



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA



INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

**ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE ENSAYO DE UNIDADES
FORMADORAS DE COLONIAS DE CÉLULAS PROGENITORAS
HEMATOPOYÉTICAS**

**PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA
CON EL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLERATO UNIVERSITARIO**

STEPHANIE ALVARADO VALVERDE

**LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA
HOSPITAL SAN JUAN DE DIOS**

CARTAGO, ENERO DE 2009

**ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE ENSAYO DE UNIDADES
FORMADORAS DE COLONIAS DE CÉLULAS PROGENITORAS
HEMATOPOYÉTICAS**

Stephanie Alvarado Valverde ¹

RESUMEN

El trasplante de células madre hematopoyéticas se utiliza actualmente para el tratamiento de ciertas enfermedades hematológicas. Una técnica utilizada para evaluar la capacidad de proliferación *in vitro* de las células madre hematopoyéticas colectadas en muestras de sangre periférica, sangre periférica movilizada y médula ósea es el cultivo de unidades formadoras de colonias granulocito-eritroides-macrófagos-megacariocitos (UFC-GEMM), unidades formadoras de colonias granulocito-macrófago (UFC-GM), unidades formadoras de brotes eritroides (UFB-E) y unidades formadoras de colonias eritroides (UFC-E) en un medio de metilcelulosa. Esta práctica de especialidad se llevo a cabo en el Laboratorio de Investigación y Enseñanza de Hematología del Hospital San Juan de Dios y el Laboratorio de Ingeniería en Tejidos del Instituto Tecnológico de Costa Rica, con el objetivo de estandarizar los procedimientos de ensayos de unidades formadoras de colonias de células progenitoras hematopoyéticas a partir de muestras de sangre periférica, sangre periférica movilizada y médula ósea. Después de obtener la aprobación del Comité Institucional de Bioética en Investigación de la Caja Costarricense de Seguro Social se estandarizaron los protocolos de obtención, anticoagulación, traslado y descongelación de muestras de médula ósea y sangre periférica; el protocolo de aislamiento de células mononucleadas por gradiente de densidad y el ensayo de unidades formadoras de colonias mediante el cultivo de células mononucleadas en un medio de metilcelulosa. Los ensayos realizados permitieron generar patrones para la identificación de las colonias UFC-E, UFC-GM y UFC-GEMM obtenidas con el medio MethoCult®.

Palabras clave: Células madre hematopoyéticas; Unidades formadoras de colonias; UFC; Trasplante de células madre; Médula ósea; Sangre periférica.

¹ INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2009.

ABSTRACT

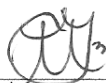
Hematopoietic stem cell transplantation is currently used to treat certain blood diseases. One technique used to assess the in vitro proliferation ability of hematopoietic stem cells collected from peripheral blood, mobilized peripheral blood and bone marrow samples is the culture of granulocyte-erythroid-macrophage-megacaryocyte colony forming units (CFU-GEMM), granulocyte-macrophage colony forming units (CFU-GM), erythroid burst forming units (BFU-E) and erythroid colony forming units (CFU-E) in methylcellulose medium. This project was done at the Hematology Teaching and Research Laboratory in Hospital San Juan de Dios and at the Tissue Engineering Laboratory in Technological Institute of Costa Rica. The objective was to standardize the procedures of the Colony Forming Units Assay of hematopoietic progenitor cells from peripheral blood, mobilized peripheral blood and bone marrow samples. After obtaining the approval of the Institutional Bioethics Committee in Research of the Social Security (Caja Costarricense de Seguro Social) were standardized collection, anticoagulation, transportation and samples thawing protocols of bone marrow and peripheral blood, isolation of mononuclear cells by density gradient protocol, and the Colony Forming Units Assay through the cultivation of mononuclear cells in methylcellulose medium. Test patterns made it possible to identify the CFU-E, CFU-GM and CFU-GEMM colonies obtained with MethoCult® medium.

Keywords: *Hematopoietic stem cell; Colony forming units assay; CFU; Stem cell transplantation; Bone marrow; Peripheral blood.*

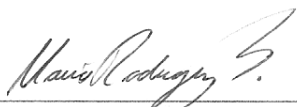
**ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE ENSAYO DE UNIDADES
FORMADORAS DE COLONIAS DE CÉLULAS PROGENITORAS
HEMATOPOYÉTICAS**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología**

Miembros del Tribunal:



MSc. Maritza Guerrero
Profesor asesor - ITCR



Dra. Maria Rodríguez
Asesor Externo - HSJD



Dr. Arturo Cordero
Lector - HSJD

DEDICATORIA

A aquellos que me dieron su apoyo y que
siempre me alentaron a seguir adelante...

Stephanie Alvarado

AGRADECIMIENTOS

La autora desea dejar constancia de su agradecimiento a los siguientes organismos y personas, por su colaboración en la ejecución del presente trabajo:

Al señor Rodolfo Alvarado, que como representante de Sinertec Costa Rica Internacional Ltda, me apoyó económicamente para la compra de materiales y reactivos.

A mi tutoras, la Dra. María Rodríguez y la profesora MSc. Maritza Guerrero, porque siempre pude contar con su apoyo, sus consejos y su ayuda.

Al Dr. Arturo Cordero por el tiempo invertido, la atención concedida, su valiosa colaboración y por todos los consejos que me brindó.

Al personal del Servicio de Hematología del Hospital San Juan de Dios, principalmente al Dr. Luis Fernando Vásquez y al Dr. Durán por facilitarme las muestras de médula ósea.

Al personal del Laboratorio de Investigación del Hospital Nacional de Niños, en especial a la Dra. Berta Valverde por su colaboración al efectuar las pruebas de citometría de flujo.

A mi familia, por su apoyo económico y moral, por toda la paciencia que me tuvieron y por no dejarme desfallecer; y a David por sus consejos y apoyo incondicional.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	12
REVISIÓN DE LITERATURA.....	14
CÉLULAS MADRE.....	14
Plasticidad de las células madre	14
Tipos de células madre	15
CÉLULAS MADRE DE LA MÉDULA ÓSEA.....	16
Células madre mesenquimales (MSC)	16
Células “Side Population” (SP)	17
Células progenitoras adultas multipotenciales (MAPC)	17
Células madre hematopoyéticas (CMH).....	17
CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS	18
Generalidades	18
Microambiente hematopoyético	18
Características funcionales de las células madre hematopoyéticas	19
Evolución de las células madre hematopoyéticas.....	20
Generación de linajes y de UFC hematopoyéticas	21
TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS.....	23
Tipos de trasplantes	23
FUENTE DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS	24
Médula ósea	24
Sangre periférica.....	24
AISLAMIENTO Y ENSAYOS EN CÉLULAS MONONUCLEADAS.....	25
Aislamiento de células mononucleares por gradiente de densidad	25
Tinción con azul de tripán	25
Ensayo de unidades formadoras de colonias	26

OBJETIVOS	28
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
AUTORIZACIÓN DEL COIBI-CCSS	29
PROCESAMIENTO DE MUESTRAS CELULARES	29
ENSAYO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS	32
RESULTADOS	34
AUTORIZACIÓN DEL COIBI-CCSS	34
PROCESAMIENTO DE MUESTRAS CELULARES	34
ENSAYO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS	37
DISCUSIÓN	44
AUTORIZACIÓN DEL COIBI-CCSS	44
PROCESAMIENTO DE MUESTRAS CELULARES	44
ENSAYO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS	47
CONCLUSIONES	50
RECOMENDACIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52
ANEXOS	58
APÉNDICES	67

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Frecuencia de progenitores en muestras normales médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica y sangre periférica movilizada	15
Cuadro 2. Función de las citocinas recombinantes d el medio MethoCult H443.....	16
Cuadro 3. Concentración celular 10X a preparar y concentración final requerida de células mononucleadas por placa de 35mm según la fuente de las células mononucleadas	21
Cuadro 4. Volumen de muestra inicial, total de células por mililitro y porcentaje de vialidad antes y después del aislamiento células mononucleadas con Histopaque-1077.....	25
Cuadro 5. Diluciones efectuadas a la suspensión de CMN, concentración 10X preparada y concentración final de CMN por placa.....	26
Cuadro 6. Total de unidades formadoras de colonias por placa de 35mm y por mililitro obtenidas en medio MethoCult GF H4434, después de 15 días de cultivo.	27
Cuadro 7. Descripción de las unidades formadoras de colonias utilizando MethoCult	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo jerárquico de células madre segun potencial de diferenciación	4
Figura 2. Representación esquemática de la vía de diferenciación de una célula madre que se transdiferencia a tejidos no hematopoyéticos inesperados	5
Figura 3. Representación de la hematopoyesis de una célula madre hematopoyética con potencial de generar los distintos linajes sanguíneos	8
Figura 4. Generación de linajes de células hematopoyéticas y su relación con las unidades formadoras de colonias hematopoyéticas	11
Figura 5. Coágulo observado durante la descongelación de las muestras SPM-C	24
Figura 6. Colonia de UFC-E formando una sola agrupación.....	29
Figura 7. Colonia de UFC-E con múltiples agrupaciones	29
Figura 8. Dos colonias de UFC-E	30
Figura 9. Una colonia de UFC-M	30
Figura 10. Una colonia de UFC-GM	31
Figura 11. Colonia de UFC-GM	31
Figura 12. Una colonia UFC-GEMM mixta	32
Figura 13. Colonia de UFC-GEMM	32

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Declaración jurada de fuentes de financiamiento	59
Anexo 2. Certificado de Recomendación #018-2008	62
Anexo 3. Certificado de Recomendación #020-2008	65

ÍNDICE DE APÉNDICES

Apéndice 1. Formulario AP-I: Solicitud de revisión de protocolo.....	68
Apéndice 2. Formulario AP-IIa: Resumen de propuesta de investigación	74
Apéndice 3. Formulario AP-IIIa: Requisitos del protocolo de investigación	80
Apéndice 4. Formulario AP-IV: Laboratorios a utilizar en el estudio	98
Apéndice 5. Formulario AP-V: Presupuesto	100
Apéndice 6. Formularios CV-I: Currículum vitae abreviado de investigadores	102
Apéndice 7. Formulario de Ensayo de UFC, AT y CD34.....	106
Apéndice 8. Preparación de medios	108
Apéndice 9. Recuento manual con azul de tripán	110
Apéndice 10. Equipo, materiales y reactivos para el ensayo de UFC.....	113
Apéndice 11. Formulario INF-I: Presentacion de informes (03/10/2008)	115
Apéndice 11. Formulario INF-II: Presentacion de informes (05/01/2009).....	117

INTRODUCCIÓN

El uso de células madre con fines terapéuticos representa en la actualidad una de las posibilidades para el tratamiento de ciertas enfermedades degenerativas o como terapia de preferencia en patologías cuyo tratamiento alternativo no supone una solución definitiva. La idea de que los trastornos médicos que afectan la formación de células sanguíneas o inmunitarias pueden ser curados mediante el trasplante de células madre hematopoyéticas ha fomentado su uso en el tratamiento de pacientes con alto riesgo de enfermedades hematológicas (Mera *et al.*, 2007). La base de este trasplante es que todas las células sanguíneas surgen a partir de células madre presentes en la sangre y médula ósea; y que su obtención puede efectuarse mediante recolección de sangre del cordón umbilical de recién nacidos para trasplantes alogénicos y mediante leucoféresis u obtención de médula ósea para trasplantes autólogos (Rodríguez *et al.*, 2006; Cottler-Fox *et al.*, 2003).

Para determinar la dosis y viabilidad de las células madre recolectadas suelen emplearse diferentes métodos, de los cuales el más común es el método de exclusión de colorante en células nucleadas con azul de tripán (Schmidt, 1979). Otra técnica utilizada para determinar y evaluar la capacidad de proliferación *in vitro* de las células madre hematopoyéticas presentes en una muestra es la obtención de unidades formadoras de colonias (UFC) a partir de células hematopoyéticas progenitoras, donde cada colonia representa la progenie de una célula madre (StemCell Technologies, 2004).

El cultivo de unidades formadoras de colonias granulocito-eritroides-macrófagos-megacariocitos (UFC-GEMM), unidades formadoras de colonias granulocito-macrófago (UFC-GM), unidades formadoras de colonias eritroides (UFC-C) y unidades formadoras de brotes de eritrocitos (UFB-E) en un medio de metilcelulosa se utiliza comúnmente para detectar y cuantificar progenitores humanos hematopoyéticos en muestras de médula ósea, sangre periférica y sangre de cordón umbilical (StemCell Technologies, 2004). Según estudios efectuados por Migliaccio y colaboradores (2000) la dosis de UFC es un parámetro más predictivo de la

supervivencia post-trasplante que la dosis de células nucleadas, metodología usualmente empleada. Además, el cultivo de estas UFC se ha utilizado para determinar las tasas de viabilidad y recuperación celular en ensayos de criopreservación de células madre de sangre periférica y de cordón umbilical (Katayama *et al.*, 1997; Kudo *et al.*, 2005).

Durante estos últimos años, el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica ha impulsado el desarrollo de la biotecnología médica en nuestro país mediante la ejecución de diversos proyectos de investigación en cooperación con la Caja Costarricense de Seguro Social. Esta cooperación científica y tecnológica se ha logrado mediante la capacitación del personal de ambas instituciones en la aplicación de nuevas técnicas para el tratamiento de algunas patologías, como ha sido el uso de piel cultivada *in vitro* para el tratamiento de pacientes con quemaduras, úlceras u otros problemas cutáneos. Asimismo, el Hospital San Juan de Dios en conjunto con el Hospital Nacional de Niños, ha incursionado exitosamente en el trasplante de células madre como tratamiento de pacientes con enfermedades hematológicas malignas, síndromes de falla medular, algunos tumores sólidos, estados inmunodeficientes hereditarios y desórdenes metabólicos.

Debido a que las células madre hematopoyéticas son capaces de preservar su capacidad de proliferación y diferenciación *in vitro* hacia todos los linajes hematopoyéticos, se planteó efectuar esta práctica de especialidad en el Laboratorio de Investigación y Enseñanza de Hematología del Hospital San Juan de Dios, el Laboratorio de Investigación del Hospital Nacional de Niños y el Laboratorio de Ingeniería en Tejidos del Instituto Tecnológico de Costa Rica, con el objetivo de estandarizar los procedimientos de ensayos de unidades formadoras de colonias de células progenitoras hematopoyéticas a partir de muestras de sangre periférica, sangre periférica movilizada y médula ósea.

REVISIÓN DE LITERATURA

CÉLULAS MADRE

Las células madre son un grupo de células que se caracterizan por la capacidad de dividirse y renovarse a lo largo de la vida de un individuo y por responder a señales o estímulos generados en el micro-ambiente donde se encuentran para diferenciarse hacia linajes celulares con características y funciones especializadas (Horwitz, 2003; Mera *et al.*, 2007). Estas pueden clasificarse según el tejido de origen en células madre embrionarias o adultas y según su potencial de diferenciación en células totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales (Marone *et al.*, 2002) (Fig. 1). Las células madre totipotentes son aquellas capaces de dar origen a tejido embrionario y extraembrionario; las células pluripotentes producen células derivadas de cualquiera de las tres capas embrionarias: mesodermo, endodermo y ectodermo; las células multipotentes generan todos los tipos celulares derivados de una sola capa embrionaria, como sucede en el caso de las células madre neuronales, hematopoyéticas y mesenquimales (Prósper y Verfaillie, 2003; Weissman *et al.*, 2001); y por último, las células madre con un menor potencial para diferenciarse son conocidas como células unipotenciales (Niesler, 2004).

Plasticidad de las células madre

Tradicionalmente se considera a las células madre adultas como células multipotenciales, a diferencia de las células madre embrionarias que se caracterizan como pluripotenciales (Prósper y Verfaillie, 2003), sin embargo, trabajos publicados recientemente indican la existencia de células madre adultas pluripotentes con capacidad de diferenciarse en tejidos derivados de cualquiera de las tres capas embrionarias (Jiang *et al.*, 2002; Grant *et al.*, 2002). Esta plasticidad concede a las células madre la capacidad de generar células maduras tanto de tejidos esperados, como de tejidos inesperados derivados de otras capas embrionarias (Fig. 2) (Horwitz,

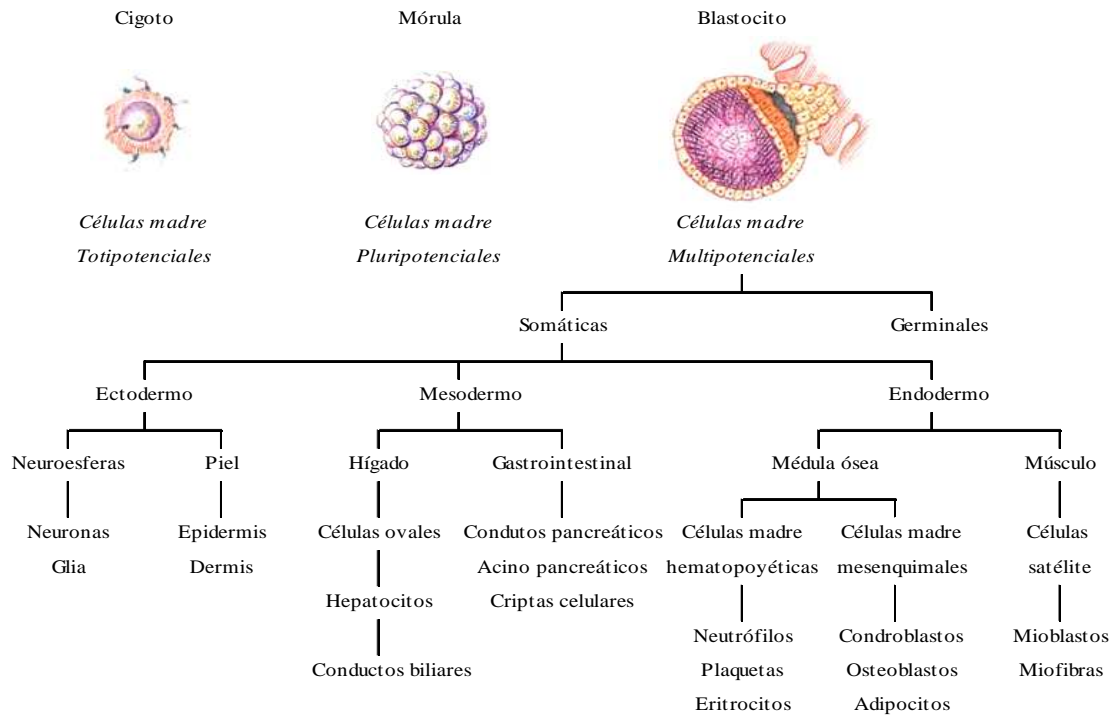


Figura 1. Modelo jerárquico de las células madre de acuerdo con su potencial de diferenciación (Prósper y Verfaillie, 2003).

