

Dos técnicas para reducir el volumen de sangre obtenida de cordón umbilical

Gamaliel Benítez-Arvizu,¹
Samantha Martínez,²
Ángel Guerra,¹
Fernando Luna,³
Yanin Romero,¹
Bárbara Alicia Novelo-Garza⁴

RESUMEN

Introducción: con el objetivo de criopreservar la sangre del cordón umbilical se realiza la reducción del volumen de la misma; la calidad, cantidad y funcionalidad de las células debe conservarse durante dicho proceso. En este estudio se compara la eficacia de dos técnicas de reducción de volumen.

Métodos: se comparó la cuenta total de células nucleadas y la viabilidad celular antes y después del procesamiento de la sangre de cordón umbilical con un sistema semiautomatizado y con uno automatizado. Se realizó la cuantificación de CD34+.

Resultados: entre enero de 2006 y enero de 2008 fueron obtenidas 70 unidades de sangre de cordón umbilical: 33 fueron procesadas mediante el sistema semiautomatizado y 37 mediante el automatizado. El volumen recuperado y la cuenta de CD34+ fueron similares con ambos. Se observó una diferencia de 1 % en la viabilidad entre ambas técnicas.

Conclusiones: ambas técnicas son adecuadas para la reducción de volumen de unidades de sangre de cordón umbilical.

SUMMARY

Background: to preserve the umbilical cord blood (UCB), the volume containing the cells must be reduced before freezing, but the quality, quantity and functionality of the cells has to be preserved during this procedure. The aim is to compare the performance of two different techniques for volume reduction.

Methods: a semiautomatic system and an automatic system were compared as two different UCB volume reduction techniques. Total nucleated cell (TNC) counts and viability were measured before and after volume reduction. The CD34+ cell counts also were measure

Results: seventy units of cord blood cells (UCB) were collected. Thirty-three volume reduction procedures were performed by semiautomatic system and thirty seven by automatic system. The volume recovered and the CD34+ count in both techniques was similar. Although the viability differed slightly (1 % higher by Optipress II) were observed

Conclusions: the semiautomatic and automatic techniques are suitable to reduce volumes of UCB units.

¹Banco Central de Sangre, Centro Médico Nacional La Raza
²Doctorado en Educación Médica, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México
³Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI
⁴Área de Evaluación, División de Servicios Indirectos, Coordinación de Planeación de Infraestructura Médica, Dirección de Prestaciones Médicas

Autores 1, 3 y 4, Instituto Mexicano del Seguro Social, Distrito Federal, México

Comunicación con:
Gamaliel Benítez.
Tel: (55) 5724 5900, extensión 24215.
Correo electrónico:
gamardoc@yahoo.com.mx

Introducción

El primer trasplante de células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical (sangre de cordón umbilical) fue realizado en 1989 por Gluckman y colaboradores.¹ Desde entonces, la sangre de cordón umbilical se ha convertido en una fuente alterna de células progenitoras hematopoyéticas para la reconstitución de la hematopoyesis en padecimientos malignos y no malignos. Los bancos de sangre de cordón umbilical han aparecido alrededor de todo el mundo, conservando y al mismo tiempo formando un gran inventario de sangre de cordón umbilical con gran variedad de fenotipos de HLA disponibles

para los pacientes con padecimientos susceptibles de ser manejados con trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.²

La “reducción de volumen” es un procedimiento que tiene por objetivo disminuir el espacio necesario para el almacenamiento de unidades de sangre de cordón umbilical. Esta técnica abate los costos de la criopreservación al aumentar el número de unidades de sangre de cordón umbilical almacenadas en un contenedor, lo que permite asegurar la cantidad, calidad y funcionalidad de las células en un volumen predeterminado. Al almacenar un menor volumen también se disminuye la cantidad de dimetilsulfóxido necesario para la criopreservación

Palabras clave
sangre fetal
bancos de sangre,
métodos
conservación de la
sangre

Key words
fetal blood
blood banks, methods
blood preservation

y, consecuentemente, disminuye la toxicidad de éste cuando la unidad es trasplantada; además, al contraer el volumen se disminuye la cantidad de hematies infundidos al paciente al momento del trasplante, lo que también aminora el riesgo de reacciones por incompatibilidad ABO en el receptor.²⁻⁴

