse cristalización las moléculas de agua se incorporan al hielo mientras que el soluto queda excluido de la fase sólida. De esta manera el espacio extracelular que se va concentrando progresivamente (se va haciendo cada vez más hipertónico) a la vez que el potencial químico del agua (en el espacio extracelular) decrece. Este cambio potencial perturba el equilibrio termodinámico entre los espacios intra y extracelular y produce una salida de agua de la célula que intenta revertir el desequilibrio. En consecuencia, la célula se deshidrata progresivamente a medida que el espacio extracelular se va concentrando y al mismo tiempo que el agua que exporta la célula se congela en el exterior (20).

Los procesos de criopreservación se realizan mediante el uso de congeladores biológicos que enfrían las muestras según unas curvas programadas de congelación. En estos congeladores la transmisión de temperatura entre la cámara interior y las muestras a criopreservar se maximiza mediante el uso de placas metálicas que cubren las muestras dentro del congelador. Las curvas programadas de congelación, se componen de segmentos cada uno de los cuales tiene una velocidad de enfriamiento (°C/min) determinada empíricamente para obtener una máxima viabilidad tras el proceso de congelación. Una vez alcanzada la temperatura de -50°C, se retira la suspensión celular del congelador biológico y se almacena en la fase líquida de un tanque de nitrógeno (1, 20).

5. Descongelación y reinfusión de las células progenitoras hematopoyéticas

La descongelación del producto hematopoyético criopreservado es el último proceso antes de la infusión en el paciente. Este proceso se realiza mediante la inmersión del injerto hematopoyético en un baño a 37°C aplicando un suave masaje en la bolsa hasta que

no queda hielo visible. Este proceso de descongelación rápida ($> 100^{\circ}\text{C}/\text{min}$) evita la recristalización del agua, que puede dañar las membranas mecánicamente (21).

El dextrano 40 y las proteínas (moléculas que asocian agua a su estructura molecular) pueden ayudar al control del flujo de entrada de agua en las condiciones descritas (21).

La infusión directa de los productos hematopoyéticos descongelados está asociada a diversas complicaciones que varían desde las frecuentes náuseas y vómitos hasta las inusuales pero reportadas complicaciones cardiovasculares y neurológicas. Estas complicaciones relacionadas con el trasplante se conocen con el término toxicidad asociada al trasplante de progenitores y se atribuyen a la infusión de DMSO y de restos celulares (21, 22).

Para reducir y evitar la toxicidad asociada al trasplante de progenitores hematopoyéticos se han propuesto diversas aproximaciones; la criopreservación a altas concentraciones de células nucleadas, el uso de menos DMSO en las soluciones de criopreservación, la mezcla de crioprotectores, el fraccionamiento de las infusiones y la selección de células progenitoras para reducir el volumen del producto criopreservado. Sin embargo todas estas técnicas resultan en una reducción limitada de crioprotector y de los restos celulares y moléculas resultantes de la lisis celular post congelación (21).

Alternativamente, se ha propuesto la eliminación del DMSO antes de la infusión mediante técnicas de centrifugación y extracción de volumen tanto manual como semiautomática. En estas técnicas el sobrenadante que contiene parte del DMSO es descartado tras la centrifugación y el pellet que contienen las células es resuspendido en un medio isotónico antes de la infusión. Los resultados reportados al respecto son variables y casi siempre resultan en poca eliminación del DMSO y nada o casi nada de reducción de los debrís celulares. Además estas técnicas pueden resultar en una pérdida sustancial y disminución de viabilidad de progenitores, comprometiendo la probabilidad de injerto y por tanto deben considerarse con cautela (17, 21, 22).

Por tanto, el uso de sistemas automáticos de lavado celular postdecongelación que aseguren una recuperación celular aceptable, que produzcan resultados reproducibles y

funcionen en sistemas cerrados podría ser de gran utilidad para aminorar los efectos de la infusión directa de productos hematopoyéticos descongelados (22).

F. Citometría de flujo

El citómetro de flujo es un equipo capaz de medir componentes y propiedades de células y organelos celulares. La intersección de cada célula con el haz de luz láser provoca la emisión de una serie de señales luminosas que permiten diferenciar las diferentes subpoblaciones celulares dentro de una muestra por su tamaño, por su granularidad y por su interacción con los anticuerpos monoclonales y sus fluorocromos (Anexo 7) (16).

1. Partes de un citómetro

- a. Sistema de inyección de muestra: es el sistema que aporta una corriente de fluido hidrodinámico por medio de una presión diferencial entre el contenedor de la muestra y el contenedor de fluido envolvente. Las velocidades normales de flujo oscilan entre los 12 y 60 mL por minuto (16).
- b. Sistema óptico: Consta de un láser, filtros, lentes y detectores. La fuente de luz es producida normalmente por un láser. En la mayoría de los citómetros se instala un láser de gas (comúnmente argón) refrigerado por aire, que produce una luz monocromática de 488 nm. Esta luz es utilizada para la excitación de la mayoría de los fluorocromos y provoca la dispersión de luz que nos informa de las características celulares. Un prisma situado al final del tubo de argón selecciona una única longitud de onda. El sistema óptico está formado por dos detectores de dispersión de luz y entre tres y cuatro detectores de fluorescencia, aunque lo normal oscila entre cuatro y seis. Mediante el detector de dispersión de luz hacia delante se determina el tamaño de las células (FSC) y mediante el detector de dispersión en ángulo recto se determina granularidad celular, o lo que es lo mismo complejidad

interna de la célula. Los sistemas de detección de fluorescencia están situados en ángulo recto y mediante ellos se determinan las células marcadas con fluorocromos. La emisión de cada uno de estos fluorocromos se selecciona por medio de un sistema óptico compuesto por filtros y espejos dicróicos y se envía a un detector específico. Estos detectores generan pulsos eléctricos directamente proporcionales al área, altura y anchura de la cantidad total de luz detectada, la intensidad máxima detectada y la duración de la señal luminosa respectivamente. Las señales recibidas se amplifican multiplicándolas por un factor lineal o logarítmico. El pulso amplificado se lleva a un convertidor analógico/digital que convierte la señal recibida a una señal digital manejable por un ordenador, con valores en la escala lineal que oscilan entre 0 y 1024 incrementos, entendiendo por incremento el valor de 0.01 voltio. Normalmente las medidas de tamaño y granularidad se miden en escala lineal y las medidas de fluorescencia en escala logarítmica (Anexo 7) (16).

- c. Sistema electrónico informático: convierte la luz dispersa en señales eléctricas y las procesa para su posterior análisis. Posee programas que son capaces de mantener la información de cada una de las células por separado, de forma que podemos enfrentar unos parámetros con otros en ventanas bidimensionales o tridimensionales. Así pues, de cada célula tenemos dos tipos de datos, los cualitativos y los cuantitativos o lo que es lo mismo obtenemos información de la presencia de un determinado epítipo y de su nivel de expresión (Anexo 7) (16).

2. Parámetros del citómetro de flujo

- a. Sensibilidad: es el número de marcadores detectables para la fluorescencia. Depende de muchos factores como el tiempo que transcurre, el solapamiento entre las longitudes de onda de excitación y el espectro de absorción del fluorocromo (23).