2003), siendo el caso más típico el de las células madre hematopoyéticas capaces de diferenciarse a tejidos como hepatocitos, músculo cardíaco, osteoblastos o endotelio (Horwitz, 2003; Prósper y Verfaillie, 2003). En esta versatilidad o capacidad de transdiferenciación de las células madre adultas, los factores ambientales locales influyen directamente en la vía de diferenciación, de manera que algunas poblaciones de células madre tienen la capacidad de generar cualquier tejido de acuerdo con el tipo de microambiente en que se encuentren (Jiang *et al.*, 2002).

Tipos de células madre

Todas las células madre son células indiferenciadas que exhiben una capacidad de auto-renovación ilimitada y que tienen el potencial de generar múltiples linajes celulares o poblaciones progenitoras que pueden contribuir a la homeostasis tisular mediante la repoblación celular y la regeneración de tejidos después de una lesión (Horwitz, 2003).

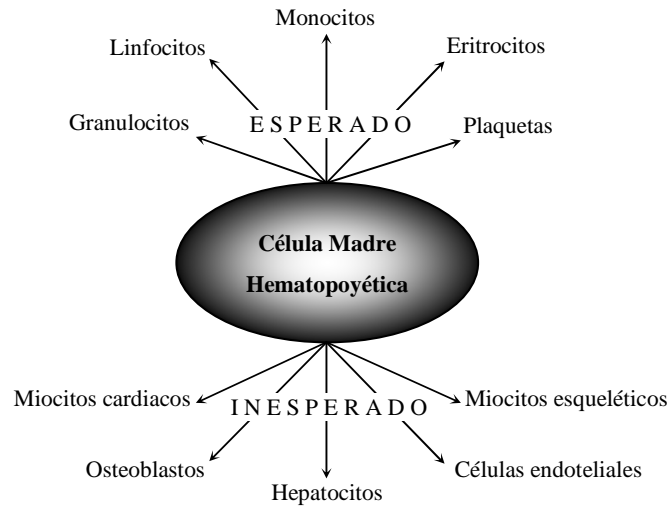


Figura 2. Representación esquemática de la vía de diferenciación de una célula madre que se transdiferencia a tejidos no hematopoyéticos inesperados. El diagrama representa la plasticidad verdadera de la célula madre (Horwitz, 2003).

Se han identificado distintos tipos de células madre a partir de embriones, tejidos fetales y sangre de cordón umbilical, así como en nichos específicos en muchos tejidos y órganos adultos de mamíferos, como sangre, médula ósea, cerebro, piel, ojos, corazón, riñones, pulmones, tracto gastrointestinal, páncreas, hígado, ovarios, glándula mamaria, próstata y testículos (Mimeault y Batra, 2006).

CÉLULAS MADRE DE LA MÉDULA ÓSEA

Se han descrito diferentes tipos de células madre presentes en la médula ósea:

Células madre mesenquimales (MSC)

La médula ósea contiene gran cantidad de células madre mesenquimales, también denominadas células madre estromales que son capaces de diferenciarse a tejidos mesodérmicos funcionales, como osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos esqueléticos (Pittenger *et al.*, 1999; Prósper y Verfaillie, 2003). Sin embargo, a pesar de su probada multipotencialidad mesodérmica y de su habilidad para diferenciarse a neuroectodermo, estas no se diferencian a tejido derivado del

endodermo y, por lo tanto, no se pueden considerar células madre pluripotenciales (Koc y Lazarus, 2001).

Células “Side Population” (SP)

Las llamadas células SP se han aislado tanto a partir de médula ósea como de músculo utilizando técnicas de citometría de flujo. Se sabe que estas son capaces de diferenciar a células madre hematopoyéticas en humanos, roedores y otras especies (Asakura *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 2001).

Células progenitoras adultas multipotenciales (MAPC)

Esta población celular de la médula ósea ha sido descrita recientemente por Jiang y colaboradores (2002) como auténticas células pluripotenciales con una capacidad diferenciadora muy similar a las células madre embrionarias. Estas células son capaces de proliferar *in vitro* más de 120 divisiones celulares sin un aparente envejecimiento; además, los experimentos de clonaje realizados por este grupo prueban que es una única célula la que es capaz de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias. *In vitro*, las MAPCs pueden ser inducidas a diferenciar a tejidos derivados del mesodermo como hueso, adipocitos, músculo esquelético, estroma hematopoyético o endotelio (Jiang *et al.*, 2002).

Células madre hematopoyéticas (CMH)

Las CMH han sido identificadas tanto *in vitro* como *in vivo* y utilizadas clínicamente desde hace más de 50 años. Además del potencial hematopoyético, las CMH pueden ser más potentes de lo esperado, dando lugar a tejidos derivados de las distintas capas embrionarias cuando son sometidas a ciertas circunstancias (Prósper y Verfaillie, 2003), por ejemplo, el potencial de las células madre hematopoyéticas para adquirir características de células progenitoras endoteliales, músculo cardíaco, músculo esquelético, neuronas adultas así como células de la glía, y de contribuir a otros tejidos como el epitelio pulmonar, gastrointestinal, renal o a la piel ha sido descrito recientemente (Grant *et al.*, 2002).

CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

Generalidades

El sistema hematopoyético tiene como función retirar de la circulación las células viejas o las defectuosas, eliminarlas y reemplazarlas por nuevas. Este sistema está constituido por un conjunto de células de la médula ósea, de la sangre y del sistema linfóide que dan origen a todos los tipos de células sanguíneas a partir de una célula madre hematopoyética (Mera *et al.*, 2007).

Las células madres hematopoyéticas poseen tres características básicas: tienen el potencial de generar varios linajes sanguíneos (Fig. 3), presentan un alto potencial proliferativo y tienen una alta capacidad de generación de nuevas células madre idénticas (Hoffman *et al.*, 2000; Ivanova *et al.*, 2002), por lo que han sido utilizadas exitosamente en el tratamiento de pacientes con alto riesgo de enfermedades hematológicas como leucemias agudas y crónicas, anemia aplásica severa, hemoglobinopatías, déficits inmunológicos congénitos, síndromes con falla de médula ósea y desórdenes metabólicos (Mera *et al.*, 2007; Armitage, 1994).

Microambiente hematopoyético

La médula ósea es un tejido graso y suave que yace al interior del hueso trabecular, y son en conjunto la trabécula y el estroma de la médula ósea los elementos que físicamente soportan y fisiológicamente mantienen el tejido hematopoyético (Panoskaltsis *et al.*, 2005). El microambiente hematopoyético de la médula ósea contiene células del estroma cuyo origen puede ser mesenquimal, como es el caso de las células endoteliales, los fibroblastos, los adipocitos y los osteoblastos o puede ser hematopoyético no-mesenquimal, como los macrófagos y las células dendríticas (Mera *et al.*, 2007). Todas estas células de la estroma producen y depositan elementos en la matriz extracelular y además son capaces de producir y concentrar citocinas locales hematopoyéticas que pueden inducir o inhibir la proliferación y diferenciación de células progenitoras, formando así el 'nicho de la célula madre' (Quesenberry *et al.*, 1994).

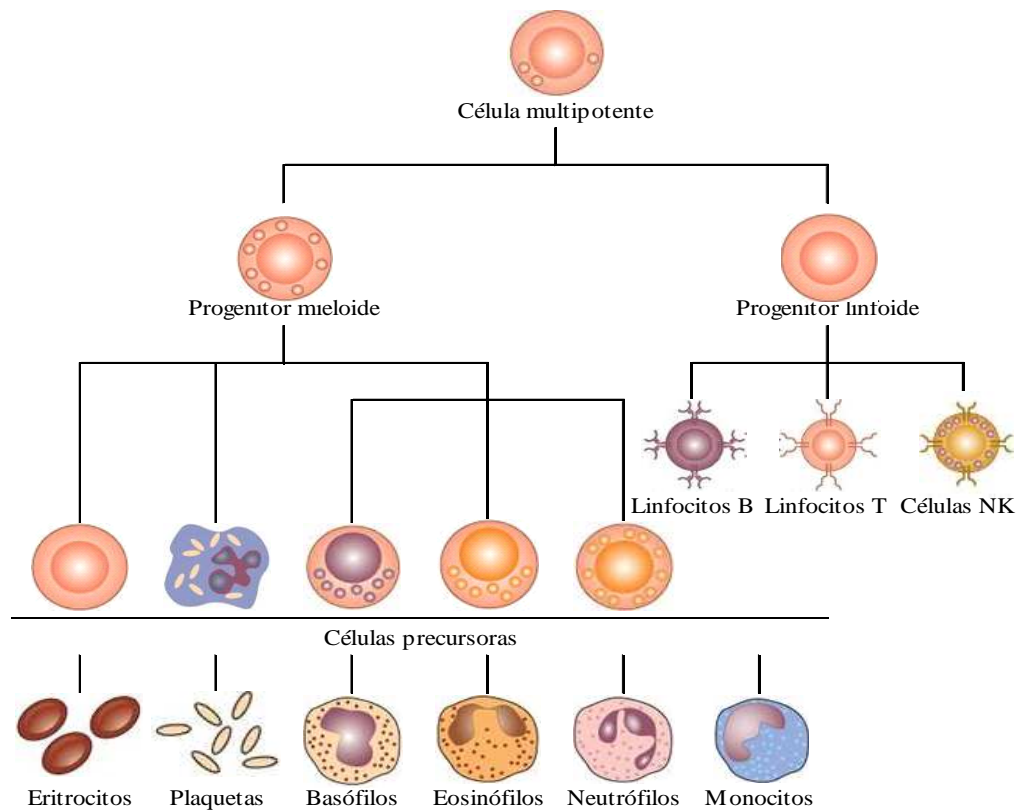


Figura 3. Representación de la hematopoyesis de una célula madre hematopoyética con potencial de generar los distintos linajes sanguíneos.

Características funcionales de las células madre hematopoyéticas

Las células madre hematopoyéticas son células multipotentes que tienen el potencial de generar los diferentes linajes sanguíneos: la línea roja que produce los eritrocitos, la línea blanca que produce células tanto del tipo linfóide (linfocitos B, T y células NK) como del tipo mielóide (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos) y la línea trombocítica que da origen a los megacariocitos/plaquetas (Fig. 3). Además, las CMH presentan un alto potencial proliferativo, es decir, que son capaces de dividirse y producir un gran número de células maduras durante la vida del individuo (Mayani y Lansdorp, 1998).

Estas células también tienen una alta capacidad de generación de nuevas células madre idénticas, manteniendo una división de tipo simétrico (Hoffman *et al.*, 2000;

Ivanova *et al.*, 2002). Esta capacidad de auto-renovación es muy importante debido a que múltiples procesos producen estrés fisiológico en el organismo, con un consumo exagerado de determinadas poblaciones celulares sanguíneas, que de no ser por la capacidad de auto-renovación de las CMH y su posterior compromiso hacia precursores más maduros se verían reducidas (Mera *et al.*, 2007). A medida que las CMH maduran, progresivamente van perdiendo su potencial de auto-renovarse pero se vuelven mitóticamente más activas, es decir, que en los compartimentos de células madres hay muy poca capacidad de auto-renovación y un alto potencial proliferativo (Hoffman *et al.*, 2000; Reya *et al.*, 2001).

Dado que las células madre hematopoyéticas pueden mantener su carácter primitivo cuando son manipuladas en el laboratorio, preservando su capacidad de proliferación y diferenciación *in vitro* hacia todos los linajes hematopoyéticos, cada día son más los estudios realizados sobre este tipo celular (Mera *et al.*, 2007).

Evolución de las células madre hematopoyéticas

Las células más primitivas o células madre hematopoyéticas corresponden al 0.01% del total de células nucleadas presentes en la médula ósea (Mayani *et al.*, 2007). Las CMH dan origen a células progenitoras hematopoyéticas (CPH), las cuales han perdido su capacidad de auto-renovación, pero conservan su potencial proliferativo; pueden ser multipotenciales, o bien, pueden estar restringidas a dos o a un solo linaje (Mayani *et al.*, 2007). Las CPH, que corresponden a <0.5% del total de células de la médula ósea, comparten ciertas características inmunofenotípicas con las CMH, como la expresión del antígeno CD34, sin embargo, presentan patrones de expresión de marcadores celulares muy particulares, de acuerdo al linaje al que pertenecen (Civin y Gore, 1993). Las CPH dan lugar a células precursoras hematopoyéticas reconocibles por su morfología, que constituyen la gran mayoría de las células de la médula ósea (>90% de las células hematopoyéticas residentes en la cavidad medular). Finalmente, los precursores hematopoyéticos al madurar, generan las células sanguíneas circulantes (Mayani *et al.*, 2007).

Generación de linajes y de unidades formadoras de colonias hematopoyéticas

Las células de la sangre se dividen en dos grandes grupos: mieloides y linfoides. Las primeras comprenden a los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos o macrófagos, eritrocitos y plaquetas, mientras que las segundas comprenden a los linfocitos B, linfocitos T y células NK (Fig. 3) (Mayani *et al.*, 2007). Durante el proceso de producción de las células mieloides o mielopoyesis se producen, a partir de células hematopoyéticas progenitoras, diversas unidades formadoras de colonias que originan un linaje celular específico (Fig. 4) (Mayani y Lansdorp, 1998).

Progenitores Mieloides

Los progenitores granulo-monocíticos por su parte incluyen unidades formadoras de colonias granulo-monocíticas (UFC-GM), que a su vez dan origen a unidades formadoras de colonias granulocíticas (UFC-G) y unidades formadoras de colonias monocíticas (UFC-M). Una vez encaminadas en la vía de diferenciación, las UFC-G dan lugar los eosinófilos, neutrófilos y basófilos; mientras que las CFU-M dan lugar a los macrófagos (Fig. 4) (Mayani y Lansdorp, 1998).

A lo largo de toda la ruta de diferenciación, las células de linaje mieloides son reguladas por un amplio número de citocinas, entre las que se encuentran el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), la interleucina-3 (IL-3), IL-6 y el factor de células madre (SCF). Estos factores estimuladores de colonias inducen la sobrevivencia y proliferación de CPH, conduciéndolas hacia linajes específicos de acuerdo con la combinación de factores empleados (Mayani y Lansdorp, 1998); así, por ejemplo, el G-CSF tiene un efecto más específico para la diferenciación a linaje granulocítico (Lu *et al.*, 1993) y el SCF por sí solo es capaz de estimular el crecimiento de CPH, aunque tiende a tener un mayor efecto cuando actúa en combinación con otros factores de crecimiento como GM-CSF, IL-3, IL-6, G-CSF, TPO y EPO (Pettengell *et al.*, 1994; Verfaillie *et al.*, 1990).

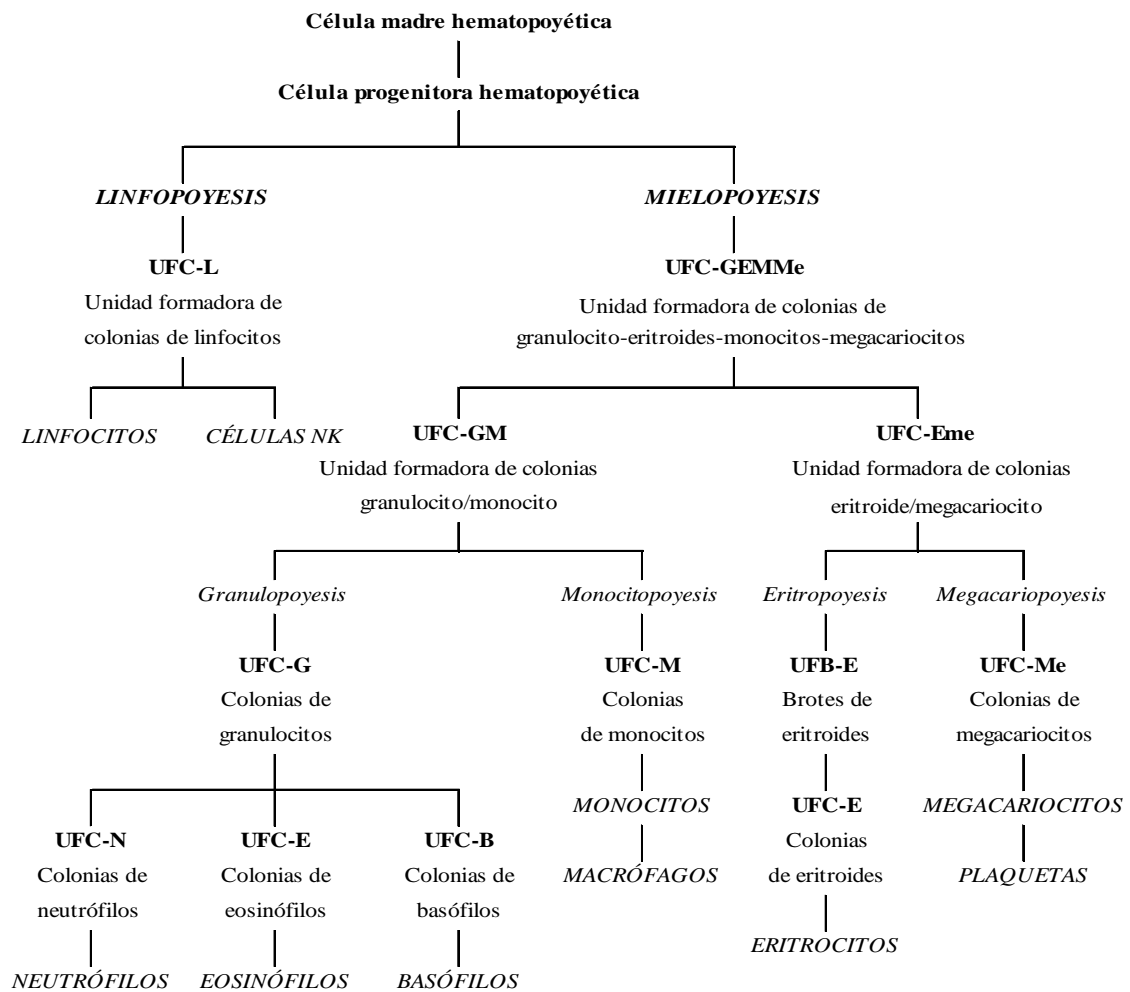


Figura 4. Generación de linajes de células hematopoyéticas y su relación con las diferentes unidades formadoras de colonias hematopoyéticas. Fuente: Mayani y Lansdorp (1998).

Progenitores Eritroides

El progenitor eritroide-megacariocítico, da lugar a unidades formadoras de brotes eritroides (UFB-E), quienes a su vez originan unidades formadoras de colonias eritroides (UFC-E), para posteriormente dar lugar a los eritrocitos. Este progenitor también puede originar unidades formadoras de colonias megacariocíticas (UFC-Me), que generarán megacariocitos inmaduros y maduros, que finalmente liberaran a las plaquetas (Fig.4) (Mayani y Lansdorp, 1998).