Han sido desarrollados diversos sistemas de reducción de volumen. Entre los más empleados se encuentran el sistema semiautomatizado Optipress (Optipress Baxter Healthcare, Deerfield, IL, USA) y el automatizado Sepax (Sepax Cord Blood Processing System from Biosafe SA, Eysins, Switzerland). El sistema Optipress es una técnica de *top and bottom*, donde la unidad de sangre de cordón umbilical es recolectada en la bolsa central de un sistema de bolsas triple, ésta es centrifugada a 3000-3500 g y se van separando los eritrocitos, el paquete leucoplaquetario y el plasma, de acuerdo con un gradiente de densidad y en el orden mencionado. Los eritrocitos y el plasma son vertidos en las bolsas satélites sin abrir el sistema, lo que garantiza la esterilidad, dejando en la bolsa central el paquete leucoplaquetario, el cual deberá ser traspasado a una bolsa de criopreservación para su preparación con dimetilsulfóxido y congelamiento controlado. Esta técnica fue desarrollada por Ademokun y colaboradores⁵ y ha sido implementada en diversos países con adaptaciones mínimas, incluyendo el Banco de Sangre de Cordón Umbilical de Centro Médico Nacional La Raza, Instituto Mexicano del Seguro Social. Este sistema permite la reducción de volumen acorde con los estándares internacionales y su tiempo de procesamiento es de 30 minutos en promedio por unidad.⁶⁻¹⁰

Sepax (Biosafe SA, Eysins, Switzerland) es un sistema totalmente automatizado con un equipo que puede ser empleado con dos diferentes programas: con hidroxietil almidón o sin él. En este sistema la sangre del cordón umbilical es procesada en la cámara del equipo donde es centrifugada, y mediante un sistema neumático lleva a cabo llenado y vaciamiento de la cámara separando los componentes de la sangre de cordón umbilical según el protocolo seleccionado y concentrando el paquete leucoplaquetario en una bolsa de criopreservación lista para agregar el dimetilsulfóxido y congelar. Este equipo ha sido instalado en diversos centros en el mundo, su tiempo de procesamiento es de 20 minutos por unidad y cumple con los estándares internacionales.^{11,12}

Ambas técnicas presentan ventajas y desventajas. La elección de una u otra depende de las condiciones de cada centro en los diferentes países, por lo que resulta relevante manifestar que los estándares internacionales se logran con ambas. En este estudio se compararon los resultados con Optipress y Sepax.

Métodos

Recolección de unidades de sangre de cordón umbilical

Durante el trabajo de parto en el área tocoquirúrgica, donadoras de sangre de cordón umbilical fueron evaluadas por un equipo de recolección en el Hospital de Gineco-Obstetricia de Tlatelolco, Instituto Mexicano del Seguro Social, Distrito Federal, México. Todas firmaron el consentimiento informado para la recolección de sangre de cordón umbilical.

La recolección de la sangre de cordón umbilical inicia una vez que ha nacido el producto (separado ya de la madre) con el pinzado del cordón umbilical, que es limpiado con tintura de yodo. La sangre del cordón umbilical es recolectada por punción de la vena umbilical en una bolsa estéril (Grifols SA, Barcelona, España), la cual contiene 25 mL de citrato-fosfato-dextrosa como anticoagulante. La sangre de cordón umbilical colectada es conservada a 6 ± 2 °C y procesada dentro de las 48 horas de su obtención. Solo fueron aceptadas para procesamiento las unidades con un volumen mínimo de 70 mL.

Reducción automatizada

Se utilizó el kit Sepax v218 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La unidad de sangre de cordón umbilical fue conectada bajo condiciones estériles y el proceso de reducción se llevó a cabo en equipo Sepax. El concentrado leucoplaquetario fue colocado en una bolsa de criopreservación Pall (Biosafe) y posteriormente se le agregó dimetilsulfóxido y finalmente fue criopreservado en nitrógeno líquido (Thermogenesis BioArchive System, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

Reducción semiautomatizada

Las unidades de sangre de cordón umbilical fueron transferidas a una bolsa triple (Baxter Healthcare, US) bajo condiciones estériles y centrifugadas a 3000 g por 12 minutos a 4 °C, extremando las precauciones para evitar la pérdida de la interfase de la capa leucoplaquetaria. Se empleó el protocolo estándar del Optipress II (Baxter Healthcare, US), con la placa específica para la recuperación de paquete leucoplaquetario. Finalmente, el concentrado leucoplaquetario fue introducido en una bolsa Pall en condiciones estériles utilizando una campana de flujo laminar y se agregó dimetilsulfóxido; la criopreservación se hizo en nitrógeno líquido (Thermogenesis BioArchive System, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

Control microbiológico y viabilidad celular

Se estudiaron muestras de eritrocitos y de plasma provenientes de las unidades de sangre de cordón umbilical para descartar contaminación bacteriana y fúngica, utilizando un sistema automatizado de hemocultivo (Bactec, BioMérieux, Hazelwood, MO, USA).

La viabilidad celular fue analizada mediante la técnica de azul tripan, antes y después de la reducción de volumen.

Conteo de células nucleadas totales y de CD34+

El conteo de células nucleadas totales se realizó antes y después de la reducción de volumen empleando una cámara de Neubauer y utilizando la tinción de Turk.