- b. Especificidad: se debe considerar que los citómetros ofrecen una información relativa, no absoluta. Para cuantificar hay que correlacionar los canales con resultados de muestras conocidas, es decir, calibrar y ajustar las escalas. Para ello se utilizan estándares de alineación, que son materiales estables que tienen unos valores determinados de fluorescencia o dispersión de la luz, válidos para detectar cambios y problemas en la configuración óptica y señal con el tiempo. Estos estándares se basan en el cálculo del radio entre los dobletes/singletes analizados de un marcaje control. Actualmente se ofrece una linealidad entre 1.95 y 2.05 para cada láser (23).
- c. Resolución: se define como la partícula más pequeña detectable que es un valor cercano a 1 μm . en el caso de la fluorescencia, la resolución se mide como coeficiente de variación, es decir la desviación estándar relativa de la media de la señal producida por las células o partículas analizadas. En este caso, la resolución dependerá de la estabilidad de la fuente de luz, del flujo de la muestra, de su anchura, de la intensidad de la señal y la luminiscencia de fondo o ruido. Actualmente los citómetros tienen una resolución menor al 3% (23).
- d. Velocidad media: los citómetros han evolucionado mucho en este aspecto, así se han llegado a conseguir velocidades de análisis realmente elevadas. La velocidad normal de medida es de 5000 células por segundo dependiendo de los parámetros que se quieran analizar.
- e. Número de parámetros medibles por muestra: la mayoría de los citómetros de flujo vienen preparados con uno o dos láseres y con cuatro lentes, lo que nos permite analizar hasta seis parámetros a la vez (23).

3. Recuento de células CD34+ viables por citometría de flujo

El recuento de progenitores hematopoyéticos CD34+ presentes en muestras de sangre de diversas fuentes, obtenidas para su posterior uso con fines terapéuticos en el trasplante de progenitores hematopoyéticos, es de gran utilidad clínica. Ello

se basa en la necesidad de infundir un número mínimo de células CD34+ viables para asegurar la eficacia del trasplante y a que la cinética de recuperación de las cifras de las células hematopoyéticas funcionalmente maduras se ha relacionado con el número total de células CD34+ infundidas (17).

En base al recuento de células CD34+ se decide el número de tomas de muestra a realizar, cuando se están midiendo las células para crioconservarlas, se realizan tres mediciones, la primera en sangre completa, la segunda después de concentrar las células y la tercera luego de descongelar para infundirlas en el paciente. El parámetro que posee utilidad clínica es el número total de células CD34+ vivas que serán infundidas.

Para llevar a cabo el cálculo la Sociedad Internacional de Hemoterapia e Ingeniería de Trasplantes (Siglas en inglés: ISHAGE) hace obligatoria la realización de cuatro mediciones: el volumen total de muestra disponible, el número absoluto de células nucleadas por unidad de volumen, el porcentaje de células CD34+ del total de células nucleares y el porcentaje de viabilidad (24, 25).

La determinación del porcentaje de células CD34+ del total de células nucleadas presentes, representa una de las posibles fuentes de variabilidad del conteo de las células CD34+, la toma de una porción representativa global de la muestra para análisis y su posterior dilución para el conteo, pueden influir en los resultados finales, al introducir niveles elevados de variabilidad si no se realizan de forma controlada y estandarizada (24).

La citometría de flujo constituye el método de elección empleado para el conteo del porcentaje de células CD34+ respecto a la celularidad global. En la actualidad existen métodos disponibles para llevar a cabo de forma directa el conteo del número absoluto de células CD34+ viables por unidad de volumen realizando las siguientes mediciones:

- a. Identificación específica de células CD34+: para ello se considera la autofluorescencia de los monocitos y granulocitos y la unión inespecífica de anticuerpos tanto a células vivas como muertas. La selección del anticuerpo

monoclonal y el fluorocromo más apropiados contribuye a mejorar de forma notable la discriminación entre marcaje específico y fluorescencia inespecífica. Con el fin de lograr una mejor discriminación de las verdaderas células CD34+ se ha acordado emplear anticuerpos monoclonales anti CD34+ de clase III conjugados con el fluorocromo más sensible de uso más extendido en la actualidad, la ficoeritrina (PE). Por otro lado la expresión de proteína CD34 en precursores hematopoyéticos es heterogénea, siendo superior en la fracción celular más inmadura, ello hace que existan células que expresen débilmente el antígeno CD34, lo cual puede representar la mitad o más del total de células CD34+, ésta es la razón por la que se ha acordado contabilizar únicamente los precursores que expresan CD34 de alta intensidad con el fin de disminuir la variabilidad intra e interlaboratorios y facilitar la estandarización del conteo de células CD34+ (26, 27).

Para disminuir el conteo de células CD34+ eventos erróneamente positivos, se ha sugerido la utilización del marcaje simultáneo para el antígeno CD45, el empleo de fluorocromos de viabilidad celular de tandem ficoeritrina/ciananina 5 o de los parámetros de dispersión de luz (FSC/SSC), que excluiría el conteo de células muertas (27).

- b. Conteo del número de células CD34+ por unidad de volumen: el conteo del número absoluto de células CD34+ presentes en una muestra puede llevarse a cabo en dos mediciones distintas o en una sola. En la primera opción se calcula el número de células CD34+ del total e células nucleadas presentes en la muestra y posteriormente se determina el número de células nucleadas por unidad de volumen, medición que habitualmente se realiza en un contador celular estándar. En la segunda opción los métodos habitualmente empleados utilizan un estándar interno añadido a un determinado volumen de muestra. Por medio de regla de tres se calcula a partir de la proporción relativa de células CD34+ y de microesferas presentes en la muestra, la concentración de células CD34+ por unidad de volumen de la muestra (27).

- c. Viabilidad celular: se calcula midiendo las células dañadas, por medio de reactivos como el 7-aminoactinomicina (7-AAD), que puede medirse gracias a la permeabilidad aumentada de la membrana de las células no viables. El citómetro mide las células CD34+, CD45+ 7-AAD negativo (27).

XVII. JUSTIFICACIÓN

Las células progenitoras hematopoyéticas, son células con el potencial de autorrenovarse y diferenciarse progresivamente en células hematopoyéticas maduras del linaje linfoide o mieloide, estas propiedades permiten que sean utilizadas como terapia para pacientes con hematopoyesis defectuosa o mielosupresión prolongada o definitiva. La principal fuente de células progenitoras hematopoyéticas es la médula ósea, pero la falta de donadores compatibles, el riesgo de rechazo del tipo hospedero y la lenta recuperación inmunológica, han hecho que sea necesario investigar nuevas fuentes como sangre periférica y sangre de cordón umbilical.

La sangre de cordón umbilical se ha convertido en la alternativa de elección, por su fácil obtención y porque este tipo de células causan un menor rechazo por parte del receptor. Estas células se someten a procedimientos de concentración y de criopreservación y permanecen en un banco hasta el momento de ser utilizadas.

El primer paso para poder implementar esta tecnología es estimar la cantidad de células CD34+, CD45+ viables en sangre completa de cordón umbilical. Este estimado permitirá evaluar la pérdida de progenitores hematopoyéticos durante los procedimientos de concentración y crioconservación, y podría servir de parámetro para implementar el programa de trasplantes de médula ósea y de sangre de cordón umbilical del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS).

XVIII. OBJETIVOS

A. Objetivo General

Determinar el recuento y viabilidad de células progenitoras hematopoyéticas en sangre completa de cordón umbilical de madres sanas.

B. Objetivos Específicos

1. Establecer un estimado del número de células progenitoras hematopoyéticas vivas y el porcentaje de viabilidad de las mismas en 97 muestras de sangre completa de cordón umbilical de madres sanas.
2. Identificar las células progenitoras hematopoyéticas por medio del marcaje de las proteínas CD34 y CD45.
3. Determinar si la sangre de cordón umbilical tiene el mínimo de 0.5×10^6 células CD34+ por unidad para ser crioconservada.
4. Contribuir en investigaciones posteriores que requieran la cantidad de células CD34+, CD45+ viables que hay en cordón umbilical.

XIX. HIPÓTESIS

Por ser un estudio descriptivo, no aplica el planteamiento de una hipótesis.

XX. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo y muestra

1. Universo: sangre de cordón umbilical de mujeres embarazadas que asistieron a control pre-natal en la clínica de madres sanas del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) de Gineco-obstetricia.
2. Muestra: 97 muestras de sangre completa de cordón umbilical de fetos a término, cuyas madres firmaron el consentimiento informado y cumplieron con los criterios de inclusión.