En la ruta de diferenciación de los progenitores eritroides (UFB-E y UFC-E) la eritropoyetina (EPO) actúa como una de las principales citocinas reguladoras de la eritropoyesis, pues su principal actividad es controlar la producción de células eritroides al promover la sobrevivencia, proliferación y diferenciación de progenitores eritroides en la médula ósea (Mayani *et al.*, 1998). Otras citocinas como la interleucina-3 (IL-3), la trombopoyetina (TPO), el ligando de la tirosina fetal-3 (FLT-3L) y el factor de células madre (SCF) participan también en la eritropoyesis, al regular la proliferación, diferenciación y sobrevivencia de células progenitoras y precursores eritroides (Mayani y Lansdorp, 1998).

TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

El sistema hematopoyético uno de los tejidos del cuerpo humano mejor caracterizado, debido a que sus propiedades biológicas únicas han permitido su manipulación experimental en estudios pre-clínicos y su trasplante en pacientes con alto riesgo de enfermedades hematológicas (Shizuru *et al.*, 2005) (Mimeault y Batra, 2006).

Tipos de trasplantes

Existen tres tipos de trasplantes de células madre hematopoyéticas: en los trasplantes autólogos, los pacientes reciben sus propias células madre; en un trasplante singénico, los pacientes reciben las células madre de su gemelo; y en un trasplante alogénico, las células madre son aportadas por un familiar o un donante no emparentado que sea compatible con los antígenos HLA de sus células madre (National Cancer Institute, 2005). Los trasplantes autólogos y alogénicos dependen del estado y del diagnóstico del paciente, pues generalmente implican la inyección intravenosa de un número específico de CMH (Mimeault y Batra, 2006), con el fin de renovar los progenitores hematopoyéticos funcionales necesarios para rescatar a un paciente después de recibir altas dosis de quimio y radioterapia, utilizar el efecto de injerto vs tumor como parte del tratamiento de enfermedades malignas y corregir algunos desórdenes inmunológicos, genéticos, metabólicos o hematológicos.

FUENTE DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

Médula ósea

Los trasplantes de células madre hematopoyéticas iniciaron en la década de 1950-1970 con el uso de células madre procedentes de médula ósea por un equipo en el Fred Hutchinson Cancer Research Center dirigido por E. Donnall Thomas (Cottler-Fox *et al.*, 2003), el cual demostró con su trabajo que células de la médula ósea administradas por vía intravenosa tenían la capacidad de repoblar la médula ósea y de producir nuevas células sanguíneas. La extracción de la médula se realiza mediante anestesia local o general, insertando una aguja especial desde el borde superior de los huesos ilíacos. La médula recolectada es procesada para extraer la sangre y se administra al receptor pocas horas después de la extracción (National Cancer Institute, 2005).

Si es necesario, las células cultivadas de la médula ósea pueden congelarse y almacenarse para su uso posterior, pues la médula ósea puede congelarse durante años y seguir estando apta para el trasplante de células madre (National Cancer Institute, 2005).

Sangre periférica

Un pequeño número de células madre hematopoyéticas circulan en la sangre periférica durante la hemopoyesis, sin embargo, para recolectar una cantidad adecuada de células madre para trasplantar, es necesario efectuar una movilización de las mismas desde la médula ósea, con el fin de incrementar el número de células madre que se liberan hacia el torrente sanguíneo (Harada, 1996). Para ello se utilizan la quimioterapia, los factores de crecimiento u hormonas y la aplicación de un factor de crecimiento durante la fase de recuperación luego de la quimioterapia (García, 2003). Actualmente el uso de factores de crecimiento, como los factores estimulantes de colonias hematopoyéticas (CSF) y algunas citocinas (SCF, IL-3, IL-4), es la metodología más aplicada, debido a su baja toxicidad y a la posibilidad de programar el momento de la recolección de la sangre (Harada, 1996). Las células madre provenientes del torrente sanguíneo son recolectadas mediante un procedimiento

llamado aféresis o leucoféresis, en el cual cuatro o cinco días después de haber realizado la movilización de las células madre del donante, la sangre se extrae, se bombea por un separador de células sanguíneas que separa la sangre en cuatro componentes: glóbulos rojos, plasma, glóbulos blancos y plaquetas. Los dos últimos componentes se cultivan porque contienen las células madre. Los glóbulos rojos y el plasma son devueltos al donante (National Cancer Institute, 2005).

AISLAMIENTO Y ENSAYOS EN CÉLULAS MONONUCLEADAS

Un trasplante exitoso de células madre hematopoyéticas, tanto autólogo como alogénico, requiere la inyección de un número suficiente de progenitores hematopoyéticos capaces de regenerar una amplia gama de linajes hematopoyéticos en el momento oportuno (Cottler-Fox *et al.*, 2003). Con la finalidad de aislar y de determinar algunos parámetros como identidad, viabilidad, madurez celular, capacidad de crecimiento y proliferación de CMH se utilizan los siguientes ensayos:

Aislamiento de células mononucleares por gradiente de densidad

Bøyum (1968) describió algunos métodos para el aislamiento de células mononucleares a partir de sangre circulante y médula ósea que utilizaban mezclas de polisacáridos y medio de contraste radio-opaco para purificar células mononucleares de sangre circulante y médula ósea. Actualmente, para la separación de células mononucleares a partir de pequeños volúmenes de muestra se utiliza una solución acuosa de polisucrosa y diatrizoato sódico ajustada a una densidad de $1,077 \pm 0,001$ g/ml, que al crear un gradiente de densidad facilita la rápida recogida de células mononucleares viables con alto rendimiento y pureza (Sigma-Aldrich, 2003; Amersham Biosciences, 2001).

Tinción con azul de tripán

Para determinar la viabilidad de las células recolectadas pueden emplearse diferentes métodos, de los cuales el más común es la tinción con azul tripán, molécula coloreada de gran peso molecular que sólo es capaz de entrar en las células que tienen la

membrana alterada, por lo que una célula viva en perfecto estado se observará incolora ante esta tinción mientras que una célula con la membrana rota se observará azul en conteos celulares con hemocitómetro (Schmidt, 1979).

Ensayo de unidades formadoras de colonias

Uno de los ensayos desarrollados *in vitro* para cuantificar progenitores multipotenciales, de eritrocitos, granulocitos y monocitos de los linajes sanguíneos mieloides es el cultivo de células progenitoras hematopoyéticas en una matriz semisólida, en la cual los progenitores individuales, denominados unidades formadoras de colonias (UFC), proliferan para formar discretos agregados celulares o colonias (StemCell Technologies, 2004). La frecuencia de estos progenitores hematopoyéticos en muestras normales de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica y sangre periférica movilizada se muestra a continuación.

Cuadro 1. Frecuencia de progenitores en muestras humanas normales médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica y sangre periférica movilizada.

Fuente de células	Total de progenitor/placa 35mm			
	UFC-E	UFB-E	UFC-GM	UFC-GEMM
Médula ósea por 10 ⁵ células (n=17)	188 (1 - 506)	175 (1 - 477)	408 (1 - 990)	10 (1 - 30)
Sangre de cordón umbilical por 10 ⁵ células (n=16)	9 (1 - 48)	104 (1 - 310)	115 (1 - 303)	25 (1 - 59)
Sangre periférica normal por 10 ⁵ células (n=30)	2 (1 - 10)	30 (1 - 62)	9 (1 - 18)	2 (1 - 5)
Sangre periférica movilizada por 10 ⁵ células (n=19)	8 (1 - 27)	121 (1 - 257)	111 (1 - 257)	23 (1 - 67)

Nota: Los valores de UFC fueron determinados utilizando MethoCult® GF H4434. Los valores están expresados de la siguiente manera: el rango está definido por medio de ± 2 desviaciones estándar.

Fuente: StemCell Technologies, 2004.

Los ensayos de UFC se efectúan colocando una suspensión celular en un medio semisólido de metilcelulosa suplementado con nutrientes y citocinas recombinantes (cuadro 2), seguido por una incubación a 37°C por 14 a 16 días. Posteriormente, las

UFC son clasificadas y enumeradas con base en el reconocimiento morfológico de uno o más tipos celulares de linajes hematopoyéticos en la colonia.

Cuadro 2. Función de las citocinas recombinantes presentes en el medio MethoCult®

Citocinas	Descripción
h EPO	Se usa en combinación con otras citocinas para el crecimiento de progenitores eritroides
h IL-3	Usado en combinación con otras citocinas promueve el crecimiento de progenitores mieloides tempranos de todos los linajes.
h SCF	Para el crecimiento de células madre, utilizado en combinación con otras citocinas promueve el crecimiento de progenitores mieloides y linfoides.
h GM-CSF	Para el crecimiento de progenitores granulocíticos y monocíticos.

Fuente: StemCell Technologies, 2004.

La evaluación y enumeración de las colonias puede realizarse *in situ* mediante microscopia de luz o utilizando métodos citoquímicos e inmunocitoquímicos (StemCell Technologies, 2004).

El cultivo de unidades formadoras de colonias granulocito-eritroides-macrófagos-megacariocitos (UFC-GEMM), unidades formadoras de colonias granulocito-macrófago (UFC-GM), unidades formadoras de brotes eritroides (UFB-E) y unidades formadoras de colonias eritroides (UFC-E) se utiliza comúnmente para detectar y cuantificar progenitores humanos hematopoyéticos en muestras de médula ósea y sangre periférica (StemCell Technologies, 2004). Además, el conteo de UFC se ha utilizado para determinar las tasas de viabilidad y recuperación celular en ensayos de criopreservación de células madre de sangre periférica y de cordón umbilical (Katayama *et al.*, 1997; Kudo *et al.*, 2005).

Según estudios efectuados por Migliaccio y colaboradores (2000) la dosis de UFC es un parámetro más predictivo de la supervivencia post-trasplante que la dosis de células nucleadas, metodología usualmente empleada, observándose prendimiento y trasplante libre de enfermedad a partir de una dosis de 5×10^4 UFC/Kg de peso del paciente.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estandarizar los procedimientos de ensayos de unidades formadoras de colonias de células progenitoras hematopoyéticas a partir muestras de sangre periférica, sangre periférica movilizada y médula ósea.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener la autorización del Comité Institucional de Bioética en Investigación de la Caja Costarricense de Seguro Social (COIBI-CCSS) para efectuar esta propuesta de investigación.
- Estandarizar los protocolos de obtención, anticoagulación, traslado y descongelación de muestras de médula ósea y sangre periférica.
- Estandarizar el protocolo de aislamiento de células mononucleadas por gradiente de densidad a partir de muestras de médula ósea y sangre periférica.
- Estandarizar el ensayo de unidades formadoras de colonias mediante el cultivo de células mononucleadas en un medio de metilcelulosa.
- Generar patrones de identificación de colonias de UFC-E, UFB-E, UFC-GM y UFC-GEMM presentes en una placa de cultivo con medio de metilcelulosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

AUTORIZACIÓN DEL COIBI-CCSS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Ingeniería en Tejidos del Instituto Tecnológico de Costa Rica, el Laboratorio de Investigación y Enseñanza de Hematología del Hospital San Juan de Dios y el Laboratorio de Investigación del Hospital Nacional de Niños, por lo cual fue necesario solicitar la autorización del Comité Institucional de Bioética en Investigación de la Caja Costarricense de Seguro Social (COIBI-CCSS). Por lo cual se presentaron y sometieron a evaluación los siguientes formularios:

- Formulario AP-I: Solicitud de revisión de protocolo (apéndice 1)
- Formulario AP-IIa: Resumen de propuesta de investigación (apéndice 2)
- Formulario AP-IIIa: Requisitos del protocolo de investigación (apéndice 3)
- Formulario AP-IV: Laboratorios a utilizar en el estudio (apéndice 4)
- Formulario AP-V: Presupuesto (apéndice 5)
- Declaración jurada de fuentes de financiamiento (anexo 1)
- Formulario CV-I: Currículum vitae abreviado de investigadores (apéndice 6)

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS CELULARES

Se desarrollaron varios procedimientos con el fin de estandarizar los protocolos de obtención, anticoagulación, traslado y descongelación de muestras de médula ósea y sangre periférica. Las especificaciones de equipo, materiales y reactivos utilizados se muestran en el apéndice 10. Las muestras de sangre periférica, sangre periférica movilizada y médula ósea fueron colectadas por del personal médico del Servicio de Hematología del Hospital San Juan de Dios, luego de completar el ‘Formulario de Ensayos UFC, AT y CD34’ (apéndice 7). Se asignó un código a cada tubo de acuerdo con el tipo de muestra (MO-SP-SPM), el proceso (muestra criopreservada o no) y un número consecutivo: $XXX - X - XX$
muestra proceso consecutivo

Durante la colecta, aproximadamente un mililitro de cada muestra de médula ósea y sangre circulante se transfirió rápidamente después de la aspiración a un tubo estéril con anticoagulante (EDTA, heparina o ACD-A en caso de criopreservación). La muestra se agitó inmediatamente por inversión y se trasladó al Laboratorio de Ingeniería en Tejidos del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Las muestras recién colectadas se transportaron en una hielera con hielo, envueltas en gasas y dentro de una bolsa con cierre para evitar el contacto con el contenedor y las muestras criopreservadas se descongelaron en el Laboratorio de Hematología del HSJD y luego se trasladaron de la misma manera al ITCR, donde se continuó con su procesamiento. Utilizando el procedimiento descrito por Young-Jin (2007) se efectuó la descongelación de las recolecciones de sangre periférica movilizada colectadas y criopreservadas el 08/10/2007 por la Dra. María Rodríguez. Se descongeló la bolsa de recolección con la sangre colectada en un baño de agua Cole-Parmer (modelo Polystat) a 37°C, se secó el exterior y se limpió con alcohol al 70% para evitar contaminación. Rápidamente, se transfirió cerca de 1ml de la suspensión celular descongelada a un tubo cónico de centrifuga de 15ml con 10ml IMDM al 10% (apéndice 8). Se centrifugó a temperatura ambiente a 200g durante 10min, se removió el supernadante sin tocar el botón de células, se lavó una vez con 10ml de DPBS (apéndice 8) y se volvió a centrifugar a temperatura ambiente a 200g durante 10min. Con cuidado, se resuspendieron las células en 2ml de IMDM al 2% (apéndice 8) y se realizó un conteo para establecer el número y concentración de células nucleadas.

Con el propósito de aislar células mononucleares a partir de 1ml de sangre periférica y médula ósea, de acuerdo con los procedimientos detallados por Sigma-Aldrich (2003) y StemCell Technologies (2004), se mezcló bien la muestra y se efectuó un conteo inicial de células para establecer el número y la concentración de células nucleadas presentes en la muestra inicial. En cámara de flujo laminar Telstar (modelo BIO-II-AG), se midió el volumen total de la muestra a procesar y se transfirió a un tubo nuevo, donde las células fueron diluidas al menos 1:1 en IMDM al 2% y mezcladas por inversión.

En un tubo de centrífuga cónico de 15ml (#21008-216, WWR) se colocaron 3,0ml de Histopaque-1077 (#H8889, Sigma) mezclado por inversión. Cuando el Histopaque alcanzó la temperatura ambiente, se extendieron sobre el tubo con Histopaque-1077 3,0ml de muestra/IMDM, sin perturbar la interface histopaque/muestra. El tubo se centrifugó en una centrífuga Fisher Scientific (modelo AccuSpin1) a $400 \times g$ durante exactamente 30 minutos a temperatura ambiente. Después del centrifugado, se aspiró y se desechó la capa superior hasta 0,5cm de la zona intermedia blanquecina con las células mononucleares, utilizando una pipeta. Esta zona intermedia fue transferida con cuidado, utilizando una pipeta, a un tubo de centrífuga cónico. A este tubo se añadió IMDM al 2% hasta completar 4ml, se mezcló por inversión y luego se centrifugó a $300 \times g$ por 10 minutos. Seguidamente se aspiró el sobrenadante (dejando aproximadamente 1ml) y se desechó. El botón de células se resuspendió en un vórtex de Scientific Industries (modelo 6-560), y luego se adicionaron 3,0ml de IMDM al 2% y se agitó con vórtex más vigorosamente. Se efectuó una tercera centrifugación a $300 \times g$ durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 2,0ml de IMDM al 2%.

Se registró el volumen final y se cuantificó y determinó la viabilidad de las células mononucleadas aisladas con la técnica de exclusión de colorante con azul de tripán (Bøyum, 1968) de acuerdo con los procedimientos proporcionados por StemCell Technologies (2004). Se tomaron 10 μ l de la muestra contenida en cada tubo y se mezclaron con 10 μ l de azul tripán (#T6146, Sigma) al 0,4%. Se dejó reposar la mezcla entre 5 y 15 minutos y con una micropipeta se llenaron ambos retículos de un hematocitómetro Boeco (código BOE 14) con 10 μ l de muestra/azul tripán y se dejó reposar durante 3 minutos. Seguidamente, utilizando un microscopio marca Novex (modelo B-Range), se contaron las células teñidas y las no teñidas en cada cuadrante. Se ajustó la concentración de la suspensión con diluciones 1:50 ó 1:100 en PBS (#P4417, Sigma) para obtener 20-50 células por cuadrante (apéndice 9). Se calculó el promedio de células viables y el porcentaje de viabilidad de acuerdo con las siguientes fórmulas:

Células viables/ml = promedio células viables por cuadrante x factor de dilución x 10⁴

Porcentaje de viabilidad = células vivas ÷ (células vivas + células muertas) x 100

ENSAYO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

Con el fin de iniciar con la estandarización el ensayo de unidades formadoras de colonias se desarrollaron los siguientes protocolos basados en los procedimientos proporcionados por StemCell Technologies (2004).

Cada alícuota preparada de 3ml de MethoCult (apéndice 8) se dejó descongelando bajo refrigeración a 2-8°C durante la noche. En cámara de flujo laminar, se prepararon las placas de cultivo colocando dos placas de cultivo pre-tratadas de 35mm (#27100, StemCell Technologies) con tapa, dentro de una placa de 100mm (#27125, StemCell Technologies) tapada. Se etiquetaron las placas de cultivo de 35mm en el borde con el experimento y número de ensayo. Se efectuó una dilución de la muestra de células mononucleadas con IMDM al 2% a 10X de la concentración final requerida (cuadro 3), con la fórmula $c_1 \cdot v_1 = c_2 \cdot v_2$.

Cuadro 3. Concentración celular 10X a preparar y concentración final requerida de células mononucleadas por placa según la fuente de las células mononucleadas.

Fuente de las células	Concentración 10x (CMN/ μ l)	Concentración requerida CMN/placa
Médula ósea	2×10^2 (1 - 5×10^2)	2×10^1 (1 - 5×10^1)
Sangre periférica	2×10^3 (1 - 2×10^3)	2×10^2 (1 - 2×10^2)
Sangre periférica movilizada	2×10^2 (1 - 5×10^2)	2×10^1 (1 - 5×10^1)

Se adicionaron 300 μ l de células diluidas a un tubo de 3ml de MethoCult® para ensayos por duplicado y 150 μ l de células diluidas a un tubo de 1.5ml de MethoCult® para ensayos únicos. Se colocó el tubo en un vórtex y se mezcló a fondo, dejándolo luego reposar por 5 min para disipar las burbujas antes de dispensar.