El conteo de CD34+ se llevó a cabo por citometría de flujo con anticuerpos monoclonales unidos a fluorocromos antiCD34-fluoresceína y antiCD45-ficoeritrina (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). El análisis citométrico fue realizado en un BD FACSCalibur y con el programa CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Criopreservación

Aproximadamente 25 mL de paquete leucoplaquetario provenientes de cada unidad de sangre de cordón umbilical fueron criopreservados en bolsas Pall. La preparación de la sangre del cordón umbilical para su criopreservación incluye la adición de 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) a 50 % y dextran 40 (PM 40,000) (PISA Farmacéutica Mexicana, Guadalajara, México) a 5 %, para alcanzar una concentración final de 10 % de dimetilsulfóxido y 1 % de dextran 40.

Las bolsas fueron colocadas en empaques metálicos o casetes e introducidas en un sistema controlado de congelación (Bioarchive Termogénesis, Rancho Córdova, CA, USA) y almacenadas en nitrógeno líquido.

Análisis estadístico

El análisis estadístico consistió en aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar la distribución normal de las variables; posteriormente se utilizó la *t* para comparar ambas técnicas de reducción de volumen, considerando una *p* < 0.05 como estadísticamente significativa; el análisis estadístico se llevó cabo con el programa SPSS versión 15.

Resultados

Setenta unidades de sangre de cordón umbilical obtenidas en el Hospital de Gineco-Obstetricia Tlatelolco fueron procesadas en el Banco de Cordón Umbilical del Centro Médico Nacional La Raza entre enero de 2006 y enero de 2008. Treinta y tres fueron procesadas con el sistema semiautomatizado Optipress y 37 con el sistema automatizado Sepax. Los resultados se muestran en el cuadro I.

Discusión

El trasplante de sangre de cordón umbilical se ha convertido en un tratamiento cotidiano para padecimientos hematológicos específicos, principalmente en pacientes pediátricos.¹³

En México, la leucemia representa una de las principales causas de mortalidad en niños de uno a 14 años de edad. Estos niños pueden llegar a requerir trasplante de células progenitoras hematopoyéticas y, por lo tanto, la sangre de cordón umbilical es una fuente de células progenitoras hematopoyéticas.¹⁴ El Instituto Mexicano del Seguro Social, el cual da cobertura a aproximadamente 50 % de la población mexicana, instauró el Banco de Sangre de Cordón y el Programa de Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas de Sangre de Cordón Umbilical como un recurso para los pacientes que requieren un trasplante y no cuentan con un donador compatible.¹⁵

Cuadro I
Reducción del volumen de sangre obtenida de cordón umbilical con un sistema semiautomatizado y uno automatizado

Parámetro		Semiautomatizado (n = 33)				Automatizado (n = 37)				t
		Media	DE	Min.	Máx.	Media	DE	Min.	Máx.	
Volumen (mL)	Inicial	100.09	22.00	70.00	158.59	91.39	21.62	70.08	150.16	ns
	Final	22.02	1.13	20.22	25.22	21.03	0.47	18.94	22.56	ns
Cuenta de células nucleadas totales (células/mL)	Inicial	1.12 × 10 ⁹	4.95 × 10 ⁸	4.07 × 10 ⁸	2.70 × 10 ⁹	1.43 × 10 ⁹	1.39 × 10 ⁹	5.23 × 10 ⁸	8.90 × 10 ⁹	ns
	Final	1.20 × 10 ⁹	3.57 × 10 ⁸	5.93 × 10 ⁸	1.93 × 10 ⁹	1.09 × 10 ⁹	3.96 × 10 ⁸	5.34 × 10 ⁸	2.20 × 10 ⁹	ns
Viabilidad (%)	Inicial	96.00	1.90	91.00	99.00	96.00	1.90	91.00	99.00	ns
	Final	96.20	1.80	90.00	98.00	95.00	2.30	91.00	98.00	0.036
Recuperación (%)	Final	120.00	50.00	34.00	260.00	99.00	50.00	9.30	285.00	ns
CD34+ (células/mL)	Final	1.30 × 10 ⁷	6.35 × 10 ⁷	4.10 × 10 ⁵	3.68 × 10 ⁸	1.47 × 10 ⁷	7.10 × 10 ⁷	7.40 × 10 ⁵	3.68 × 10 ⁸	ns

Desde su origen, uno de los objetivos del Banco de Sangre de Cordón Umbilical fue alcanzar los estándares de calidad internacionales tanto para la recuperación como para la viabilidad; dichos estándares se han logrado con el sistema semiautomatizado de reducción de volumen (Optipress II),⁵ el cual es sencillo y económico en comparación con la técnica automatizada, una ventaja importante en países con recursos limitados. Su única debilidad es que requiere un operador adecuadamente capacitado, lo que condiciona el sistema al operador.