B. Materiales

1. Equipo
 - a. Agitador vórtex
 - b. Citómetro FACSCalibur de Becton Dickinson
 - c. Micropipetas de 450 μ L, 50 μ L y 20 μ L
2. Reactivos
 - d. Controles BD alto y bajo para el proceso de sangre entera CD34+
 - e. BD Via – Probe (reactivo para identificar viabilidad de células)
 - f. Diluyente para citómetro de flujo
 - g. Etanol al 70%
 - h. Kit de anticuerpos monoclonales CD45 FITC/CD34 PE
 - i. Solución de lisis de cloruro de amonio al 10%
 - j. Solución salina fisiológica
 - k. Tubos Truocount (tubos con perlas de referencia para cuentas absolutas)

3. Materiales

- a. Algodón
- b. Bolsas de recolección sanguínea con 23 mL de anticoagulante CPD-A y aguja 16G
- c. Puntas de pipeta de 10 a 200 μ L
- d. Puntas de pipeta de 200 a 1000 μ L

4. Instrumentos

- e. Consentimientos informados para las madres que cumplan con los criterios de inclusión y que deseen participar en el estudio.
- f. Estadística descriptiva
- g. Software BD CellQuest Pro Versión 2.0

B. Recursos humanos

1. Ingrid Mirtala López Calderón, estudiante de la carrera de Química Biológica, tesista.
2. QB. MSc. Glenda Escalante de Ramírez asesora de tesis.
3. QB. MA. Margarita Paz, revisora de tesis por parte de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
4. Licda. Isabel Gaitan revisora de tesis por parte de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
5. Médicos residentes y personal de enfermería del Hospital de Gineco-obstetricia del IGSS.

C. Diseño estadístico

1. Número de muestra: considerando un nivel de confianza del 95%, una variabilidad esperada de 0.125×10^6 y un límite de error en la estimación de 0.05×10^6 , el número de muestra mínimo es de 25. Sin embargo para fines

del estudio, el número de muestra fue por conveniencia 97 pacientes, que autorizaron su participación en el estudio y que cumplieron con los criterios de inclusión.

2. Diseño de muestreo: por cuota.
3. Criterios de inclusión: madres con historia obstétrica normal, con previa firma del consentimiento informado, controles serológicos de VIH, sífilis, hepatitis A y B, TORCH (toxoplasma, rubéola, chagas) negativos durante la gestación. El parto debe ser de evolución normal y gestación mayor o igual a 32 semanas. La unidad debe tener un volumen mayor de 40 mL y una celularidad de CD34+, CD45+ mayor a 20/ μ L.
4. Análisis de datos: se realizó por medio de estadística descriptiva sacando un promedio, desviación estándar, rangos y gráficas de los recuentos de células progenitoras hematopoyéticas vivas de cordón umbilical de madres sanas y también el porcentaje de viabilidad de las mismas, según los reportes obtenidos del citómetro, utilizando el software Cell Quest Pro Versión 2.0 (Anexo 8).

D. Métodos

1. Recolección de muestra

- a. Se recolectó la muestra después del parto y antes de la expulsión de la placenta.
- b. Se pinzó el cordón umbilical a 5 cm del ombligo del recién nacido con dos pinzas y luego se cortó el cordón entre ellas.
- c. Se puncionó el cordón con aguja 16G incorporada a una bolsa de recolección con 23 mL de anticoagulante CPD-A y con capacidad de 250 mL.
- d. Se exprimió suavemente el cordón y dejó correr la sangre venosa por gravedad.

- e. Las muestras permanecieron a temperatura ambiente y en oscuridad hasta procesar en el laboratorio (6).

2. Análisis por citometría de flujo

- a. Calibración del citómetro
 - i. Se preparó dos tubos rotulados, uno para el ajuste de los fotomultiplicadores PMTs (tubo A) y el segundo para compensar fluorescencias y la sensibilidad del instrumento.
 - ii. Al tubo A se agregó 1 mL del diluyente para el citómetro y 1 gota del reactivo de partículas sin marcar, se mezcló durante 30 segundos en el vórtex.
 - iii. Al tubo B, se agregó 3 mL del diluyente para el citómetro, 1 gota del reactivo de partículas sin marcar, 1 gota de cada uno de los siguientes reactivos: FITC, PE y PerCP, se mezcló durante 30 segundos en el agitador vórtex.
 - iv. Se introdujo en el citómetro sucesivamente las mezclas de los tubos A y B, se calibró en FACScmp para medir el voltaje de los fotomultiplicadores PMTs (tubo A) y los umbrales de la fluorescencia (15).
- b. Procedimiento para los controles de células progenitoras hematopoyéticas en sangre completa
 - i. Se dejaron reposar a temperatura ambiente (18-26°C) durante 15 minutos.
 - ii. Se sujetó verticalmente entre las manos el vial del control bajo y se rodó entre ellas 10 veces. Se repitió hasta que quedara totalmente en suspensión.
 - iii. Se invirtió el vial 5 veces justo antes de tomar la muestra.
 - iv. Se configuró el citómetro de flujo y se procesó de la misma forma que una muestra.
 - v. Se repitió el procedimiento para el control alto.

- c. Procedimiento para anticuerpos monoclonales en muestras de sangre completa
- i. Se agregó 20 μ L CD45 FITC/CD34 PE, 20 μ L de BD Via Probe y 50 μ L de muestra a cuantificar en un tubo Trucount.
 - ii. Se agitó e incubó 15 minutos a 25°C.
 - iii. Se agregó 1 mL de solución de lisis de cloruro de amonio.
 - iv. Se agitó e incubó 5 minutos a 25°C y se leyó en el citómetro de flujo.
 - v. Se analizó con el programa Cell Quest Pro para obtener el número de células vivas/ μ L y el porcentaje de viabilidad (Anexo 8) (27).

E. Descarte de las muestras

Después del análisis, las muestras se descartaron siguiendo el protocolo establecido por el banco de sangre del Hospital General de Enfermedades del IGSS. En todo momento las bolsas se manejaron como material infecto contagioso, por lo que se enviaron a la empresa encargada de recoger los desechos en dicha institución, para su adecuada destrucción.

F. Aspectos éticos

La participación de las pacientes en este estudio fue completamente voluntaria. Las participantes firmaron un consentimiento informado en el que autorizaron la utilización de la sangre del cordón umbilical, explicando a cada una el objetivo del estudio y aclarando que ni ella ni su hijo serían dañados o correrían riesgo alguno al permitir la extracción de la sangre de cordón y que tampoco obtendrían ningún beneficio o recompensa por el mismo (Anexo 9).

Posterior a la extracción, la sangre se utilizó para el recuento de células progenitoras hematopoyéticas y después se descartó adecuadamente, siguiendo las normas de

bioseguridad debidas para evitar cualquier tipo de manipulación o mal uso por parte de terceras personas.

El protocolo de trabajo se sometió al comité de Bioética de la Dirección General de Investigación (DIGI) de la Universidad de San Carlos de Guatemala, que autorizó la investigación y que realizó las correcciones y sugerencias pertinentes respecto a los procedimientos éticos implicados (Anexo 10).

VIII. RESULTADOS

Se analizó un total de 97 unidades de sangre de cordón umbilical de madres sanas, realizando el protocolo especificado en la sección de materiales y métodos. De las 97 muestras, nueve muestras fueron descartadas por presentar volumen menor a 40 mL y una celularidad menor de 20 CD34+, CD45+/ μ L, quedando un total de 88 muestras para estudio. Las 88 muestras fueron extraídas con la placenta *in utero*, 87 fueron partos eutócicos simples y un parto con fórceps. Al momento del parto se presentaron veintitrés recién nacidos con meconio y diecinueve recién nacidos con el cordón circular al cuello.

Cuarenta y siete de los recién nacidos muestreados fueron de género femenino y cuarenta y uno de género masculino. La población femenina tuvo un peso promedio de 6.6 lbs., edad gestacional promedio de 39 semanas y una media del número de gestas de 2. Respecto a los recién nacidos de género masculino se obtuvo un peso promedio de 6.5 lbs., una edad gestacional de 38 semanas y un número de gestas promedio de 3 (Tabla 1).