Para dispensar la mezcla células-metilcelulosa en las placas de cultivo, se adjuntó una aguja calibre 16 con punta roma (#28110, StemCell Technologies) una jeringa estéril de 3ml, utilizando siempre una nueva aguja y jeringa en cada tubo. Se tomó 1.1ml de

la mezcla células-metilcelulosa para cada placa de 35mm, removiendo la tapa con la mano izquierda y colocando la jeringa sobre el centro de la placa sin tocar la jeringa ni la placa. Se tapó la placa y se distribuyó el medio uniformemente sobre la superficie de cada placa mediante inclinación suave y rotación de la placa para permitir que el menisco se uniera a la pared de las placas en todos los lados.

Se colocaron las placas de cultivo y una placa de 35mm sin tapa con 3ml de agua destilada estéril en la placa petri de 100mm. Estas fueron incubadas durante 15 días a 37°C, 5% de CO₂ y con $\geq 95\%$ de humedad en una incubadora Barnstead International (modelo 397).

Para efectuar la identificación y enumeración de las unidades formadoras de colonias se utilizó una placa de puntuación cuadrículada de dos líneas perpendiculares y ocho cuadrados (de aproximadamente 2mm) en el centro de una placa de cultivo. Se sacó cada placa de cultivo de la incubadora y se colocó en el centro de la placa de puntuación, en un microscopio invertido marca Hund (modelo Wilover 30) y se ajustó a bajo poder (objetivo 2X) hasta enfocar las colonias. Se exploró a bajo poder (objetivo de 2X, aumento de 40X) para identificar y evaluar la distribución relativa y el número aproximado de las colonias, la presencia/ausencia de otras células/desechos, morfología general, salud de las colonias.

Iniciando con un extremo de la placa, se contaron todas las colonias de UFC-E a alto poder (objetivo de 4-5X, aumento de 40-50X). Una vez que la placa fue explorada en alto poder, se cambió a un aumento más bajo (objetivo 2X, aumento 25X con oculares de 10X) para identificar las colonias UFC-E, UFC-GEMM y UFC-GM y se efectuaron los conteos en las demás placas de cultivo de la misma manera. Se determinó la cantidad de UFC por placa de cultivo de 35mm y de UFC por mililitro. El total de UFC/ml se obtuvo con la fórmula: $UFC / \mu L = UFC \times D \div 100 \mu L$ donde 'UFC' es el total de unidades formadoras de colonia por placa de 35mm; 'D' es la dilución efectuada para alcanzar la concentración 10X requerida; y '100 μ l' es el total de muestra diluida dispensado en cada placa de 35mm.

RESULTADOS

AUTORIZACIÓN DEL COIBI-CCSS

El COIBI-CCSS dio su autorización para efectuar la propuesta de investigación “Estandarización del protocolo de ensayo de unidades formadoras de colonias de células progenitoras hematopoyéticas a partir de células mononucleares de sangre periférica, sangre de cordón umbilical y médula ósea”, que corresponde al expediente R08-SABI-00024 de los archivos de la Sub-área de Bioética en Investigación del CENDEISS. El Certificado de Recomendación #018-2008 (anexo 2) extendido por el COIBI establece la aprobación de los formularios AP-I (apéndice 1), AP-IIa (apéndice 2), AP-IV (apéndice 4) y AP-V (apéndice 5) presentados el 21/07/2008; y el Certificado de Aprobación #020-2008 (anexo 3) aprueba la última versión del formulario AP-IIIa (apéndice 3) del 06/10/2008.

Se presentaron además los informes correspondientes a los trimestres de octubre del 2008 (apéndice 11) y enero del 2009 (apéndice 12) solicitados por el COIBI-CCSS.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS CELULARES

Los resultados del procesamiento de 2 muestras de sangre periférica movilizada criopreservadas, 2 muestras de sangre periférica y 12 muestras de médula ósea demostraron que:

La toma de muestras debe ser efectuada por personal médico bien entrenado siguiendo de forma rigurosa las condiciones de asepsia. Este debe entregar la muestra anticoagulada al personal capacitado en el ensayo de UFC que efectuará el procesamiento.

El código asignado permite la identificación eficaz del material colectado y limita el acceso a información del paciente por parte de personas ajenas al Servicio de Hematología del HSJD.

Cuando se utilizan anticoagulantes, la muestra debe invertirse suavemente varias veces, a fin de disolver totalmente el anticoagulante en la sangre y así asegurar que se impida el proceso de coagulación.

El traslado del material extraído al Laboratorio de Ingeniería en Tejidos del ITCR debe efectuarse el mismo día de la colecta y a temperatura ambiente con el objetivo de mejorar la conservación de las muestras y evitar una disminución en el número y la viabilidad de las células. Sin embargo, y sólo en caso de ser necesario, las muestras pueden almacenarse en refrigeración a 2-8°C hasta que puedan procesarse (StemCell Technologies, 2004).

El procedimiento de descongelación aplicado a las muestras SPM-C-01 y SPM-C-02 no fue completamente eficiente debido a la formación de coágulos al transferir la suspensión celular descongelada al tubo con IMDM al 10%, sin embargo, los coágulos se resuspendieron parcialmente después de agitar fuertemente con vórtex (Fig. 5), y a pesar de que su presencia dificultó el conteo y el aislamiento de las células se obtuvo la cantidad de células mononucleares adecuada para realizar el ensayo de UFC.

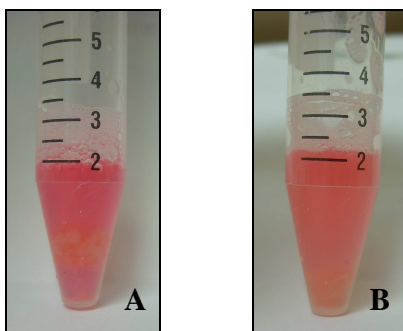


Figura 5. Coágulo observado en la descongelación de las muestras SPM-C-01 y SPM-C-02. A) Coágulo. B) Coágulo parcialmente disuelto.

Los resultados obtenidos con el aislamiento por gradiente de densidad utilizando Histopaque-1077 demostraron que se dio una adecuada separación de células mononucleares (CMN) en muestras anticoaguladas de médula ósea y sangre circulante; pues después de la centrifugación, las CMN permanecen en la zona entre

el plasma y el histopaque mientras que los eritrocitos y granulocitos se sedimentan, permitiendo su posterior aislamiento.

Se comprobó que el volumen de muestra utilizado ($1,0 \pm 0,5$ ml) es adecuado para alcanzar la concentración 10X de células mononucleadas requerida para efectuar los ensayos de UFC (cuadros 3 y 4).

Además, la viabilidad celular determinada mediante tinción con azul de tripán demostró la eficacia del procedimiento utilizado, pues solamente se observó una pequeña disminución en el porcentaje de viabilidad de las células aisladas (cuadro 4).

Cuadro 4. Volumen de muestra inicial, total de células por mililitro y porcentaje de viabilidad antes y después del aislamiento células mononucleadas con Histopaque-1077. ITCR, 2008.

Muestra	Volumen de muestra (ml)	Antes del aislamiento		Después del aislamiento	
		Total (leucocitos/ μ l)	% viabilidad	Total (CMN/ μ l)	% viabilidad
MO-01	0,6	$5,8 \times 10^4$	89%	$4,8 \times 10^2$	-
MO-02	1,0	$1,2 \times 10^4$	87%	$3,8 \times 10^3$	-
MO-03	0,8	$2,0 \times 10^4$	86%	$2,1 \times 10^3$	-
MO-04	0,7	$4,3 \times 10^4$	87%	$2,6 \times 10^3$	-
MO-05	0,9	$1,4 \times 10^4$	82%	$1,4 \times 10^2$	-
MO-06	0,8	$9,7 \times 10^4$	96%	$4,2 \times 10^3$	-
MO-07	1,0	$2,5 \times 10^4$	100%	$2,1 \times 10^3$	90%
MO-08	1,5	$1,1 \times 10^4$	100%	$8,3 \times 10^2$	85%
MO-09	0,9	$2,2 \times 10^4$	100%	$8,2 \times 10^2$	86%
MO-10	0,8	$1,7 \times 10^4$	98%	$1,6 \times 10^3$	96%
MO-11	1,5	$1,0 \times 10^4$	97%	$1,6 \times 10^3$	87%
MO-12	1,5	$1,3 \times 10^4$	98%	$1,6 \times 10^3$	97%
SP-01	1,5	$9,2 \times 10^3$	-	$2,7 \times 10^3$	99%
SP-02	1,0	$4,6 \times 10^5$	98%	$7,4 \times 10^4$	94%
SPM-C-01	1,0	$2,4 \times 10^5$	37%	$3,2 \times 10^2$	36%
SPM-C-02	1,0	$2,0 \times 10^5$	44%	$5,5 \times 10^2$	43%

Nota: En las muestras MO-01 a MO-06 no se calculó el porcentaje de viabilidad después del aislamiento.

ENSAYO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

Los resultados de la estandarización del protocolo de ensayo de UFC permitieron comprobar la necesidad de diluir la suspensión de células mononucleadas a la concentración final requerida según StemCell Technologies (2004), con el fin de obtener un total de UFC/placa que permita realizar una correcta cuantificación (cuadro 5).

Cuadro 5. Diluciones efectuadas a la suspensión de CMN, concentración 10X preparada y concentración final de CMN por placa. ITCR. 2008.

Muestra	Dilución	Concentración 10X (CMN/ μ l)	Concentración de CMN/placa
MO-01	1	$4,8 \times 10^2$	$4,8 \times 10^1$
MO-02	10	$3,8 \times 10^2$	$3,8 \times 10^1$
MO-03	10	$2,1 \times 10^2$	$2,1 \times 10^1$
MO-04	10	$2,6 \times 10^2$	$2,6 \times 10^1$
MO-05	1	$1,4 \times 10^2$	$1,4 \times 10^1$
MO-06	10	$4,2 \times 10^2$	$4,2 \times 10^1$
MO-07	10	$2,1 \times 10^2$	$2,1 \times 10^1$
MO-08	2	$4,2 \times 10^2$	$4,2 \times 10^1$
MO-09	2	$4,1 \times 10^2$	$4,1 \times 10^1$
MO-10	10	$1,6 \times 10^2$	$1,6 \times 10^1$
MO-11	10	$1,6 \times 10^2$	$1,6 \times 10^1$
MO-12	10	$1,6 \times 10^2$	$1,6 \times 10^1$
MO-13	4,85	$2,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^1$
SP-01	1,35	$2,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$
SP-02	25	$2,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$
SP-C-01	2	$1,6 \times 10^2$	$1,6 \times 10^1$
SP-C-02	1	$5,5 \times 10^2$	$5,5 \times 10^4$

Los resultados obtenidos con la identificación y cuantificación de las UFC (cuadro 6) muestran variabilidad en la obtención de los progenitores hematopoyéticos esperados al utilizar el medio MethoCult GF H4434.

Cuadro 6. Total de unidades formadoras de colonias por placa y por microlitro obtenidas en medio MethoCult GF H4434, después de 15 días de cultivo. ITCR, 2008.

Muestra	UFC-E UFB-E	UFC-GM	UFC-GEMM	UFC/placa	UFC/ μ l de muestra inicial
MO-01	211	109	5	325	3,25
MO-02	236	39	1	276	27,60
MO-03	447	572	3	1022	102,20
MO-04	218	507	4	729	72,90
MO-05	287	457	2	746	7,46
MO-06	546	634	4	1184	118,40
SPM-C-01	302	0,5	43,5	337	6,74
SPM-C-02	48	0	0	48	0,48

Notas: Por recomendación de la Dra. María Rodríguez los progenitores eritroides UFB-E y UFC-E se clasificaron como UFC-E, debido a su difícil identificación y reconocimiento.

No se efectuó el conteo de UFC en las muestras MO-07, MO-08, MO-09, MO-10, MO-11, MO-12, MO-13, SP-01 y SP-02 pues se presentó contaminación durante su cultivo.

La observación de las colonias obtenidas, y su comparación con las descripciones y fotografías del 'Manual técnico para los ensayos de células formadoras de colonias humanas utilizando MethoCult' (#28404, StemCell) permitieron lograr una descripción general de las unidades formadoras de colonias eritroides (UFC-E, UFB-E), unidades formadoras de colonias granulocito-macrófago (UFC-GM) y unidades formadoras de colonias granulocito-eritroides-macrófagos-megacariocitos (UFC-GEMM) obtenidas con el medio MethoCult (cuadro 7, figuras 6-13).

Cuadro 7. Descripción de las unidades formadoras de colonias obtenidas utilizando el medio MethoCult. ITCR, 2008.

Tipo de progenitor	Descripción general de las colonias
UFC-E + UFB-E	<p>Los progenitores eritroides pueden generar colonias maduras (UFB-E) o más inmaduras (UFC-E).</p> <p>Estos progenitores producen colonias con eritroblastos en agrupaciones solas o múltiples.</p> <p>Usualmente se observan colonias bien definidas con coloración rojiza debido a la hemoglobinización de los eritroblastos</p> <p><i>Figuras 6, 7 y 8</i></p>
UFC-GM	<p>Produce colonias incoloras con al menos 20 granulocitos (UFC-G), macrófagos (UFC-M) o células de ambos linajes (UFC-GM).</p> <p>Las células de linaje macrófago tienden a ser más largas y de forma más irregular que las células de linaje granulocito.</p> <p>Las UFC-GM que derivan de progenitores primitivos pueden contener cientos de células en agrupaciones solas o múltiples.</p> <p><i>Figuras 9, 10 y 11</i></p>
UFC-GEMM	<p>Las UFC-GEMM son originadas por un progenitor multipotencial.</p> <p>Este progenitor produce colonias rojizas con eritroblastos y células incoloras de al menos dos linajes reconocibles en una misma colonia.</p> <p>A las UFC-GEMM también se les llama colonias mixtas.</p> <p><i>Figuras 12 y 13</i></p>



Figura 6. Colonia de UFC-E formando una sola agrupación que presenta más de 200 células color rojo debido a la hemoglobinización de los eritroblastos. 50X. ITCR, 2008.

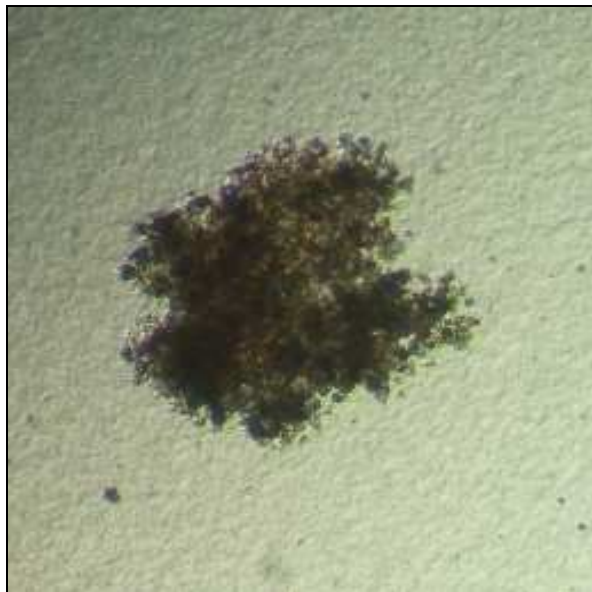


Figura 7. Colonia de UFC-E con múltiples agrupaciones. Nótese el pequeño tamaño de las células individuales y su color rojizo. 50X. ITCR, 2008

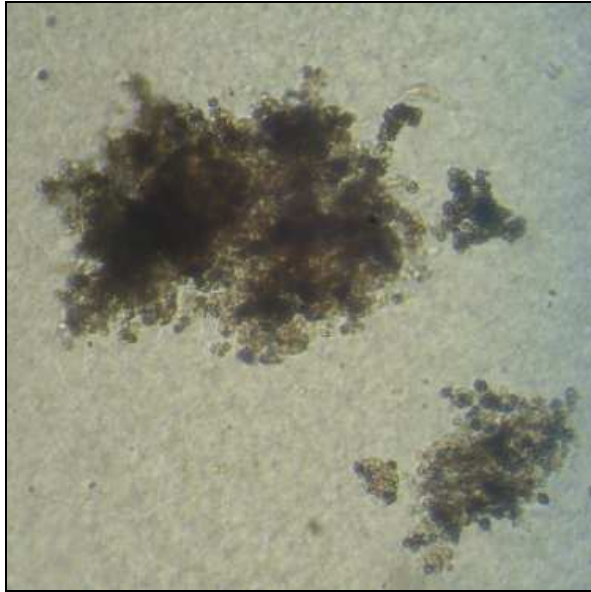


Figura 8. Dos colonias de UFC-E, a la derecha una agrupación individual y a la izquierda una múltiple. 50X. ITCR, 2008.



Figura 9. Una colonia de UFC-M con un denso núcleo de células reconocibles. Las células de linaje monocito/macrófago son más grandes y de forma más irregular que las células de linaje granulocito. 50X. ITCR, 2008.



Figura 10. Una colonia incolora de UFC-GM con células del linaje granulocítico y macrófago. 25X.
ITCR, 2008.

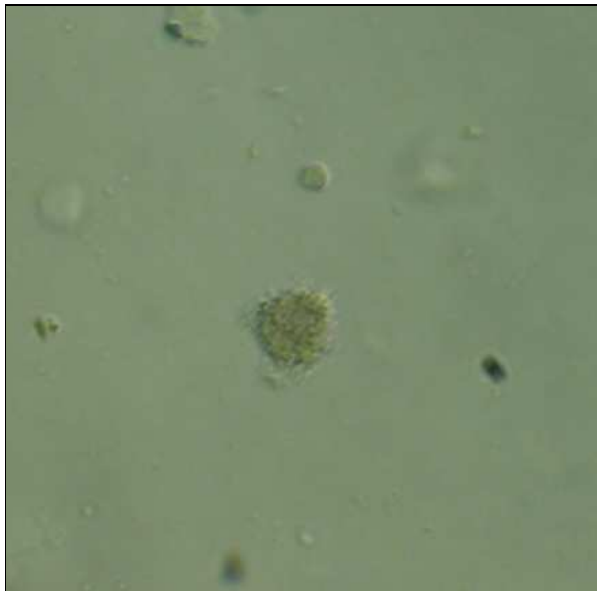


Figura 11. Una colonia individual incolora de UFC-GM. 25X. ITCR, 2008.