En este estudio se comparó el desempeño del sistema automatizado y del semiautomatizado para la reducción de volumen de unidades de sangre de cordón umbilical. Ambos demostraron tener un desempeño similar para los parámetros descritos en el cuadro I, no se observaron diferencias en la recuperación de células nucleadas totales, cuenta de CD34 y volumen final; aunque se presentó una diferencia en cuanto a la viabilidad al término de la reducción del volumen (90 % *adversus* 91 %); si bien dicha diferencia es estadísticamente significativa no tiene implicaciones clínicas. Los resultados difieren de los informados por Lapierre y colaboradores, quienes refieren un desempeño superior del sistema automatizado (Sepax) y un pobre desempeño del semiautomatizado.¹²

Ambos sistemas alcanzaron los estándares internacionales en cuanto a la recuperación y viabilidad de las células nucleadas totales. La decisión en la selección de qué sistema elegir dependerá del costo y sus ventajas técnicas.

Conclusiones

Ambos sistemas de reducción de volumen logran adecuada recuperación y viabilidad de células nucleadas totales y cumplen con los estándares internacionales. El sistema semiautomatizado tiene las ventajas de ser accesible y su menor costo, aunque es sumamente dependiente del operador, no así el automatizado, en el cual el inconveniente es su costo. Uno y otro son excelentes opciones para reducir el volumen de sangre obtenida de cordón umbilical.

Agradecimientos

A Salvador Arellano y Elizabeth Franco, por su trabajo en el laboratorio; y al doctor José Alberto Sánchez Cañas, por su ayuda en la recolección de datos.

Referencias

1. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321(17):1174-1178.
2. Armitage S. cord blood processing: volume reduction. *Cell Preservation Technology* 2006;4(1):9-16.
3. Bakken AM. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 2006;1(1):47-54.
4. Aroviita P, Teramo K, Westman P, Hiilesmaa V, Kekomäki R. Associations among nucleated cell, CD34+ cell and colony forming cell contents in cord blood units obtained through a standardized banking process. *Vox Sanguinis* 2003;84(3):219-227.
5. Ademokun JA, Chapman C, Dunn J, Lander D, MAir K, Proctor SJ, et al. Umbilical cord blood collection and separation for hamatopoietic progenitor cell banking. *Bone Marrow Trasplant* 1997;19(10):1023-1028. Disponible en <http://www.nature.com/bmt/journal/v19/n10/pdf/1700788a.pdf>
6. Armitage S, Fehily D, Dickinson A, Chapman C, Navarrete C, Contreras M. Cord blood banking: volume reduction of cord blood units using a semi-automated closed system. *Bone Marrow Transplant* 1999;23(5):505-509. Disponible en <http://www.nature.com/bmt/journal/v23/n5/pdf/1701591a.pdf>
7. Solves P, Mirabet V, Planelles D, Blasco I, Perales A, Carbonell-Uberos F, et al. Red blood cell depletion with a semiautomated system or hydroxyethyl starch sedimentation for routine cord blood banking: a comparative study. *Transfusion* 2005;45(6):867-873.
8. Godinho MI, de Sousa ME, Carvalhais A, Barbosa IL. Umbilical cord blood processing with the Optipress II blood extractor. *Cytotherapy* 2000;2(6):439-444.
9. Solves P, Mirabet V, Carbonell-Uberos F, Soler MA, Roig R. Automated separation of cord blood units in top and bottom bags using the Compomat G4. *Clin Lab Haematol* 2006;28(3):202-207.
10. Novelo-Garza B, Limón-Flores A, Guerra-Márquez A, Luna-Bautista F, Juan-Shum L, Montero I, et al. Establishing a cord blood banking and transplantation program in Mexico: a single institution experience. *Transfusion* 2008;48(2):228-236.
11. Zingsem J, Strasser E, Weisbach V, Zimmermann R, Ringwald J, Goecke T, et al. Cord blood processing with an automated and functionally closed system. *Transfusion* 2003;43(6):806-813.
12. Lapierre V, Pellegrini N, Bardey I, Malugani C, Saas P, Garnache F, et al. Cord blood volume reduction using an automates system (Sepax) vs. a semi-automated system (Optipress II) and a manual method (hidroxyethyl starch sedimentation) for routine cord blood banking: a comparative study. *Cytotherapy* 2007;9(2):165-169.
13. Gluckman E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2000;28(11):1197-1205.
14. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Estadística a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos nacionales. [Monografía en internet]. México: INEGI; 2007. Disponible en <http://www.inegi.gov.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2007/cancer07.pdf>.
15. Boo M. Public cord blood banking may play an important role in the emergence of unrelated transplant in developing countries. *Transfusion* 2008; 48(2):207-208.