Tabla 1
Características de la población, estratificadas por género del recién nacido

| | Femenino | | Masculino | |
|-----------------------------|----------|-------|-----------|---------|
| | Media | Rango | Media | Rango |
| Peso en libras | 6.6 | 5.1-8 | 6.5 | 4.8-8.3 |
| Edad gestacional en semanas | 39 | 36-41 | 38 | 34-41 |
| Número de gesta | 2 | 1-5 | 3 | 1-5 |

Fuente: Datos experimentales

El promedio de volumen obtenido en las unidades de sangre completa de cordón umbilical fue de 83.11 mL, encontrándose un mínimo de 40 mL, establecido en los criterios de inclusión y un máximo de 185.1 mL. Respecto al número de células encontradas por unidad de volumen de muestra se obtuvo una media de 102.3 células CD34+, CD45+ vivas, con un rango de 20 a 291; el rango establecido en sangre de cordón umbilical de madres sanas utilizando percentiles fue de 41.35 a 158.24 células CD34+,CD45+ vivas/ μ L. El

recuento promedio de células progenitoras hematopoyéticas por unidad fue de 8.6×10^6 , con un rango establecido por percentiles al 95% de 2.1×10^6 a 2.3×10^7 células por unidad de sangre obtenida. El mínimo de células progenitoras hematopoyéticas por unidad fue de 8.6×10^5 y el máximo de 3.7×10^7 . La viabilidad celular obtenida fue de 99.19%, con un mínimo de 93.55% y un rango calculado por percentiles de 96 a 100% (Tabla 2).

Tabla 2
Volumen y número de células progenitoras hematopoyéticas (CD34, CD45) viables de muestras de sangre de cordón umbilical de madres sanas.

| | Media | DE | Mínimo | Máximo | P _{2.5} | P _{97.5} |
|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Volumen en mL | 83.11 | 30.89 | 40 | 185.1 | 41.35 | 158.24 |
| CD34, CD45 vivas/ μ L | 102.3 | 61.3 | 20 | 291 | 28.4 | 239.3 |
| CD34, CD45 vivas/U | 8.6×10^6 | 6.4×10^6 | 8.6×10^5 | 3.7×10^7 | 2.1×10^6 | 2.3×10^7 |
| % de viabilidad | 99.19 | 1.31 | 93.55 | 100 | 96 | 100 |

Fuente: Datos experimentales

DE= desviación estándar; p= percentil; mL=mililitros, μ L=microlitros, U=unidad, %=porcentaje

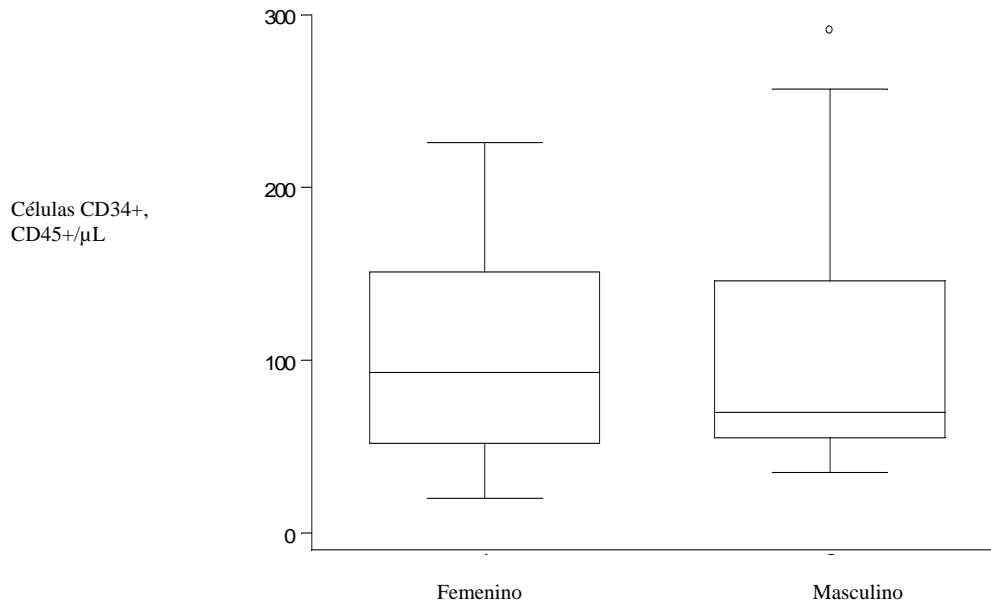
Se relacionó el número de células progenitoras hematopoyéticas viables con la variable género, encontrándose una media de 101.48 células/ μ L en recién nacidos de género femenino y otra de 103.6 células/ μ L en recién nacidos de género masculino. Se realizó una análisis de t de student para comparar los resultados, que indicó que no hay diferencia significativa ($p=0.8944$) (Tabla 3, Gráfica 1).

Tabla 3
Comparación del número de células progenitoras hematopoyéticas (CD34+, CD45+) viables según el género del recién nacido.

| | Femenino | Masculino | |
|---------------------|----------|-----------|---|
| Media | 101.48 | 103.6 | |
| Desviación estándar | 55.18 | 68.13 | t de student t = -0.1331 p = 0.8944 |
| Mínimo | 20 | 35 | |
| Máximo | 226 | 291 | |

Fuente: Datos experimentales

Gráfica 1
Caja de Tukey para la comparación del número de células progenitoras hematopoyéticas (CD34+, CD45+) viables de acuerdo al género del recién nacido



Fuente: Datos experimentales

IX. DISCUSIÓN

Considerando un nivel de confianza del 95%, una variabilidad de 0.125×10^6 y un límite de error en la estimación de 0.05×10^6 , el número de muestra para establecer un valor de referencia fue de 25, sin embargo se obtuvieron 97 muestras para tener una población más significativa.

El rango de volumen obtenido fue de 41.35 a 158.24 mL, el cual se encuentra dentro del rango de volumen reportado en la literatura de 40 a 250 mL (5).

Utilizando las normas establecidas por ISHAGE, la literatura reporta un promedio de 271.5 células CD34+, CD45+/ μ L, por un método manual que calcula las células progenitoras hematopoyéticas del total de células mononucleadas de la muestra por unidad de volumen. La viabilidad se mide con azul de tripano al microscopio. En este estudio fue obtenido un promedio de 102.3 células CD34+, CD45+ viables / μ L, el cual se encuentra debajo de la media reportada. Esta diferencia puede deberse al método usado para el recuento, que en este trabajo se considera más exacto porque se realiza con PE y FITC que son marcadores específicos para los antígenos CD34 y CD45 respectivamente y 7-AAD para medir viabilidad (Tabla 2) (5, 27).

Los rangos de referencia para las variables, volumen, número de células progenitoras hematopoyéticas por unidad de volumen y por unidad de sangre de cordón umbilical, fueron calculados utilizando percentiles al 95%. Esto se dio debido a la dispersión y asimetría de los datos que puede observarse en las gráficas de distribución para los parámetros mencionados (Anexo 11, 12).

La amplia variación en los datos pudo presentarse por errores en el pinzado y cortado del cordón umbilical, que fue realizado por diferentes personas según los turnos y dependiendo de las emergencias suscitadas, lo cual no permitió estandarizar la técnica (6).

Facundo y Barker, citan en sus investigaciones sobre células de cordón umbilical, variaciones en los recuentos dependiendo de la población muestreada, que se atribuyen a las características raciales y condiciones socio demográficas. En este estudio la variación también pudo darse por la heterogeneidad de la población muestreada, ya que el Hospital

de Gineco-obstetricia del IGSS atiende a personas originarias de los distintos departamentos de Guatemala y de todo tipo de estrato social (5, 9).