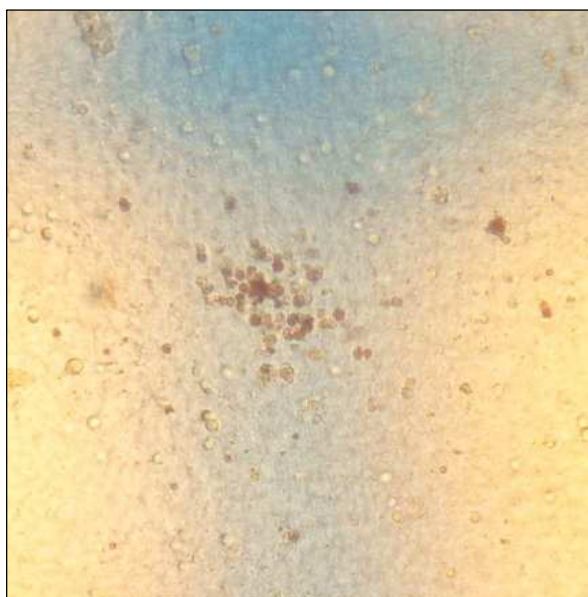


Figura 12. Una colonia UFC-GEMM mixta con agrupaciones eritroides, granulocitos y macrófagos reconocibles. 125X. ITCR, 2008.



Figura 13. Dos colonias de UFC-GEMM . La colonia contiene células eritroides rojizas y células de al menos otros 2 linajes. 25X. ITCR, 2008.

DISCUSIÓN

AUTORIZACIÓN DEL COIBI-CCSS

Cualquier investigación biomédica de carácter observacional (no intervencional) que cuente con patrocinio externo, debe ser aprobada por el director ejecutivo del CENDEISS-CCSS, previa evaluación y recomendación del COIBI-CCSS.

Esta autorización es necesaria para desarrollar cualquier investigación en la CCSS, debido a que se evalúa, entre otros aspectos, el respeto de los principios éticos de la investigación, el interés científico y la relevancia del estudio, la competencia técnica de los investigadores y los beneficios para el paciente, la Caja y el país (CENDEISS, 2005). Además, la CCSS se asegura de que el investigador principal asuma la responsabilidad de asegurar que el proyecto cumplirá con todos los requisitos y procedimientos establecidos en el Reglamento para la Investigación Biomédica en los Servicios Asistenciales de la Caja Costarricense de Seguro Social (CENDEISS, 2005).

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS CELULARES

La cantidad de muestras procesadas y las fuentes utilizadas permitieron la estandarización de los protocolos de obtención, anticoagulación, traslado y descongelación de las muestras de médula ósea y sangre periférica, así como del protocolo de aislamiento de células mononucleares.

Las especificaciones en cuanto a la colecta de las muestras permitieron establecer los procedimientos a seguir por el personal médico encargado de la recolección de sangre periférica y médula ósea. Las normativas de la CCSS y de otras instituciones como el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica de México (InDRE, 2008) y el Instituto Nacional de Estándares y Control Biológico del Reino Unido (UKTSSA/NIBSC, 1993) detallan que debe ser el hematólogo tratante el encargado de la aspiración de médula ósea y de efectuar la leucoféresis siempre que sea necesario la toma de estas muestras.

Los resultados sobre las disposiciones planteadas para el procesamiento de las muestras indican que este debe ser realizado por personal capacitado en técnicas de laboratorio, debido a que es necesario contar con experiencia en el manejo de técnica aséptica en cámara de flujo laminar, en el establecimiento de cultivos celulares y en la identificación de progenitores hematopoyéticos, entre otros. StemCell Technologies (2004) recomienda que el personal encargado de efectuar la identificación y cuantificación de UFC esté capacitado en el reconocimiento de progenitores mieloides y eritroides, realice periódicamente conteos comparativos con sus compañeros de trabajo y que utilice otras ayudas como el Atlas de Colonias Hematopoyéticas (#28700, StemCell Technologies) para que los conteos realizados sean precisos y reproducibles.

El uso de anticoagulantes durante la colecta es fundamental para el posterior procesamiento de las muestras, pues estos permiten una colecta adecuada del material, al evitar la formación de coágulos que dificulten el recuento celular y el aislamiento de las células mononucleares. El Consejo Internacional de Normalización en Hematología (ICSH, 2003) recomienda el uso de la solución de sales sódicas y potásicas del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante para recolectar muestras sanguíneas destinadas a recuentos celulares y otros procesamientos; por otro lado, StemCell Technologies (2004) y InDRE (2008) recomiendan el uso de heparina para la colecta rutinaria de muestras de médula ósea, y sangre periférica a utilizar en investigación y de ACD-A (solución de ácido cítrico, dextrosa y citrato de sodio) para la colecta de muestras de sangre periférica movilizada y médula ósea destinadas a la criopreservación.

Los resultados del establecimiento de los parámetros de traslado del material colectado indican que lo ideal es efectuar el traslado de las muestras el mismo día de su colecta y a temperatura ambiente, con la finalidad de mantener una óptima conservación que permita una buena recuperación de células progenitoras y una alta viabilidad celular. Los procedimientos proporcionados por el InDRE (2008)

recomiendan enviar las muestras a temperatura ambiente al laboratorio donde van a ser procesadas en las primeras 24hrs posteriores a la colecta. Por otro lado, StemCell Technologies (2004) recomienda que sólo en caso de ser necesario, las muestras pueden almacenarse en refrigeración a 2-8°C hasta que sea posible efectuar su procesamiento. Estudios efectuados por Callejas y González (1995) para evaluar la recuperación de CMN y UFC-GM en muestras de médula ósea conservadas a 4°C, comprobaron que se da una progresiva disminución del número de células en el tiempo, con una alta recuperación de CMN y UFC-GM sólo en las primeras 72 horas de almacenamiento y que las células recuperadas alcanzaron un alto porcentaje de viabilidad celular durante todo el tiempo de conservación.

El protocolo utilizado para el aislamiento de CMN por gradiente de densidad con Histopaque-1077 permitió obtener una suspensión celular de células mononucleadas adecuada para realizar los ensayos de UFC, debido a que durante el centrifugado a temperatura ambiente los eritrocitos y granulocitos se sedimentaron y las células mononucleadas permanecieron en la zona entre el plasma y el histopaque; y a que la mayor parte de las plaquetas se extrajeron durante las centrifugaciones de los pasos de lavado. Sigma-Aldrich (2003) y Amersham Biosciences (2001) confirman que los progenitores hematopoyéticos están presentes en la fracción de células mononucleadas de la sangre y que su aislamiento por gradiente de densidad enriquece las células mononucleadas y elimina eritrocitos y neutrófilos maduros, plaquetas y otras células no viables. Por otro lado, StemCell Technologies (2004) recomienda el aislamiento de células mononucleares por gradiente de densidad pues además de enriquecer las muestras con progenitores hematopoyéticos, esta metodología permite disminuir las células rojas sanguíneas maduras y los precursores eritroides nucleados que puedan ensombrecer las colonias y causar conteos inexactos; y eliminar células productoras de factores que puedan aumentar o inhibir el crecimiento de las UFC (por ejemplo macrófagos que produzcan IL-6 y TNF-alpha).

Este estudio expuso que con el protocolo utilizado para el aislamiento de las CMN se da una disminución en el porcentaje de viabilidad de las células aisladas, lo cual puede deberse a los pasos de separación, centrifugación y lavado a los que se ven sometidas las células durante el aislamiento. Sin embargo, en el manual técnico de StemCell Technologies (2004) se especifica que es normal observar una pérdida de CMN y de viabilidad celular al efectuar cualquier aislamiento.

Los resultados obtenidos confirmaron que el volumen de muestra procesado durante el aislamiento, independientemente del tipo de muestra, proporciona una concentración de células mononucleares adecuada para efectuar el ensayo de UFC, pues en todos los casos, el total de UFC/ μ l obtenido después del aislamiento fue mayor al necesario para alcanzar la concentración 10X a preparar para efectuar el ensayo. Así, a pesar de que StemCell Technologies (2004) indica el uso de al menos 5,0 ml de muestra para efectuar el aislamiento de CMN por gradiente de densidad, se comprobó que con una cantidad de muestra mucho menor, se obtienen los mismos resultados.

ENSAYO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

La estandarización del ensayo de unidades formadoras de colonias permitió comprobar que las diluciones efectuadas para alcanzar la concentración de plaqueo requerida fueron apropiadas, debido a que el número resultante de colonias por placa de cultivo permitió efectuar una adecuada cuantificación de las mismas. Según StemCell Technologies (2004), uno de los principales factores a considerar para efectuar los ensayos de UFC es el de plaquear una concentración de células que produzca de 25 a 150 colonias por cada placa de cultivo, debido a que la presencia de muy pocas colonias puede proporcionar datos estadísticos inexactos; mientras que muchas colonias causan errores de conteo por la dificultad de identificar colonias individuales, por cambios en el pH causados por la acumulación de productos

metabólicos celulares y porque se inhibe la proliferación de progenitores por la eliminación de nutrientes esenciales.

Los resultados obtenidos durante la cuantificación de UFC que dieron un número de colonias muy bajo o nulo, pudieron deberse al estado del paciente, a una pérdida de viabilidad celular debida al procesamiento de las muestras, a errores en los cálculos de las diluciones, a inadecuadas condiciones de cultivo, a contaminación por bacterias, levaduras o hongos, e incluso a la inexperiencia en la ejecución del ensayo de UFC y en la cuantificación de los progenitores. StemCell Technologies (2004) señala además que en muestras de pacientes con enfermedades hematológicas y en muestras colectadas con instrumentos de recolección es difícil anticipar la correcta concentración celular del plaqueo, lo que da como resultado una inadecuada relación entre la dosis de células aportadas y el número resultante de colonias obtenidas

Los medios de cultivo y otros materiales utilizados en la estandarización del protocolo de ensayo de UFC favorecieron la obtención de los progenitores hematopoyéticos esperados, pues se observó crecimiento de unidades formadoras de colonias granulocito-eritroides-macrófagos-megacariocitos (UFC-GEMM), unidades formadoras de colonias granulocito-macrófago (UFC-GM), unidades formadoras de brotes eritroides (UFB-E) y unidades formadoras de colonias eritroides (UFC-E) en la mayoría de las placas cultivadas. StemCell Technologies (2004) confirma que las citoquinas recombinantes presentes en el medio MethoCult® propician el crecimiento de progenitores multipotenciales, eritroides, granulocíticos y monocíticos.

En ninguno de los cultivos realizados durante este ensayo se observaron UFC adheridas a las paredes de las placas de cultivo, debido a que se utilizaron placas de cultivo pre-tratadas para asegurar baja adherencia celular. De acuerdo con información proporcionada por Cultek (2006) y StemCell Technologies (2004), estas placas de cultivo fabricadas a partir de poliestireno de alta calidad óptica requieren de un tratamiento para producir una superficie que disminuya la posibilidad de fijación de las células y que promueva un crecimiento de colonias óptimo, al evitar la adherencia de células estromales de médula ósea, fibroblastos y monocitos, que

inhiben el crecimiento de progenitores y dificultan el conteo y la diferenciación de las UFC presentes.

La contaminación de algunas de las muestras procesadas influyó de manera negativa en la cantidad de datos analizados, pues no fue posible realizar la cuantificación de las UFC en una cantidad importante de muestras de médula ósea y de sangre periférica. Esta contaminación se debió al uso de material no estéril durante el procesamiento de las muestras, por lo que al observarse crecimiento de colonias bacterianas las mismas debieron desecharse. Algunas de las medidas que recomienda StemCell Technologies (2004) para evitar la contaminación de los cultivos de UFC son utilizar materiales y reactivos estériles, cabinas de flujo laminar certificadas y buena técnica aséptica; adicionar al medio de cultivo antibióticos como penicilina (100U/ml) y estreptomycin (100µg/ml) y agentes antifúngicos como anfotericina-B; y agregar aditivos (cristales de sulfato de cobre) al agua de la incubadora para inhibir el crecimiento microbiano y utilizar CO₂ de grado médico para evitar la inhibición del crecimiento de UFC por sustancias tóxicas presentes en la fuente de CO₂.

Las fotografías y descripciones de las colonias obtenidas con el ensayo de UFC permitieron observar y comparar estas colonias con fotos y literatura de referencia, por lo que fue posible realizar la identificación de las colonias y efectuar los recuentos de las distintas UFC. Los protocolos de StemCell Technologies (2004) y R&D Systems (2008) basan el reconocimiento y la cuantificación de los progenitores humanos hematopoyéticos en características propias de cada progenitor como la morfología, tamaño, forma y coloración de las células observadas, la formación de agrupaciones solas o múltiples y los tipos celulares presentes en cada agrupación.

Con la finalidad de dar un mayor soporte a la estandarización de este protocolo es necesario continuar con la realización de estos ensayos e implementar un control de calidad que garantice la exactitud y precisión de los resultados obtenidos en los conteos de UFC.

CONCLUSIONES

- Se promovió la cooperación científica y tecnológica entre la Caja Costarricense de Seguro Social y el Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- El uso de anticoagulantes durante la colecta es fundamental, pues estos evitan la formación de coágulos que dificultan el recuento celular y el aislamiento de las CMN.
- El traslado de las muestras debe efectuarse el mismo día de su colecta y a temperatura ambiente, con el fin de alcanzar una buena recuperación de células progenitoras y una alta viabilidad celular.
- El protocolo utilizado para el aislamiento de CMN por gradiente de densidad con Histopaque-1077 permite la obtención de una suspensión celular de células mononucleadas adecuada para realizar los ensayos de UFC.
- Un volumen de muestra inicial de $1,0 \pm 0,5$ ml proporciona una concentración de células mononucleares adecuada para efectuar el ensayo de UFC.
- Las fotografías y descripciones de las colonias obtenidas con el ensayo de UFC facilitan la identificación y el recuento de las distintas colonias.
- Se debe continuar con la realización de este ensayo e implementar un control de calidad que garantice la exactitud y precisión de los resultados obtenidos.

RECOMENDACIONES

- Para futuras prácticas de especialidad en el área de Biotecnología médica se recomienda iniciar los trámites en CENDEISSS-CCSS para la aprobación del proyecto al menos 6 meses antes de la fecha de inicio prevista.
- Al efectuar los conteos de UFC se recomienda primero observar el fondo de la placa para determinar presencia/ausencia de otras células/desechos, morfología general, salud de las colonias. Además, durante la enumeración es mejor mover la placa arriba y abajo para contar todas las colonias en cada columna, en lugar de a través de la placa, para evitar mareos.
- En caso de contaminación se pueden adicionar al medio MethoCult antibióticos, drogas u otros componentes antes de la adición de las células, siempre que se agreguen todos los componentes en volúmenes que mantengan la correcta viscosidad del medio MethoCult (ratio 1:10 v/v).
- Se recomienda efectuar una capacitación o entrenamiento antes de realizar ensayos de UFC con el fin de incrementar los conocimientos y la eficiencia en desarrollar estos ensayos y de lograr la identificación de los diferentes progenitores hematopoyéticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Amersham Biosciences. 2001. Ficoll-paque Plus: For *in vitro* isolation of lymphocytes. <<http://fachschaft.biochemtech.uni-halle.de/downloads/chromatography/ficoll.pdf>> (16/04/2008).
- Armitage J.O. 1994. Medical progress: bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 330: 827-838.
- Asakura A., Seale P., Girgis-Gabardo A. y Rudnicki M.A. 2002. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 159:123-134
- Bøyum A. 1968. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 21: 77.
- Callejas JL y González AI. 1995. Conservación de medula ósea humana a 4°C. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 11 (1).
- CENDEISS. 2005. Reglamento para la Investigación Biomédica en los Servicios Asistenciales de la Caja Costarricense de Seguro Social. <<http://www.cendeiss.sa.cr/etica/reglamentobiomedica.pdf>> (01/12/2008).
- Civin C.I. y Gore S.D. 1993. Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J Hematother* 2: 137-144
- Cottler-Fox M.H., Lapidot T, Petit I, Kollet O, DiPersio J.F., Link D y Devine S. 2003. Stem Cell Mobilization. *Hematology*: 419-437.
- Cultek. 2006. Productos. <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-Cultivos_celulares-productos.pdf> (21/01/2009).
- García J. 2003. Fisiología de la Hematopoyesis. Hepatología. Ed Aván. España. pp 39-46.
- Grant M.B., May W.S., Caballero S., Brown G.A., Guthrie S.M. y Mames R.N. 2002. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 8:607-612.

- Harada M. 1996. Peripheral Blood Stem Cell Transplantation. *Internal Medicine* 35(1):75-77.
- Hoffman R., Benz E.J., Shattil S.J., Furie B., Cohen H.J. y Silberstein L.E. 2000. Stem cell model of hematopoiesis. *Hematology: Basic principles and practice*. Philadelphia, EE.UU: Churchill Livingstone. p 126-138.
- Horwitz E. 2003. Stem Cell Plasticity: The growing Potential of Cellular Therapy. *Arch Med Res* 34:600-606.
- ICSH. 2003. Recommendations for “Surrogate Reference” Method for the Packed Cell Volume <<http://static.cjp.com/gems/labdev/restrict/LH.9.1.1.pdf>> (21/101/2009).
- InDRE. 2008. Procedimientos Básicos en la Toma de Muestras Biológicas para Diagnóstico <http://www.cenavece.salud.gob.mx/indre/descargas/pdf/procedimientos_basicos_en_la_toma_de_muestras_finales.pdf> (08/01/2009).
- Ivanova N., Dimos J.T., Schaniel C., Hackney J.A., Moore K.A. y Lemischka I.R. 2002. A stem cell molecular signature. *Science* 298:601-4.
- Jackson K.A., Majka S.M., Wang H., Pocius J., Hartley C.J. y Majesky M.W. 2001. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107:1395-1402.
- Jiang Y., Vaessen B., Lenvik T., Blackstad M., Reyes M. y Verfaillie C.M. 2002. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 30: 896-904.
- Katayama Y., Yano T., Bessho A., Deguchi S., Sunami K., Mahmut N., Shinagawa K., Omoto E., Makino S., Miyamoto T., Mizuno S., Fukuda T., Eto T., Fujisaki T., Ohno Y., Inaba S., Niho Y. y Harada M.. 1997. The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplantation* 19, 283–287.

- Koc O.N. y Lazarus H.M. 2001. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant* 27:235-239.
- Kudo Y., Minegishi M., Itoh T., Miura J., Saito N., Takahashi H., Suzuki A., Narita A., Sato Y., Kameoka J., Imaizumi M., Sato M., Murakawa Y. y Tsuchita S. 2005. Evaluation of Hematological Reconstitution Potencial of Autologous Peripheral Blood Progenitor Cells Cryopreserved by a Simple Controlled-Rate Freezing Method. *Tohoku J. Exp. Med.* 205: 37-43.
- Lu L., Xiao M. y Shen R.N. 1993. Enrichment, characterization and responsiveness of single primitive CD34+ human umbilical cord blood hematopoietic progenitors with high proliferative and replating potential. *Blood* 81:41-48.
- Marone M., De Ritis D., Bonanno G., Mozzetti S., Rutella S. y Scambia G. 2002. Cell Cycle Regulation in Human Hematopoietic Stem Cells: From Isolation to Activation. *Leuk Lymphoma* 43:493-501.
- Mayani H., Flores E., Pelayo R., Montesinos J.J., Flores P. y Chávez A. 2007. Hematopoyesis. *Cancerología* 2: 95-107.
- Mayani H., Gutiérrez-Rodríguez M. y Espinoza. 1998. Kinetics of hematopoiesis in Dexter-type long-term cultures established from human umbilical cord blood cells. *Stem Cells* 16:127-135.
- Migliaccio A.R., Adamson J.W., Stevens C.E., Dobrila N.L., Carrier C.M. y Rubinstein P. 2000. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood* 96: 2717-2722.
- National Cancer Institute. 2005. El trasplante de médula ósea y el trasplante de células madre de sangre periférica: preguntas y respuestas. <http://www.cancer.gov/PDF/FactSheet/fs7_41s.pdf> (08/08/2008).
- Niesler C. 2004. Old dogmas and new hearts: a role for adult stem cells in cardiac repair? *Cardiovasc J S Afr* 15:184-189.

- Martí F., Piñol G. y Rueda F. 1988. Método para la obtención de células mononucleadas significativamente libres de plaquetas. *Biol Clin Hematol* 10:149-153.
- Mayani H. y Lansdorp P.M. 1998. Biology of Human Umbilical Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells* 16:153-165
- Mimeault M. y Batra S. 2006. Concise Review: Recent Advances on the Significance of Stem Cells in Tissue Regeneration and Cancer Therapies. *StemCells* 24:2319-2345.
- Mera C., Roa A. y Ramírez S. 2007. Células madre hematopoyéticas, generalidades y vías implicadas en sus mecanismos de auto-renovación. *Rev Cienc Salud. Bogotá* 5(1):67-89.
- Panoskaltis N., Mantalaris A. y Wu D. 2005. Engineering a mimicry of bone marrow tissue ex vivo. *J. Biosci. Bioeng* 100: 28-35.
- Pettengell R., Luft T. y Henschler R. 1994. Direct comparison by limiting dilution analysis of long-term culture-initiating cells in human bone marrow, umbilical cord blood and blood stem cells. *Blood* 84:3653-3659.
- Piacibello W., Sanavio F., Garetto L., Severino A., Bergandi D. y Ferrario J. 1997. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood* 89:2644-53.
- Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R. y Mosca J.D. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
- Prósper F. y Verfaillie C.M. 2003. Células Madre Adultas. *Anales* 26(3):339-480.
- Quesenberry P.J., Crittenden R.B., Lowry P., Kittler E.W., Rao S., Peters S. 1994. *In vitro* and *in vivo* studies of stromal niches. *Blood Cells* 2:97-104.
- R&D Systems. 2008. Procedure for the Human Colony Forming Cell (CFC) Assay Using Methylcellulose-based Media.

- <http://www.rndsystems.com/stem_cell_protocol_detail_objectname_CFC.aspx> (05/02/2008).
- Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F. y Weissman I.L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105-11.
- Rodríguez V.M., Cuéllar A., Cuspoca L.M., Contreras C.L., Mercado M. y Gómez A. 2006. Determinación fenotípica de subpoblaciones de células madre derivadas de sangre de cordón umbilical. *Biomédica* 26:51-60
- Rubinstein P. y Stevens C.E. 2000. Placental blood for bone marrow replacement: the New York Blood Center's program and clinical results. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 13:565-84.
- Schmidt N.J. 1979. Cell culture techniques for diagnostic virology. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. Washington; American Public Health Association. pp 65-139.
- Shizuru J., Negrin R., Weissman I.L. 2005. Hematopoietic stem and progenitor cells: Clinical and Preclinical Regeneration of the Hematolymphoid System. *Annu Rev Med* 56:509-38
- Sigma-Aldrich. 2003. Histopaque-1077: Procedimiento número 1077. <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/general%20information/insert_es_1077.pdf> (14/04/2008).
- StemCell Technologies. 2004. Technical Manual: Human Colony-Forming Cell Assays Using MethoCult®. Catalog #28404, version 3.0.
- UKTSSA/NIBSC. 1993. Promoting the safety of Transplantation of Human Tissues and Organs. Committee on Microbiological Safety of Blood and Tissues. Department of Health, London, (in press).
- Verfaillie C., Blakolmer K. y McGlave P. 1990. Purified primitive human hematopoietic progenitor cells with long-term in vitro repopulating capacity adhere selectively to irradiated bone marrow stroma. *J Exp Med* 172:509-517.

- Weissman I.L., Anderson D.J. y Gage F. 2001. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:387-403.
- Wognum A., Eaves A.C. y Thomas T.E. 2003. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* 34: 461-475
- Young P.E., Baumhueter S. y Lasky L.A. 1995. The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development. *Blood* 85: 96-105.
- Young-Jin K. Culture of Umbilical Cord- and Cord Blood-Derived Stem Cells. Culture of Human Stem Cells. RI Freshney, GN Stacey y JM Auerbach. 2007. pp159-186.

ANEXOS

ANEXO 1. DECLARACIÓN JURADA DE FUENTES DE FINANCIAMIENTO

LIC. RONNY JIMENEZ PORRAS

Tel: 771-3912

Cel: 388-6778

San Isidro de Pérez Zeledón, segunda planta del Banco BAC San José.

e-mail: rojip55@hotmail.com

DECLARACION JURADA

NUMERO CIENTO VEINTIUNO - DIEZ: Ante mí RONNY JIMENEZ PORRAS, Notario Público de Pérez Zeledón, comparece **Stephanie Alvarado Valverde**, mayor de edad, soltera, costarricense, estudiante, cédula de identidad número uno - mil doscientos sesenta y nueve - seiscientos nueve; y vecina de Barrio San Rafael de Pérez Zeledón, Provincia de San José, exactamente cincuenta metros al sur de la pulpería la California; quien es previamente advertida por el suscrito notario acerca de las consecuencias legales y de las penas con que la ley costarricense castiga el delito de falso testimonio; en este acto viene a manifestar: QUE DECLARA BAJO LA FE DE JURAMENTO: A efectos de cumplir con lo establecido en el inciso cuatro, del artículo dieciséis del "Reglamento para la Investigación Biomédica en los Servicios Asistenciales de la Caja Costarricense de Seguro Social", que se refiere a las fuentes de financiamiento de la investigación; por lo que manifiesta lo siguiente: Que la fuente de financiamiento de la propuesta de investigación Evaluación del potencial de diferenciación y proliferación de progenitores humanos hematopoyéticos a partir de muestras de sangre periférica, sangre de cordón umbilical y médula ósea mediante ensayos de unidades formadoras de colonias es la siguiente: Que el costo de su práctica profesional Universitaria la asumirá la empresa Sinertec Costa Rica Internacional Ltda, cédula jurídica número tres - ciento dos - trescientos cinco mil ochocientos setenta y cuatro; cuyo representante legal y judicial es el señor Rodolfo Gerardo Alvarado Coto, cédula de identidad número tres - trescientos cincuenta y tres - setecientos quince; en calidad de apoderado generalísimo sin límite de suma. Continúa manifestando además la declarante bajo la fe de juramento que durante todo el periodo de su práctica profesional no recibirá retribución económica; y que no posee vínculos familiares de ningún tipo con funcionarios de



1 1 0 5 5 7 4 1

11198"11563987

dicha empresa. **Es todo.** Leo lo escrito la compareciente lo aprueba y firmamos en San Isidro de Pérez Zeledón, al ser las doce horas del día tres de marzo del dos mil ocho.--(Fs).--Ilegible.--Notario Ilegible.--

LO ANTERIOR ES COPIA FIEL DE LA ESCRITURA NÚMERO CIENTO VEINTIUNO VISIBLE AL FOLIO CIENTO DIECISIETE VUELTO DEL TOMO DIEZ DE MI PROTOCOLO. CONFRONTADO CON SU ORIGINAL RESULTÓ CONFORME Y LO EXPIDO COMO UN PRIMER TESTIMONIO EN EL MISMO ACTO DEL OTORGAMIENTO DE LA ESCRITURA MATRIZ. -----

LIC. RONNY JIMENEZ PORRAS.

Lic. Ronny Jiménez Porras
Abogado y Notario
San Isidro, P.Z.

ANEXO 2. CERTIFICADO DE RECOMENDACIÓN #018-2008



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeisss.sa.cr

COIBI
COMITÉ INSTITUCIONAL DE
BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN

**CERTIFICADO DE APROBACIÓN
COMITÉ INSTITUCIONAL DE BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN
CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL**

CERTIFICADO # 018-2008

Número de protocolo asignado: R08-SABI-00024

Título del estudio: Estandarización del protocolo de ensayo de unidades formadoras de colonias de células progenitoras hematopoyéticas a partir de células mononucleadas de sangre periférica, sangre de cordón umbilical y médula ósea

Nombre del investigador principal: Estudiante Stephanie Alvarado Valverde

Nombre de los sub-investigadores: Dr. Luis Arturo Cordero Soto
Dra. Berta Eugenia Valverde Rojas

Nombre del patrocinador: No aplica

Nombre del CRO (si procede): No aplica

Número de sesión en que se aprobó la última versión del protocolo: 14-08-2008

Fecha de sesión en que se aprobó la última versión del protocolo: 14/08/2008

Última versión del formulario AP-III/AP-IIIA recomendado: 21/07/2008

Última versión del consentimiento informado recomendado: No aplica

Número de sesión en que se aprobó la última versión del consentimiento informado: No aplica

Fecha de sesión en que se aprobó la última versión del consentimiento informado: No aplica

Duración del estudio (en meses): Doce meses

Número de participantes propuesto: Cincuenta (50)

Nombre de centro(s) asistencial(es) donde se realizará la investigación: Hospital San Juan de Dios
Hospital Nacional de Niños
Instituto Tecnológico de Costa Rica

Informe de avance: El investigador principal deberá someter un informe de avance cada 3 meses para la revisión correspondiente por parte del COIBI-
Fecha de presentación próximo informe: 03/10/2008



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
 Centro de Desarrollo Estratégico e Información
 en Salud y Seguridad Social
 Área de Bioética
 Subárea de Bioética en Investigación
 Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeiss.sa.cr



CCSS. Estos informes deberán ser presentados los primeros viernes de los meses de enero, abril, julio y octubre.

La fecha de inicio del estudio queda supeditada a la suscripción del contrato entre el patrocinador y la Caja Costarricense de Seguro Social, así como al refrendo de la Contraloría General de la República en los casos que lo ameriten.

- | | |
|--|--|
| Nombre de los miembros del COIBI-CCSS que participaron en el análisis de este estudio: | 1. Dr. Alberto Barrantes Boulanger |
| | 2. Dra. María Gabriela Chavarría Fonseca |
| | 3. Licda. Martha Esquivel Rodríguez |
| | 4. Lic. Carlos González Arroyo |
| | 5. Dra. Diana Mosheim Castro |
| | 6. Dr. Carlos Sancho Rojas |
| | 7. Licda. Maricel Zamora Salas |

Esta recomendación es válida hasta 14/08/2009


 Dr. Alberto Barrantes Boulanger
 Presidente COIBI-CCSS

Fecha 20 / 08 / 2008

 COIBI
 COMITÉ INSTITUCIONAL DE
 BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN


 Dr. Ignacio Salom Echeverría
 Director Ejecutivo CENDEISS



Fecha 20 / 08 / 2008

ANEXO 3. CERTIFICADO DE RECOMENDACIÓN #020-2008



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeiss.sa.cr



**CERTIFICADO DE APROBACIÓN
COMITÉ INSTITUCIONAL DE BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN
CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL**

CERTIFICADO # 020-2008

Número de protocolo asignado:	R08-SABI-00024
Título del estudio:	Estandarización del protocolo de ensayo de unidades formadoras de colonias de células progenitoras hematopoyéticas a partir de células mononucleadas de sangre periférica, sangre de cordón umbilical y médula ósea
Nombre del investigador principal:	Estudiante Stephanie Alvarado Valverde
Nombre de los sub-investigadores:	Dr. Luis Arturo Cordero Soto Dra. Berta Eugenia Valverde Rojas
Nombre del patrocinador:	No aplica
Nombre del CRO (si procede):	No aplica
Número de sesión en que se aprobó la última versión del protocolo:	020-11-2008
Fecha de sesión en que se aprobó la última versión del protocolo:	13/11/2008
Última versión del formulario AP-III/AP-IIIA recomendado:	06/10/2008
Última versión del consentimiento informado recomendado:	No aplica
Número de sesión en que se aprobó la última versión del consentimiento informado:	No aplica
Fecha de sesión en que se aprobó la última versión del consentimiento informado:	No aplica
Duración del estudio (en meses):	Doce meses
Número de participantes propuesto:	Cincuenta (50)
Nombre de centro(s) asistencial(es) donde se realizará la investigación:	Hospital San Juan de Dios Hospital Nacional de Niños Instituto Tecnológico de Costa Rica
Informe de avance: El investigador principal deberá someter un informe de avance cada 3 meses para la revisión correspondiente por parte del COIBI-	Fecha de presentación próximo informe: 02/01/2009



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeisss.sa.cr

COIBI
 COMITÉ INSTITUCIONAL DE
 BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN

CCSS. Estos informes deberán ser presentados los primeros viernes de los meses de enero, abril, julio y octubre.

La fecha de inicio del estudio queda supeditada a la suscripción del contrato entre el patrocinador y la Caja Costarricense de Seguro Social, así como al refrendo de la Contraloría General de la República en los casos que lo ameriten.

Nombre de los miembros del COIBI-CCSS que participaron en el análisis de este estudio:	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dr. Alberto Barrantes Boulanger 2. Dra. María Gabriela Chavarría Fonseca 3. Licda. Martha Esquivel Rodríguez 4. Lic. Carlos González Arroyo 5. Dra. Diana Mosheim Castro 6. Dr. Carlos Sancho Rojas 7. Licda. Maricel Zamora Salas
--	---

Esta recomendación es válida hasta 14/08/2009

Dr. Alberto Barrantes Boulanger
Presidente COIBI-CCSS

Fecha 25/11/2008



Dr. Ignacio Salom Echeverría
Director Ejecutivo CENDEISS

Fecha 01/12/2008



APÉNDICES

APÉNDICE 1. FORMULARIO AP-I SOLICITUD DE REVISIÓN DE PROTOCOLO



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506)519-3044
www.cendeisss.sa.cr

Para uso administrativo

FORMULARIO AP-I
SOLICITUD DE REVISIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

Título del proyecto: Estandarización del protocolo de ensayo de unidades formadoras de colonias de células progenitoras hematopoyéticas a partir de células mononucleadas de sangre periférica, sangre de cordón umbilical y médula ósea.	
Número de protocolo del patrocinador:	Última versión del protocolo:
Nombre del investigador principal: Stephanie Alvarado Valverde	Grado académico: Bachillerato. Estudiante de Ingeniería en Biotecnología
Número de cédula: 1-1269-0609	Número de investigaciones dirigidas: 0
Lugar de Trabajo: Instituto Tecnológico de Costa Rica	
Dirección:	Residencial Estancia Antigua. La Unión de Tres Ríos, Cartago.
Teléfono: 8391-5574	Correo electrónico: alvarado.stephanie@gmail.com
Fax: 2550-2700 / 2771-4225	Beeper: NA
Nombre del sub-investigador: Luis Arturo Cordero Soto	Grado académico: Microbiólogo y Químico Clínico, Especialista en Hematología.
Lugar de trabajo: Hospital San Juan de Dios	
Dirección:	San Rafael, Moravia, San José.
Teléfono: 8836-6090	Correo electrónico: montura5@hotmail.com
Fax: 2257-6282 ext 3035	Beeper: NA
Nombre del sub-investigador: Berta Eugenia Valverde Rojas	Grado académico: Microbiólogo y Químico Clínico, Especialista en Hematología.
Lugar de trabajo: Hospital Nacional de Niños	
Dirección:	100N y 250E Colegio Salesiano Don Bosco. La Granja, San Pedro de Montes de Oca.
Teléfono: 8821-7620	Correo electrónico: luismorab@yahoo.com
Fax: 2222-4779	Beeper: NA

INICIALES IP _____



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506)519-3044
www.cendeiss.sa.cr

Fuente de financiamiento:		
<input type="checkbox"/> CCSS	<input checked="" type="checkbox"/> Externa	<input type="checkbox"/> Múltiples fuentes de financiamientos
<input type="checkbox"/> Otras (especifique):		
Propuesta (marque todas las opciones que sean necesarias):		
<input checked="" type="checkbox"/> Propuesta nueva	<input type="checkbox"/> Renovación/Continuación	<input checked="" type="checkbox"/> Propuesta de formación académica
Tipo de Investigación (marque todas las opciones que sean necesarias):		
<input type="checkbox"/> Reporte de casos	<input type="checkbox"/> Intervencional (drogas / medicamentos)	
<input type="checkbox"/> Serie de casos	<input type="checkbox"/> Intervencional (dispositivos)	
<input type="checkbox"/> Observacional descriptivo de registros médicos	<input type="checkbox"/> Investigación genética	
<input type="checkbox"/> Observacional analítico de casos y controles	<input type="checkbox"/> Estudio de campo basado en la población	
<input type="checkbox"/> Observacional analítico de cohorte	<input checked="" type="checkbox"/> Comparativo para técnicas de laboratorio	
Centro(s) de identificación y seguimiento de los participantes de investigación:		
Nombre del centro de identificación Hospital San Juan de Dios	Nombre del centro que realizará el seguimiento Hospital San Juan de Dios	
Acuerdo de participación (marque todas las opciones que sean necesarias):		
Consentimiento informado: <input type="checkbox"/> Sí <input checked="" type="checkbox"/> No	Consentimiento informado en población vulnerable: <input type="checkbox"/> Permiso representante legal <input type="checkbox"/> Asentamiento del menor, si es ≥ 12 años	<input type="checkbox"/> Excepción para la utilización del consentimiento informado (Ver excepciones para la utilización del consentimiento informado)
Población del estudio (marque todas las opciones que sean necesarias):		
<input type="checkbox"/> Menores de 1 año	<input type="checkbox"/> Extranjeros	
<input checked="" type="checkbox"/> Menores de 18 años	<input type="checkbox"/> Prisioneros	
<input checked="" type="checkbox"/> Adultos	<input type="checkbox"/> Enfermos terminales	
<input type="checkbox"/> Adulto mayor (65 años o más)	<input type="checkbox"/> Autonomía disminuída	
<input type="checkbox"/> Sanos	<input type="checkbox"/> Comatosos	
<input type="checkbox"/> Embarazadas	<input type="checkbox"/> Especímenes patológicos	

INICIALES IP _____



DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL Y FIRMAS

Los firmantes indican lo siguiente: Que entienden y aceptan las siguientes obligaciones y que buscan proteger los derechos y el bienestar de los participantes en este estudio. Asimismo, declaran bajo la gravedad del juramento, que la información consignada en el presente formulario es cierta.