El rango de 28.4 a 239.3 células CD34+, CD45+/ μ L, se relacionó con información de poblaciones como México y Colombia, en donde se han establecido rangos de 20 a 150 células CD34+/ μ L de sangre. Como puede observarse, el rango en población guatemalteca es más amplio posiblemente por las variaciones mencionadas anteriormente (5, 29).

La viabilidad promedio fue de 99.19%, debido a que ninguna de las muestras se procesó pasadas las ocho horas de recolección ni fue sometida a cambios de temperatura o exposición a la luz (estos factores disminuyen el recuento y la viabilidad de los progenitores hematopoyéticos) (Tabla 3) (6, 27).

Se determinó si las unidades de sangre de cordón umbilical cumplían con el mínimo de 0.5×10^6 células progenitoras hematopoyéticas por unidad establecido por la literatura para poderlas crioconservar y utilizar como terapia. En las muestras evaluadas se obtuvo un recuento promedio de 8.6×10^6 células progenitoras hematopoyéticas por unidad de sangre de cordón, con un rango de 2.1×10^6 a 2.3×10^7 , indicando que las unidades sí cumplen con las características deseadas (Tabla 2) (5).

García y colaboradores reportaron en el año 2000, que el número de células CD34+, CD45+ es mayor en los recién nacidos de sexo masculino. Este estudio obtuvo mayor recuento en embarazos de producto de sexo masculino, aunque el análisis de varianza sobre los grupos, no encontró diferencia significativa ($p=0.8944$). La caja de Tukey demuestra que los datos presentan asimetría, se alejan de la media y de la mediana en ambos sexos, determinando que el género no es un valor predictivo para el recuento de células progenitoras hematopoyéticas viables de cordón umbilical (Tabla 3) (Gráfica 1) (28).

Se muestreó un solo parto asistido con fórceps, por lo que no puede hacerse ninguna inferencia sobre cómo afecta el número de células progenitoras hematopoyéticas viables.

X. CONCLUSIONES

1. El rango de volumen de sangre de cordón umbilical obtenido fue de 41.35 a 158.24 mL.
2. La media de células progenitoras hematopoyéticas viables (CD34+, CD45+) por microlitro en sangre completa de cordón umbilical de madres sanas fue de 102.3 [28.4 a 239.3].
3. La viabilidad celular obtenida fue de 99. 19%.
4. Las características de las unidades de cordón umbilical recolectadas son adecuadas para ser crioconservadas y utilizadas como terapéutica.
5. No se encontró relación del número de células CD34+, CD45+ viables según el sexo de los recién nacidos.

XI. RECOMENDACIONES

1. Capacitar al personal médico previo a realizar este tipo de estudio para estandarizar la técnica de pinzado y corte del cordón umbilical, evitando variaciones significativas.
2. Evitar que el tiempo de procesamiento de las muestras sea mayor de ocho horas después de la toma, para que no disminuya el recuento y la viabilidad de los progenitores hematopoyéticos de cordón umbilical.

XII. REFERENCIAS

1. Pérez JC. *et al.* Hematología, la Sangre y sus Enfermedades. México: Mc Graw Hill Interamericana. 2005. 397p.(p.209-224).
2. Piacibello W. *et al.* Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood* 1997;89:2644-53.
3. La sangre de cordón umbilical: de desecho a filón de células madre. *Diario médico.* 16 de febrero de 2004.
<http://www.bioeticaweb.com.es>
4. Persaud MD. Keith L. *Embriología Clínica.* 6.ed. México. Mc Graw Hill Interamericana. 1999.599p. (43-46, 66-32).
5. Facundo JC. Transplante de células progenitoras hematopoyéticas: tipos fuentes e indicaciones. *Revista Cubana de Hematología* 2004;20.
6. Rodríguez VM. *et al.* Determinación fenotípica de subpoblaciones de células madre derivadas en sangre de cordón umbilical. *Biomédica* 2006; 26:51-60.
7. Kim DK. *et al.* Comparison of hematopoietic activities of human bone marrow and umbilical cord blood CD34 positive/negative cells. *Stem Cells* 1999;17:286-294.
8. Russel NH. Gratwohl A. Schmitz N. Developments in allogenic peripheral blood progenitor cell transplantation. *Br. J Haematol* 1998; 103:594-600.
9. Barker JN. Wagner JE. Transplante de sangre de cordón umbilical: práctica actual e innovaciones futuras. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2003;48: 35-43.
10. Cao LX. *et al.* Implication of a new molecule LK in CD34+ hematopoietic progenitor cell proliferation and differentiation. *Blood* 2000; 89:3615-3623.
11. Garza ME. Borbolla JR. López MA. Transplante autólogo de médula ósea como tratamiento de enfermedades autoinmunes: mecanismos y resultados. *Gaceta Médica de México.* 2004;140.
12. Cutler C. Antin JH. Peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation: A Review. *Stem Cells* 2001;19:108-17.
13. Juarez H. <hjuarez@cryo-cell.com.gt>. Correo electrónico personal. Cryo – cell Guatemala. 15 de agosto 2005. 17 de agosto 2006.

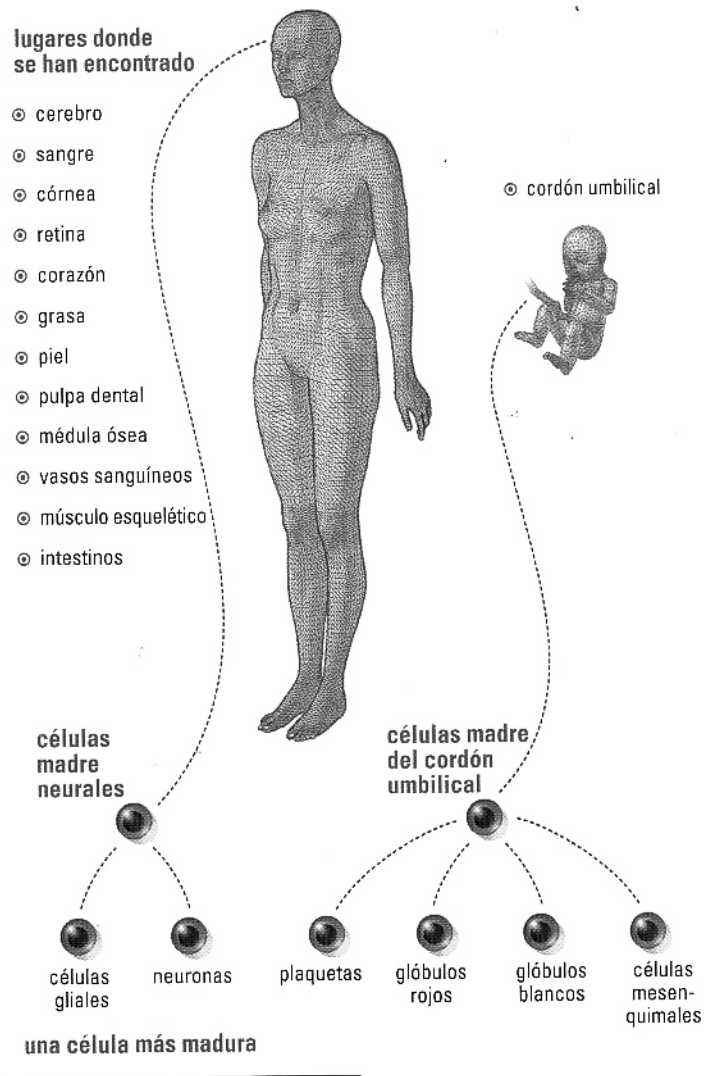
14. Carella AM. *et al.* Mini allografts: ongoing trials in humans. *Bone marrow transplant* 2000;25:345-356.
15. López-Vidaur I. Investigación en células madre y bioética. Instituto Europeo di Bioética. 2006.
16. Snyder EH. *et al.* Hematopoietic Progenitor Stem Cells: A Primer for Medical Professionals: American Association of Blood Banks, 2000.
17. Rubinstein P. *et al.* Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Medical Sciences* 1995;92:10119-10122.
18. García JV. Criopreservadores: concepto y manejo. *Biol Clin Hematol* 1984;6:219.
19. To LB. *et al.* The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 1997;89:2233-2258.
20. Boiso I. Criobiología. *Revista iberoamericana de fertilidad* 2001;18.
21. AuBucho JS. Marrow transplantation: Practical and technical aspects of stem cell reconstitution: American Association of Blood Banks. 1992.
22. Rubinstein P. *et al.* Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* 1998;339:1565-1577.
23. Escalante G. Manual de Citometría de flujo. Guatemala: Instituto Guatemalteco de Seguridad Social, Doc. Tec. Marzo, 2006. 76p. (p.g1-12).
24. Fukuda J. *et al.* Direct Measurement of CD34+ Blood Stem Cell Absolute Counts by Flow Citometry. *Stem Cells* 2000; 16:294 – 300.
25. Fornas O. García J. Petriz J. Flow citometry counting of CD34+ cells in whole blood. *Nature medicine* 2000;16:833-836.
26. Belvedere O. *et al.* Increased Blood Volume and CD34+CD38-Progenitor Cell Recovery Using a Novel Umbilical Cord Blood Collection System. *Stem Cells* 2000; 18:245-251.
27. Infante E. Enumeración de células madre CD34+, cumpliendo con las recomendaciones ISHAGE, con determinación de viabilidad y conteo absoluto en un paso. Becton Dickinson, Doc. Tec. Marzo, 2005.