1. Como investigador principal reconozco que es mi responsabilidad asegurar todas las acciones del personal que participe en el proyecto cumplirán con los requerimientos y políticas establecidas en el **Reglamento para la Investigación Biomédica en los Servicios Asistenciales de la Caja Costarricense de Seguro Social**.
2. Reconozco como principios generales que regirán la investigación: el respeto a la dignidad de las personas, la beneficencia, la no-maleficencia, la autonomía y la justicia distributiva, según lo establecido en la normativa nacional e internacional aplicable a la bioética en la investigación.
3. Reconozco que es mi responsabilidad asegurar que se obtenga un consentimiento informado válido de cada uno de los participantes en el estudio o de su respectivo representante legal. Además, verificaré que todo el personal que participe en el proceso de obtención del consentimiento reciba el entrenamiento adecuado y tenga conocimiento explícito de sus responsabilidades para la obtención del consentimiento, siguiendo las guías de la Subárea de Bioética en Investigación del CENDEISSS, apegadas a la legislación existente. Utilizaré el documento de consentimiento informado debidamente autorizado por el Comité Local de Bioética en Investigación (CLOBI) o del Comité Institucional de Bioética en Investigación (COIBI), según sea el caso, con su respectivo sello.
4. Informaré a la Subárea de Bioética en Investigación del CENDEISSS cualquier efecto adverso serio esperado o inesperado o cualquier lesión al participante, a más tardar dos (2) días hábiles después de ocurrido el evento.
5. No se implementará ningún cambio en el protocolo sin la debida autorización del CLOBI o del COIBI, según sea el caso, excepto cuando se trate de reducir o eliminar el riesgo inmediato, caso en el cual la Subárea de Bioética en Investigación será informada inmediatamente.
6. Mantendré todos los registros correspondientes a la investigación por un plazo mínimo de 10 años; y reconozco que la Subárea de Bioética en Investigación está autorizada para inspeccionar estos registros.
7. Informaré a la Subárea de Bioética en Investigación CENDEISSS acerca de cualquier cambio en la relación riesgo/beneficio de la investigación presentada originalmente en el protocolo aprobado por COIBI-CCSS.
8. Durante la investigación deberé apegarme a los siguientes requisitos:
 - a. No obstaculización del normal desarrollo de los servicios de la CCSS.

Nombre Director Médico _____ Cédula _____ Firma _____ Fecha _____

INICIALES IP _____



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506)519-3044
www.cendeiss.sa.cr

- b. Transparencia absoluta del proceso que, entre otras consecuencias, implica la obligación de dejar en el expediente de salud del participante, copia del consentimiento informado y constancia de cada intervención que se le realice (procedimientos, exámenes de laboratorio y gabinete, entre otros).
 - c. Impedimento de remunerar, por parte de terceros, a servidores de la CCSS en horas laborales, o fuera de horas laborales, si existe prohibición o dedicación exclusiva.
9. Me comprometo a no ofrecer ningún pago o beneficio al participante que pueda inducir su participación, así como de no establecer ninguna obligación financiera al participante, como podría ser el pago por los servicios de atención médica.
10. Me comprometo a presentar los informes de avance, cada 3 meses, según las fechas establecidas en la Subárea de Bioética en Investigación del CENDEISS con ese propósito.
11. Me comprometo a presentar los resultados finales y las conclusiones en la fecha establecida en el protocolo para la finalización de la investigación, siguiendo los requisitos establecidos en el formato "Requisitos para la Presentación de Resultados".

<u>Stephane Alvarado Valverde</u>	<u>1-1269-609</u>	<u>[Firma]</u>	<u>01 / 10 / 08</u>
Nombre Investigador Principal	Cédula	Firma	Fecha
<u>Luis Arturo Cordero Soto</u>	<u>1-448-026</u>	<u>[Firma]</u>	<u>01 / 10 / 08</u>
Nombre Sub-investigador	Cédula	Firma	Fecha
<u>Berta Valverde Rojas</u>	<u>1-490-386</u>	<u>[Firma]</u>	<u>01 / 10 / 08</u>
Nombre Sub-investigador	Cédula	Firma	Fecha

Los abajo firmantes no encuentran objeción alguna para que este estudio sea realizado en este centro asistencial, siempre y cuando cuente con la recomendación previa del Comité Local de Bioética o del Comité Institucional de Bioética en Investigación, según sea el caso, de acuerdo a lo establecido en el Reglamento para la Investigación Biomédica en los Servicios Asistenciales de la Caja Costarricense de Seguro Social:

<u>RAFAEL JIMENEZ BONILLA</u>	<u>1-323-961</u>	<u>[Firma]</u>	<u>01 / 10 / 08</u>
Nombre Jefe de Servicio	Cédula	Firma	Fecha
_____	_____	_____	____/____/____
Nombre Director Médico	Cédula	Firma	Fecha

INICIALES IP SAV



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
 Centro de Desarrollo Estratégico e Información
 en Salud y Seguridad Social
 Área de Bioética
 Subárea de Bioética en Investigación
 Teléfono: (506)519-3044
www.cendeiss.sa.cr

PARA ESTUDIOS CON FINES ACADÉMICOS

(persona responsable de la investigación en el centro asistencial de la CSS)

Nombre del tutor: María Rodríguez Sevilla		Grado académico: Especialista en hematología	
Número de cédula: 1-0784-0756		Número de investigaciones dirigidas: 0	
Lugar de Trabajo: Hospital San Juan de Dios			
Dirección:		Betania, Montes de Oca.	
Teléfono: 8326-3342		Correo electrónico: mariars95@hotmail.com	
Fax: 2257-6282, ext 3036		Beeper: NA	

DECLARACION DEL TUTOR ¹

Certifico que el investigador principal nombrado en este documento conoce adecuadamente el **Reglamento para la Investigación Biomédica en los Servicios Asistenciales de la Caja Costarricense de Seguro Social** y ha tenido la preparación necesaria y experiencia para conducir este estudio, de acuerdo con el protocolo aprobado. Además, me reuniré con el investigador principal periódicamente para valorar el progreso de la investigación. Si se presentara algún problema, me comprometo a estar disponible personalmente para supervisar al investigador en la solución del mismo. Si me encontrara lejos del área de estudio, haré los arreglos necesarios para que otra persona calificada asuma mis responsabilidades.

María Rodríguez Sevilla

1-0784-0756

María Rodríguez Sevilla

18, 07, 2008.

Nombre del Tutor

Cédula

Firma

Fecha

¹ Tutor: funcionario de la Caja Costarricense de Seguro Social, responsable de la ejecución y supervisión del estudio en el centro asistencial.

INICIALES IP _____

APÉNDICE 2. FORMULARIO AP-IIA
RESUMEN DE PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN



FORMULARIO AP-IIA
RESUMEN DE LA PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN OBSERVACIONAL

Título del estudio:	Estandarización del protocolo de ensayo de unidades formadoras de colonias de células progenitoras hematopoyéticas a partir de células mononucleadas de sangre periférica, sangre de cordón umbilical y médula ósea.
Entidades participantes:	Hospital San Juan de Dios, Instituto Tecnológico de Costa Rica.
Investigador principal:	Stephanie Alvarado Valverde.
Centro asistencial donde se realizará el estudio:	Laboratorio de Investigación y Enseñanza de Hematología, HSJD. Laboratorio de Investigación, HNN. Laboratorio de Ingeniería en Tejidos, ITCR.
Justificación de la importancia del estudio:	El Hospital San Juan de Dios ha incursionado exitosamente en el trasplante de células madre como tratamiento de pacientes con alto riesgo de enfermedades hematológicas; sin embargo, la técnica utilizada requiere controles para asegurar la viabilidad de las células trasplantadas. Es por ello que se ha planteado efectuar una práctica de especialidad en el Laboratorio de investigación y enseñanza de hematología con el objetivo de evaluar la capacidad de proliferación de progenitores humanos hematopoyéticos <i>in vitro</i> en muestras de sangre periférica, médula ósea y sangre de cordón umbilical mediante la obtención y conteo de unidades formadoras de colonias.
Pregunta de investigación o hipótesis:	Existe una relación entre el total de UFC con el total de células CD34+ y/o total de células vivas según el método de exclusión de colorante azul tripán presentes en una misma muestra de células mononucleadas de sangre periférica, sangre de cordón umbilical o médula ósea.
Objetivos:	<ul style="list-style-type: none">Evaluar <i>in vitro</i> el potencial de crecimiento y proliferación de progenitores humanos hematopoyéticos.Generar patrones de identificación de colonias de UFC-E, UFB-E, UFC-GM y UFC-GEMM presentes en una placa de cultivo con medio de metilcelulosa.Determinar la recuperación celular al efectuar ensayos de criopreservación en células mononucleadas.Analizar la relación del total de células CD34+ con el total de UFC presentes en una misma muestra.Analizar la relación del total de células vivas según el método de exclusión de colorante azul tripán con el total de UFC presentes en una misma muestra.



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeisss.sa.cr

Diseño metodológico

Diseño del estudio:	Desarrollo de la técnica para conteo de unidades formadoras de colonias de colonias de progenitores hematopoyéticos y comparación con la demás técnicas utilizadas para determinar viabilidad celular y dosis de aplicación en trasplantes de células madre.
Población de estudio:	NA. Se incluirán muestras de sangre de cordón umbilical pre y post-criopreservación, producto de leucoféresis para recolección de células madre de sangre periférica pre y post-criopreservación y médula ósea no criopreservada.
Criterios de inclusión y exclusión:	NA. Se incluirán muestras de sangre de cordón umbilical donada, médula ósea de donadores sanos y células madre de sangre periférica de pacientes o donadores sanos a quienes se les practique una leucoféresis.
VARIABLES ESTUDIADAS:	<ol style="list-style-type: none">1. Medición de unidades formadoras de colonias de progenitores eritroides (UFC-E y BFU-E), progenitores granulocito-macrófago (UFC-GM, UFC-M, UFC-G) y progenitores multipotenciales granulocito-eritroide-macrófago-megacariocito (UFC-GEMM).2. Porcentaje de células no teñidas en ensayos por el método de exclusión de colorante con azul de tripán.3. Porcentaje de células CD34+ determinadas mediante citometría de flujo.
Tamaño de la muestra:	Se procesarán alrededor de 50 muestras de sangre de cordón umbilical pre y post-criopreservación, producto de leucoféresis para recolección de células madre de sangre periférica pre y post-criopreservación y médula ósea no criopreservada. Todas las muestras estarán constituidas por 1ml del producto que se guarda rutinariamente para control de calidad como parte del protocolo de trabajo del servicio de hematología del HSJD.
Técnica de muestro y unidad de análisis:	Técnica de muestreo: NA. Uso de muestras disponibles azarasas. Unidad de análisis: Se efectuará una comparación de: <ol style="list-style-type: none">1. Donador: Morbilidad.2. Muestra: Sangre periférica, sangre de cordón umbilical, médula ósea3. Proceso: Pre-criopreservación, post-criopreservación.4. Ensayo: UFC, azul tripán, CD34+.

Plan de trabajo

Duración del estudio:	Seis a siete meses.
-----------------------	---------------------



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeisss.sa.cr

Fecha estimada de inicio:

Julio, 2008.

Pruebas estadísticas
utilizadas:

Técnica de muestreo: NA (Uso de muestras disponibles azarosas).

Unidad de análisis: se efectuarán **análisis de varianza anidada multivariada (MANOVA)** con pruebas de cuatro o tres vías según los siguientes diseños:

Para verificar si existen diferencias significativas entre las muestras de células mononucleadas antes y después de criopreservación:

Sangre periférica x Pre-crio x UFC x Morbilidad
Sangre periférica x Post-crio x UFC x Morbilidad
Sangre periférica x Pre-crio x Azul tripán x Morbilidad
Sangre periférica x Post-crio x Azul tripán x Morbilidad
Sangre periférica x Pre-crio x CD34 x Morbilidad
Sangre periférica x Post-crio x CD34 x Morbilidad

Cordón umbilical x Pre-crio x UFC
Cordón umbilical x Post-crio x UFC
Cordón umbilical x Pre-crio x Azul tripán
Cordón umbilical x Post-crio x Azul tripán
Cordón umbilical x Pre-crio x CD34
Cordón umbilical x Post-crio x CD34

Médula ósea x Pre-crio x UFC
Médula ósea x Post-crio x UFC
Médula ósea x Pre-crio x Azul tripán
Médula ósea x Post-crio x Azul tripán
Médula ósea x Pre-crio x CD34
Médula ósea x Post-crio x CD34

Para efectuar una evaluación *in vitro* del potencial de crecimiento y proliferación de progenitores humanos hematopoyéticos:

Sangre periférica x Pre-crio x UFC x Morbilidad
Cordón umbilical x Pre-crio x UFC
Médula ósea x Pre-crio x UFC

Sangre periférica x Post-crio x UFC x Morbilidad
Cordón umbilical x Post-crio x UFC
Médula ósea x Post-crio x UFC

Para analizar la relación del total de células CD34+ con el total de UFC presentes en una misma muestra:

Sangre periférica x Pre-crio x UFC x Morbilidad
Sangre periférica x Pre-crio x CD34 x Morbilidad
Sangre periférica x Post-crio x UFC x Morbilidad
Sangre periférica x Post-crio x CD34 x Morbilidad

Cordón umbilical x Pre-crio x UFC
Cordón umbilical x Pre-crio x CD34
Cordón umbilical x Post-crio x UFC



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeiss.sa.cr

Instrumento para la recolección de información

Cordón umbilical x Post-crio x CD34

Médula ósea x Pre-crio x UFC
Médula ósea x Pre-crio x CD34
Médula ósea x Post-crio x UFC
Médula ósea x Post-crio x CD34

Para analizar la relación del total de células vivas según el método de exclusión de colorante con azul tripán con el total de UFC presentes en una misma muestra:

Sangre periférica x Pre-crio x UFC x Morbilidad
Sangre periférica x Pre-crio x Azul tripán x Morbilidad
Sangre periférica x Post-crio x UFC x Morbilidad
Sangre periférica x Post-crio x Azul tripán x Morbilidad

Cordón umbilical x Pre-crio x UFC
Cordón umbilical x Pre-crio x Azul tripán
Cordón umbilical x Post-crio x UFC
Cordón umbilical x Post-crio x Azul tripán

Médula ósea x Pre-crio x UFC
Médula ósea x Pre-crio x Azul tripán
Médula ósea x Post-crio x UFC
Médula ósea x Post-crio x Azul tripán

Se efectuarán además pruebas de **Chi cuadrado** para determinar diferencias significativas entre las frecuencias celulares encontradas en las muestras analizadas.

Limitaciones y posibles sesgos del estudio:

Adecuación de los medios de cultivo a utilizar en ensayos de UFC.
Inadecuado procesamiento de los medios.
Incorrecta preparación de la suspensión celular a utilizar.
Inadecuadas condiciones de cultivo.
Contaminación de las placas de cultivo.
Incorrecto reconocimiento y conteo de las diferentes UFC.

Resultados esperados e impacto del estudio:

Estandarizar un procedimiento para evaluar *in vitro* la viabilidad y capacidad de proliferación de progenitores humanos hematopoyéticos en muestras de sangre periférica, sangre de cordón umbilical y médula ósea.
Desarrollar la técnica necesaria para efectuar ensayos de UFC.
Identificar las colonias de UFC-E, UFB-E, UFC-GM y UFC-GEMM.
Comprobar la calidad del proceso de extracción, criopreservación y descongelación realizados.
Fomentar el desarrollo de la biotecnología médica mediante el desarrollo y aplicación de conocimientos científicos y tecnológicos no utilizados actualmente



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeisss.sa.cr

en nuestro país.

Fomentar la cooperación inter-institucional entre el Hospital San Juan de Dios y el Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Instrumento para la
recolección de
información:

Formulario de Ensayos AT, CD34 y UFC (anexo 1, AP-III).

APENDICE 3 FORMULARIO AP-III
REQUISITOS DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

APÉNDICE 3. FORMULARIO AP-III A
REQUISITOS DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeisss.sa.cr

Para uso administrativo

FORMULARIO AP-III A REQUISITOS DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN (Observacional)

TITULO DEL PROYECTO

Estandarización del protocolo de ensayo de unidades formadoras de colonias de células progenitoras hematopoyéticas a partir de células mononucleadas de sangre periférica, sangre de cordón umbilical y médula ósea.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

El uso de células madre con fines terapéuticos representa en la actualidad una de las posibilidades aceptadas como únicas para el tratamiento de ciertas enfermedades degenerativas o como terapia de preferencia para patologías cuyo tratamiento alternativo no supone una solución definitiva. La idea de que los trastornos médicos que afectan la formación de células sanguíneas o inmunitarias pueden ser curados mediante el trasplante de células madre hematopoyéticas ha fomentado su uso en el tratamiento de pacientes con alto riesgo de enfermedades hematológicas.¹ La base de este trasplante es que todas las células sanguíneas surgen a partir de células madre presentes en la médula ósea, la sangre de cordón umbilical y la sangre periférica y su obtención puede efectuarse mediante recolección de sangre del cordón umbilical de recién nacidos para trasplantes alogénicos y mediante leucoféresis u obtención de médula ósea para trasplantes autólogos.^{1, 2, 3}

Para determinar la viabilidad de las células madre recolectadas suelen emplearse diferentes métodos, de los cuales el más común es la tinción con azul tripán, molécula coloreada de gran peso molecular que sólo es capaz de entrar en las células que tienen la membrana alterada, por lo que una célula viva en perfecto estado se observará incolora ante esta tinción mientras que una célula muerta o con la membrana rota se observará azul en conteos celulares con hemocitómetro.⁴ Además, para identificar y cuantificar la población de células madre se utiliza el marcador de linaje conocido como antígeno CD34, que es una glicoproteína monomérica de peso molecular entre 110-120KDa codificada por un gen ubicado en el cromosoma 1q32.^{5, 6} Las células que expresan este marcador de diferenciación linfocitaria (células CD34+) se caracterizan por poseer un gran potencial de repoblación *in vivo*; de manera que la expresión de este antígeno es mucho mayor en células progenitoras tempranas y disminuye progresivamente a medida que las células maduran, hasta no detectarse en células terminalmente diferenciadas.^{1, 7, 8} Las células CD34+ purificadas son capaces de reconstituir la hematopoyesis multilineal y además presentan potencial de implantación de células humanas en trasplantes autólogos y alogénicos.^{9, 10}

Una forma de determinar y evaluar la capacidad de proliferación *in vitro* de las células madre hematopoyéticas presentes en una muestra es mediante la obtención de unidades formadoras de colonias (UFC) a partir de células hematopoyéticas progenitoras, donde cada colonia representa la progenie de una célula madre, de manera que el número de UFC es una medida del número de células madres presentes en una cantidad determinada de muestra. El cultivo de unidades formadoras de colonias granulocito-eritroides-macrófagos-megacariocitos (UFC-GEMM), unidades formadoras de colonias granulocito-macrófago (UFC-GM) y unidades formadoras de brotes eritrocitos (UFB-E) se utiliza comúnmente para detectar y cuantificar progenitores

COBI
COMITÉ INSTITUCIONAL DE
BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeisss.sa.cr

humanos hematopoyéticos en muestras de médula ósea, sangre periférica y sangre de cordón umbilical. Además, se ha utilizado para determinar las tasas de viabilidad y recuperación celular en ensayos de criopreservación de células madre de sangre periférica y cordón umbilical.^{11,12} Según estudios efectuados por Migliaccio y colaboradores la dosis de UFC es un parámetro más predictivo de la supervivencia post-trasplante que la dosis de células nucleadas, metodología usualmente empleada, observándose prendimiento y trasplante libre de enfermedad a partir de una dosis de 5×10^4 UFC/Kg de peso del paciente.¹³

2. PROPÓSITO DEL ESTUDIO

2.1 Interrogante a estudiar

- a. **Población:** Muestras de sangre de cordón umbilical donada pre y post-criopreservación, producto de leucoféresis para recolección de células madre de sangre periférica de pacientes o donadores sanos pre y post-criopreservación y médula ósea de donadores sanos no criopreservada.
- b. **Objeto de estudio:** Desarrollar una técnica para el conteo de unidades formadoras de colonias de progenitores hematopoyéticos a partir de células mononucleadas de muestras de sangre de cordón umbilical, sangre periférica y médula ósea y efectuar una comparación con las demás técnicas de rutina utilizadas para determinar viabilidad celular y dosis de aplicación en trasplantes de células madre.
- c. **Comparaciones:** De la medición de unidades formadoras de colonias de progenitores eritroides (UFC-E y BFU-E), progenitores granulocito-macrófago (UFC-GM, UFC-M, UFC-G) y progenitores multipotenciales granulocito-eritroide-macrófago-megacariocito (UFC-GEMM) contra células no teñidas por el método de exclusión de colorante y células CD34+ determinadas mediante citometría de flujo.
- d. **Resultados:** Estandarizar un procedimiento para evaluar *in vitro* la viabilidad y capacidad de proliferación de progenitores humanos hematopoyéticos en muestras de sangre periférica, sangre de cordón umbilical y médula ósea, para lo cual se pretende desarrollar las técnicas necesarias para efectuar ensayos de UFC; identificar colonias de UFC-E, UFC-M, UFC-GM y UFC-GEMM; comprobar la calidad del proceso de extracción, criopreservación y descongelación realizados; y fomentar la cooperación inter-institucional y el desarrollo de la biotecnología médica en nuestro país.