28. Mancías-Guerra C. Gómez-Almaguer D. Utilidad de las células de cordón umbilical en la medicina de transplantes. *Medicina Universitaria* 2002;16:166-171.
29. Parra R. *et al.* Enumeración de células CD34+ utilizando el Kit ProCOUNT. *Haematología* 2000;85:69-71.
30. García S. *et al.* Factores predictivos de volumen y celularidad en las unidades de sangre de cordón umbilical. *Haematología* 2000;85:58-60

XIII. ANEXOS

Anexo 1.

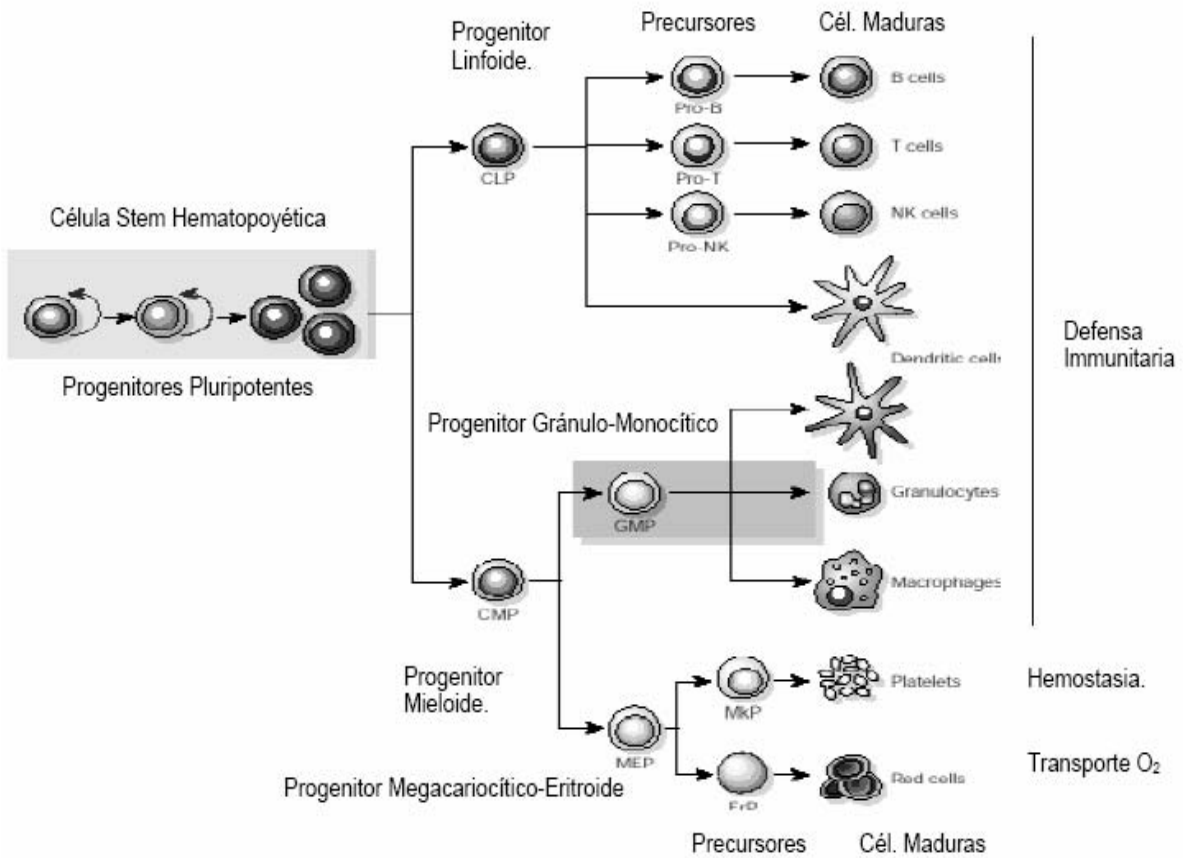
Lugares en los que se han encontrado células progenitoras adultas y linaje celular que desarrolla una célula progenitora neural y las células progenitoras de cordón umbilical



Fuente: National Geographic, octubre 2006 (3)

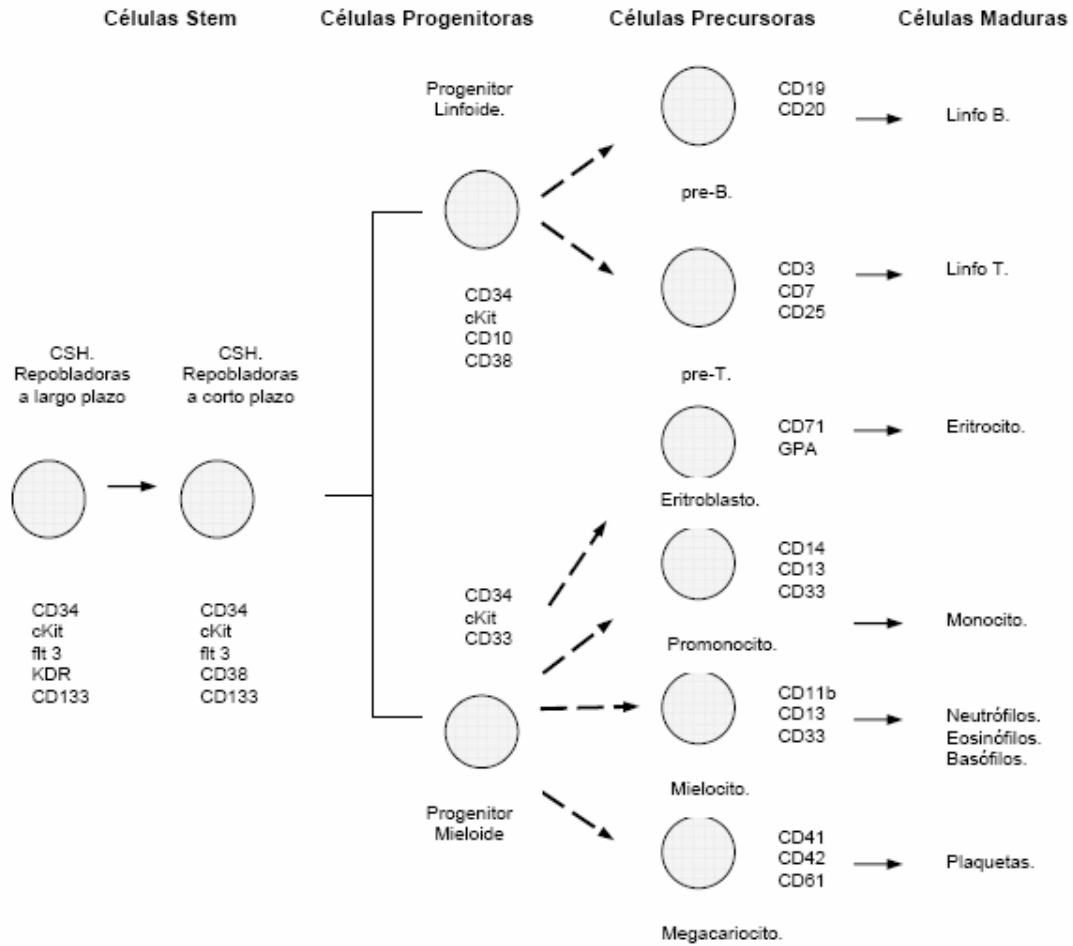
Anexo 2.

Esquema general de la hematopoyesis



Fuente: Hematología, la Sangre y sus Enfermedades (1)

Anexo 3. Perfil antigénico durante la hematopoyesis



Fuente: Revista Biomédica (6)

Anexo 4.

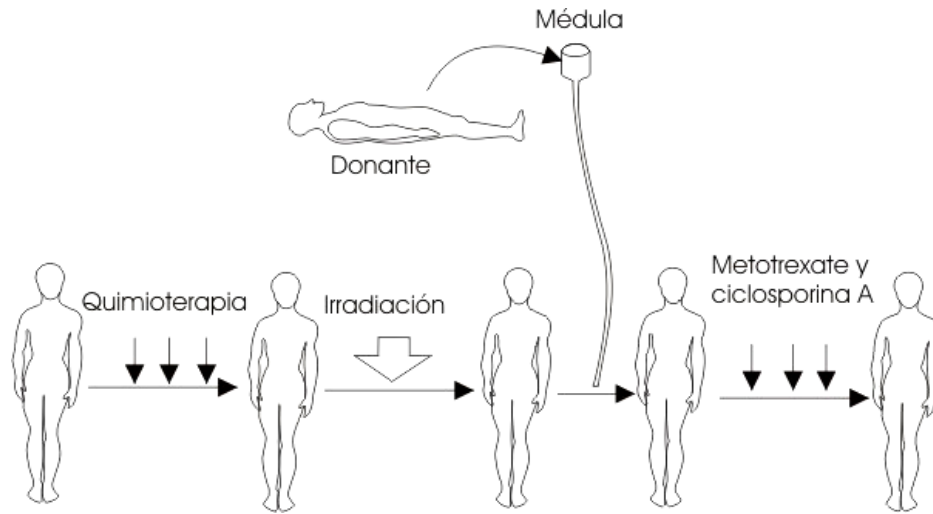
Principales indicaciones de los trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas

| Trasplante alogénico | Trasplante autólogo |
|--|--|
| Indicaciones establecidas | |
| Anemia aplásica severa | Leucemia linfocítica aguda en primera recaída (algunos subtipos) |
| Leucemia mieloide crónica | Enfermedad de Hodgkin en segunda recaída |
| Leucemia mieloide aguda (pacientes menores de 50 años) | Linfomas no-hodgkinianos en segunda recaída |
| Síndromes mielodisplásicos (pacientes menores 50 años) | Mieloma múltiple |
| Leucemia linfocítica aguda en primera recaída (algunos subtipos) | Tumores sólidos como el neuroblastoma |
| Inmunodeficiencias combinadas graves | |
| Leucemias agudas mieloides y linfocíticas en segunda recaída | |
| Talasemia | |
| Indicaciones recientes | |
| Mieloma múltiple | Enfermedades autoinmunes, como esclerosis múltiple |
| Anemia drepanocítica | Leucemia linfocítica crónica |
| Osteopetrosis | Leucemia mieloide aguda |
| Enfermedades metabólicas hereditarias | Tumores sólidos como ovario y mama |
| Enfermedad de Hodgkin | Leucemia mieloide crónica |
| Linfomas no-hodgkinianos | Enfermedad de Hodgkin en primera recaída |
| | Linfomas no hodgkinianos en primera recaída |
| Experimental | |
| Leucemia linfocítica crónica | Amiloidosis |
| Carcinoma renal | Otros tumores sólidos |
| Cáncer de mama | Artritis crónica juvenil |

Fuente: grupo europeo para el trasplante de médula ósea (9)

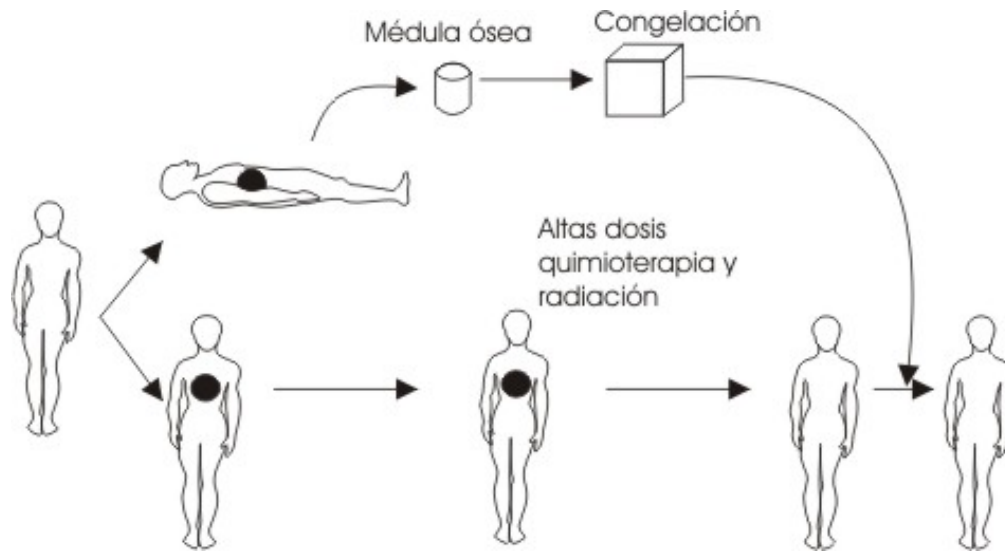
Anexo 5.

Esquema de los pasos seguidos en el trasplante alogénico



Fuente: Revista Cubana de Hematología (5)

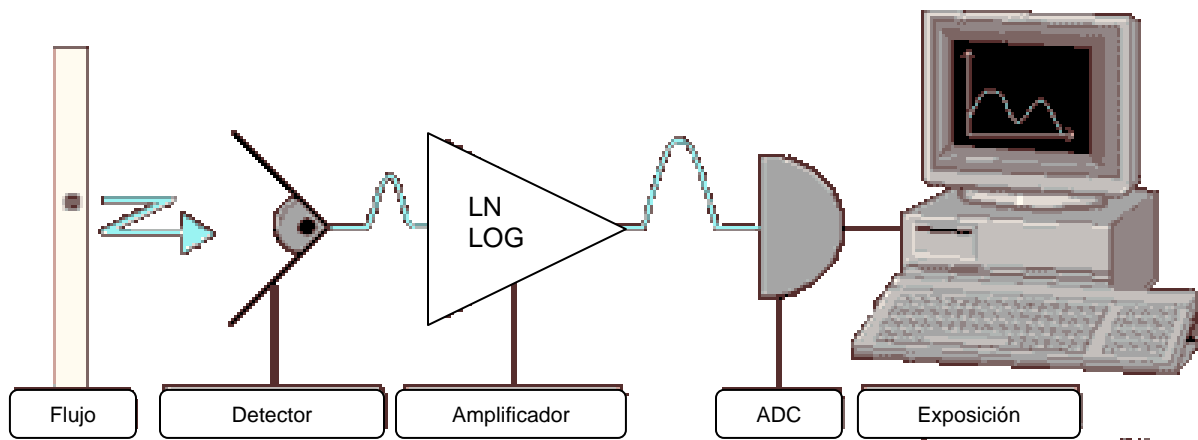
Anexo 6.
Esquema de los pasos a seguir en un trasplante autólogo



Fuente: Revista Cubana de Hematología (5)

Anexo 7.

Componentes internos de un citómetro de flujo por los que pasa la muestra para ser analizada



Fuente: Manual de Citometría de flujo del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (23)

Anexo 8.
Reporte de resultados del citómetro FACSCalibur
utilizando el software Cell Quest Pro 2.0

Anexo 9.

Consentimiento informado

No. Correlativo: _____

Consentimiento informado

Nombre completo: _____

No. De cédula: _____ No. De HC: _____

Fecha: _____ Hora: _____

Después del nacimiento de su hijo (a), el cordón umbilical y la sangre que contiene son desechados. Esta sangre contiene gran cantidad de células conocidas como progenitores hematopoyéticos, que renuevan las células de la sangre y trasplantadas a pacientes que presenten enfermedades malignas, permiten obtener éxito terapéutico.

Para que en Guatemala se pueda utilizar esta terapia se necesita realizar estudios que garanticen la utilidad de las células de cordón. Para lograrlo se necesita la colaboración de muchas personas, por lo que les proponemos su participación, aceptando donar desinteresadamente sangre del cordón umbilical, después del nacimiento de su hijo (a) para poder hacer un recuento de las células progenitoras hematopoyéticas.

El procedimiento es sencillo, la sangre del cordón umbilical se extrae después del nacimiento y de cortar el cordón umbilical, mientras sale la placenta. Esta recolección no es peligrosa ni para usted, ni para su hijo. Todos los datos serán tratados confidencialmente, en ningún momento se utilizará su nombre o sus datos personales.

No se entregará ninguna indemnización económica ni de ningún otro tipo por la donación de la sangre de cordón umbilical. La muestra será desechada y en ningún momento se probará la terapia en humanos.

Afirmo que participo voluntariamente y que no estoy recibiendo ninguna remuneración para poder ser incluido (a) en el estudio.

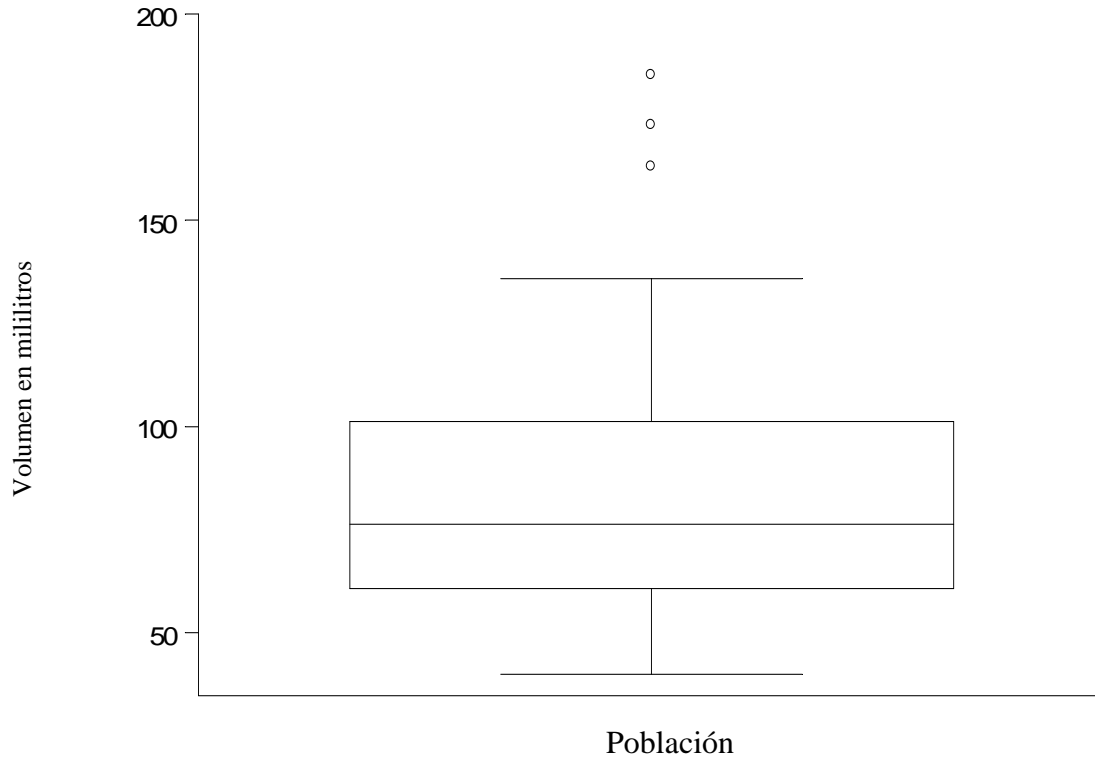
Firma o huellas digitales

Anexo 10.

Autorización del Comité de Bioética de la DIGI para la realización de la investigación

Anexo 11

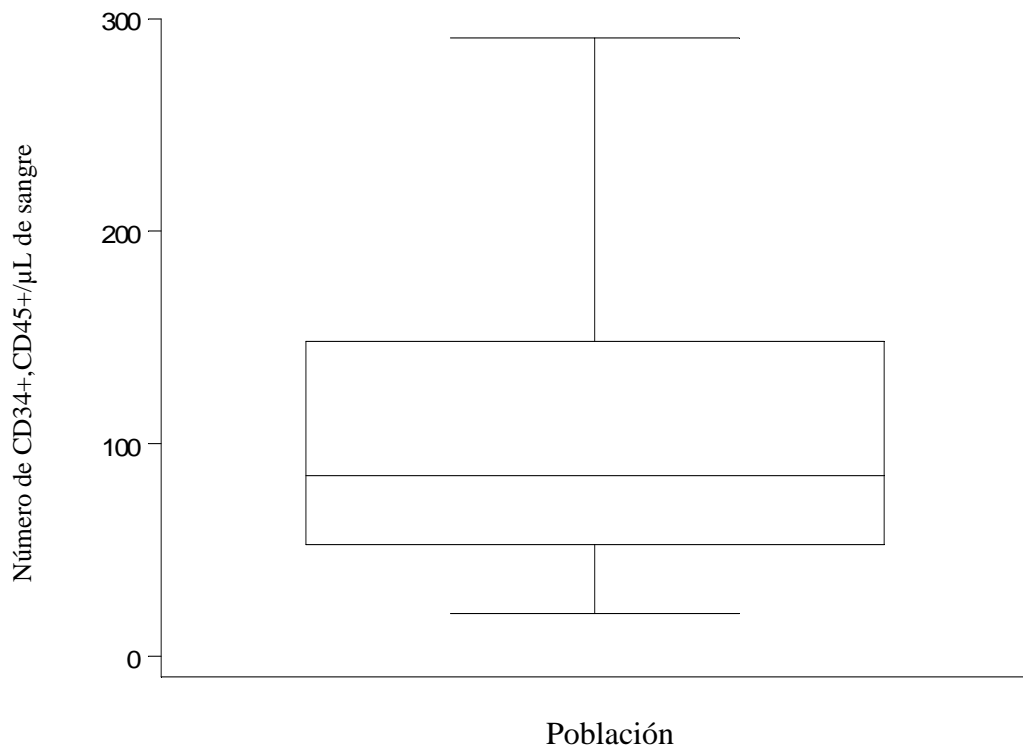
Caja de Tukey para volumen de las 88 muestras de sangre de cordón umbilical



Fuente: datos experimentales

Anexo 12

Caja de Tukey para el recuento de células progenitoras hematopoyéticas (CD34+, C45+) de sangre de cordón umbilical de madres sanas



Fuente: datos experimentales