2.2 Objetivo general

Estandarizar los procedimientos de ensayos de unidades formadoras de colonias de células progenitoras hematopoyéticas a partir de células mononucleadas de sangre periférica, sangre de cordón umbilical y médula ósea.

2.3 Objetivos específicos

- . Evaluar *in vitro* el potencial de crecimiento y proliferación de progenitores humanos hematopoyéticos.
- . Generar patrones de identificación de colonias de UFC-E, UFC-M, UFC-GM y UFC-GEMM presentes en una placa de cultivo con medio de metilcelulosa.
- . Determinar la recuperación celular al efectuar ensayos de criopreservación en células mononucleadas.
- . Analizar la relación del total de células CD34+ con el total de UFC presentes en una misma muestra.
- . Analizar la relación del total de células vivas según el método de exclusión de colorante azul tripán con el total de UFC presentes en una misma muestra.





CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeisss.sa.cr

3. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

3.1 Número total de participantes que serán enrolados en el estudio en Costa Rica

Se procesarán alrededor de 50 muestras de sangre de cordón umbilical pre y post-criopreservación, producto de leucoféresis para recolección de células madre de sangre periférica pre y post-criopreservación y médula ósea no criopreservada. Todas las muestras estarán constituidas por **1ml del producto que se guarda rutinariamente para control de calidad como parte del protocolo de trabajo del servicio de hematología del HSJD.**

3.2 Criterios de inclusión de los participantes

- a. Rango de edad: NA.
- b. Género: NA.
- c. Etnia: NA.
- d. Inclusión de clases especiales o participantes vulnerables: NA.
- e. Pruebas de laboratorio: Tinción con azul tripán y conteo de CD34+ mediante citometría de flujo.
- f. Otros: Se incluirán muestras de sangre de cordón umbilical donada, médula ósea de donadores sanos y células madre de sangre periférica de pacientes o donadores sanos a quienes se les practique una leucoféresis.

3.3 Criterios de exclusión

NA.

4. DISEÑO Y PROCEDIMIENTOS

4.1 Cronograma del estudio

Rubro	Fecha estimada
Observar la preparación de los pacientes que serán sometidos a leucoféresis.	30 de enero
Capacitación en ensayos de viabilidad con azul tripán.	1 de febrero
Presentación del proyecto al personal del laboratorio de hematología del HSJD.	8 de febrero
Solicitud de compra de reactivos.	21 de febrero
Capacitación en Citometría de flujo para CD34 y CD45.	21 de febrero
Entrega de los reactivos.	17 de marzo
Presentación del proyecto ante CENDEISSS.	5 - 9 de mayo
Preparación de los medios a utilizar en ensayos de UFC.	Julio 2008
Capacitación en México D.F	Agosto 2008
Ensayos de UFC (CD34 y azul tripán paralelos realizados en el HSJD).	Set - Dic 2008
Presentación 1º informe de avance	Noviembre 2008
Presentación del informe final	Febrero 2009



FORMULARIO AP-III A
Revisado 01/03/2006



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeisss.sa.cr

4.2 Generación de los grupos de comparación

NA.

4.3 Descripción de los procedimientos:

4.3.1 Manejo de tejidos y muestras biológicas

Obtención de las muestras

El tubo con 1ml de muestra a partir de sangre de cordón umbilical pre y post-criopreservación, producto de leucoféresis para recolección de células madre de sangre periférica pre y post-criopreservación ó médula ósea no criopreservada será entregado al investigador principal por la Dra. María Rodríguez o por el Dr. Arturo Cordero en el Laboratorio de Investigación en y Enseñanza de Hematología del Hospital San Juan de Dios, después de completar el **Formulario de Ensayos AT, CD34 y UFC** (anexo 1). Se asignará un código a cada tubo de acuerdo con el tipo de muestra (MO-SCU-SP), el proceso (criopreservada o no) y un número consecutivo, de la siguiente manera: $XXX - X - XX$
muestra proceso consecutivo

Traslado de las muestras

Se debe efectuar al traslado de cada tubo al Laboratorio de Ingeniería en Tejidos del Instituto Tecnológico de Costa Rica dependiendo de la muestra a utilizar. Así, para muestras recién colectadas se debe realizar el transporte en una hielera con hielo y para muestras criopreservadas el transporte se debe efectuar en un tanque con nitrógeno líquido. Se debe evitar cualquier movimiento brusco y realizar el transporte lo más rápidamente posible.

Aislamiento de células mononucleadas

1. Apartar 1ml del producto de médula ósea o sangre de cordón umbilical que se guarda rutinariamente para control de calidad como parte del protocolo de trabajo del servicio de hematología del HSJD.
2. Efectuar un conteo inicial de células nucleadas utilizando un hemocitómetro para establecer el número y concentración de células nucleadas en la muestra original.
3. Medir el volumen total de la muestra a procesar y transferir a un tubo nuevo.
4. Diluir las células al menos 1:1 con 2% IMDM. Mezclar por inversión.
5. Mezclar por inversión el histopaque antes de utilizar.
6. Poner 3,0 ml de Histopaque-1077 en un tubo de centrifuga cónico de 15 ml, y llevarlo a temperatura ambiente.
7. Extender con cuidado utilizando una micropipeta 3,0 ml de muestra + 2%IMDM en Histopaque-1077. No perturbar la interface histopaque/muestra.
8. Centrifugar a 400 x g durante exactamente 30 minutos, a temperatura ambiente. El centrifugado a temperaturas más bajas, como a 4 °C, puede producir la coagulación de las células y una recogida escasa.
9. Después del centrifugado, aspirar con cuidado, con una pipeta de Pasteur, la capa superior hasta 0,5 cm de la zona opaca que contiene las células mononucleares. Desechar la capa superior.
10. Transferir con cuidado la zona opaca, con una pipeta de Pasteur o una micropipeta, a un tubo de centrifuga cónico de poliestireno.
11. Adicionar 2% IMDM hasta completar 4ml. Centrifugar a 300 x g durante 10 minutos.
12. Aspirar el sobrenadante (dejando aproximadamente 1,0 ml) y desecharlo. Resuspender en vórtex, adicionar 3ml de 2%IMDM y agitar con vórtex más vigorosamente.
13. Centrifugar a 300 x g durante 10 minutos. Desechar el segundo supernadante.
14. Resuspender los pellets de las células en 1ml del medio apropiado (2% IMDM o congelamiento).
15. Utilizar un volumen mayor si el conteo inicial de células era alto.





CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeiss.sa.cr

16. Registrar el volumen final exacto y realizar un conteo final de células nucleadas en la misma manera que se efectuó el conteo inicial.^{14,15}

Conteo de células mononucleadas con azul de tripán

1. Tomar 100 µl de la muestra y mezclar con 100 µl de azul tripán al 0,4%.
2. Dejar reposar la mezcla al menos 5 min y no más de 15 min, agitando ocasionalmente.
3. Preparar el hemocitómetro, colocar el cubre y llenar ambos retículos de la cámara con un tubo capilar. Dejar reposar durante 3 minutos.
4. Enfocar con el objetivo de 10X, cambiar al aumento 40X y contar células viables en cada cuadrante.
5. Repetir el procedimiento si más del 10% de las células aparecen agrumadas.
6. Ajustar la concentración de la suspensión con diluciones 1:50 (0,1 ml de células + 4,9 ml de 2% IMDM) ó 1:100 (0,1 ml de células + 9,9 ml 2% IMDM), mezclar por inversión y repetir el procedimiento si en cada retículo hay menos de 200 células o más de 500 células (de 20-50 células por cuadrante).
7. Calcular el conteo de células viables de la siguiente manera:
8. Promedio células viables por cuadrante x factor de dilución x 104 = células viables/ml
9. Calcular el porcentaje de viabilidad de acuerdo con la siguiente fórmula:
$$\# \text{ células vivas} + (\# \text{ células vivas} + \# \text{ células muertas}) \times 100 = \text{Porcentaje de viabilidad.}^{14}$$

Criopreservación de células mononucleares

1. Preparar el medio de congelación con 90% de FBS + 10% DMSO. Colocar en hielo en refrigeración o a 4°C durante al menos 30min.
2. Efectuar un conteo de las células mononucleares utilizando azul de tripán.
3. Resuspender las células en medio frío de congelación y ajustar la concentración celular a 5-10x10⁶ células viables/ml. Dispensar 1ml en crioviales.
4. Inmediatamente, colocar los crioviales en un contenedor de congelamiento lento y colocar a -70°C durante 4-24h. Alternativamente, colocar los crioviales en una cámara de congelación de descenso controlado.
5. Después de 4-24h en congelación a -70°C o después del descenso controlado, transferir los crioviales a una caja de crio y colocar en la fase de vapor (-135°C) o en la fase líquida (-196°C) en un tanque de almacenamiento de nitrógeno.¹⁶

Descongelación de células mononucleadas

1. Descongelar los crioviales que contiene las células mononucleares en un baño de agua a 37°C.
2. Secar el exterior de los crioviales y, antes de abrir, limpiar con alcohol de 70% para evitar la contaminación.
3. Rápidamente, transferir la suspensión celular descongelada (cerca de 1ml) a un tubo cónico de centrifuga de 15ml con 10ml 10% IMDM.
4. Centrifugar a temperatura ambiente a 200g durante 10min. Remover el supernadante sin tocar el pellet de células.
5. Lavar una vez con 10ml de DPBS y centrifugar a temperatura ambiente a 200g durante 10min. Con cuidado, resuspender las células en 1-2 ml de 2% IMDM.
6. Realizar un conteo de células nucleadas para establecer el número y concentración de células nucleadas recuperadas y comparar con el número antes de la criopreservación.¹⁶

Ensayo de unidades formadoras de colonias de células progenitoras hematopoyéticas

1. Descongelar el número requerido de alícuotas de medio bajo refrigeración (2-°C) durante la noche.
2. Preparar las placas de cultivo colocando dos placas de cultivo de 35 mm con tapas dentro de una placa petri de 100 mm con tapa.
3. Etiquetar las placas de cultivo de 35mm en el borde con el experimento y número de ensayo utilizando un marcador permanente fino.





CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeiss.sa.cr

4. Diluir las células con 2% IMDM a 10X de la concentración final requerida de acuerdo con la siguiente tabla:

Fuente de las células	Células / placa de 35mm	Concentración 10x a preparar
Médula ósea	$2 \times 10^4 (1 - 5 \times 10^4)$	$2 \times 10^5 (1 - 5 \times 10^5)$
Sangre periférica movilizada	$2 \times 10^4 (1 - 5 \times 10^4)$	$2 \times 10^5 (1 - 5 \times 10^5)$
Sangre de cordón umbilical	$1 \times 10^4 (5 \times 10^3 - 2 \times 10^4)$	$1 \times 10^5 (5 \times 10^4 - 2 \times 10^5)$

- Adicionar 0.3ml de células diluidas a un tubo de 3ml de MethoCult para ensayos por duplicado. Inmediatamente después colocar en el vórtex y mezclar a fondo.
- Dejar reposar por 5 minutos para disipar las burbujas antes de dispensar.
- Para dispensar la mezcla células-metilcelulosa en las placas de cultivo, adjuntar una aguja calibre 16 con extremo burdo a una jeringa estéril de 3ml. Utilizar una nueva aguja y jeringa para cada tubo.
- Para expulsar la mayor parte del aire de la jeringa, colocar la aguja bajo la superficie de la solución y tomar aproximadamente 1 ml. Bajar suavemente el émbolo y expulsar el medio completamente. Repetir hasta que no haya aire visible dentro de la jeringa.
- Tomar con la jeringa 1.1 ml de la mezcla células-metilcelulosa para cada placa de 35 mm.
- Remover la tapa de la placa de 35 mm con la mano opuesta y colocar la jeringa sobre el centro de la placa sin tocar la jeringa ni la placa. Dispensar 1.1 ml. Colocar de nuevo la tapa.
- Distribuir el medio uniformemente sobre la superficie de cada placa mediante inclinación suave y rotando la placa para permitir que el menisco se una a la pared de las placas en todos los lados.
- Colocar las placas de cultivo en las placas petri de 100 mm. Adicionar 3ml de agua estéril a una placa de 35 mm sin tapa.
- Incubar a 37°C, 5% de CO₂, con ≥95% de humedad por 14-16 días.
- Si los cultivos de UFC no van a ser enumerados los días 14-16, recambiar el agua si es requerido, y transferir los cultivos a una incubadora a 33°C, 5% de CO₂, con ≥95% de humedad y leer tan pronto sea posible.^{14,17}

Enumeración de unidades formadoras de colonias

- Preparar una placa de puntuación cuadrículada dibujando dos líneas perpendiculares y ocho cuadrados (de aproximadamente 2mm) en el centro de un placa de cultivo usando un marcador permanente fino en la parte inferior de la placa.
- Sacar los cultivos a ser evaluados de la incubadora de 37°C.
- Remover la primera placa de cultivo de 35mm de la placa petri y colocar en el centro de la placa de puntuación.
- Utilizar un microscopio invertido de alta calidad equipado con objetivos de 2X, 4X y 10X. Un filtro azul mejora el color rojo de los eritroblastos hemoglobinizados en UFC-E, UFB-E y UFC-GEMM.
- Colocar las placas en el microscopio invertido y ajustar a bajo poder (objetivo 2X) hasta enfocar las colonias.
- Escanear la placa a bajo poder (objetivo de 2X, magnificación de 40X) para evaluar la distribución relativa de las colonias.
- Iniciando con un extremo de la placa, contar todas las colonias de interés a alto poder (objetivo de 4-5X, magnificación de 40-50X). Tomar los resultados de UFC-E. Es necesario enfocar continuamente arriba y abajo para identificar las colonias presentes en las 3 dimensiones del cultivo, las que se encuentran en los bordes, y para distinguir colonias individuales que estas muy cercanas pero se encuentran en diferentes planos.
- Una vez que la placa ha sido escaneada a alto poder, cambiar a una magnificación más baja (objetivo 2X, magnificación 25X con oculares de 10X) para identificar las colonias UFB-E, UFC-GEMM y UFC-GM.





CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeiss.sa.cr

9. Efectuar los conteos en las demás placas de cultivo de la misma manera.
10. Si fuera necesario los cultivos pueden guardarse en una incubadora a 33°C, con 5% Co3 en el aire y <95% de humedad para evaluaciones futuras, hasta un máximo de 7 días.
11. En caso de ensayos de antes y después de congelación calcular la tasa de recuperación. ^{14,17}

4.4 Obtención de resultados de otros ensayos

Ensayo de conteo de células mononucleadas con azul de tripán

Los resultados obtenidos al efectuar este ensayo en el Laboratorio de Investigación y Enseñanza de Hematología del Hospital San Juan de Dios serán proporcionados por el Dr. Arturo Cordero al completar la información requerida para el 'Conteo con Azul de Tripán' del **Formulario de Ensayos AT, CD34 y UFC** (anexo 1). El almacenaje de los datos y su confidencialidad se realizará según aclara el punto 4.6 de este documento.

Ensayo de conteo de células CD34+ con citometría de flujo

Los resultados obtenidos al efectuar este ensayo en el Laboratorio de Investigación del Hospital Nacional de Niños serán proporcionados por la Dra. Berta Valverde al completar la información requerida para la 'Citometría de Flujo para CD34' del **Formulario de Ensayos AT, CD34 y UFC** (anexo 1). El almacenaje de los datos y su confidencialidad se realizará según aclara el punto 4.6 de este documento.

4.5 Análisis estadístico

Los resultados serán analizados tomando en cuenta las siguientes variables:

Donador:	Morbilidad.
Muestra:	Sangre periférica, sangre de cordón umbilical, médula ósea.
Proceso:	Pre-criopreservación, post-criopreservación.
Ensayo:	UFC, azul tripán, CD34+.

Con el fin de verificar si existen diferencias significativas entre las muestras de células mononucleadas provenientes de muestras de sangre periférica, sangre de cordón umbilical y médula ósea antes y después de criopreservación se efectuará un análisis de varianza anidada multivariada (MANOVA) con pruebas de cuatro o tres vías según el siguiente diseño:

Sangre periférica x Pre-crio x UFC x Morbilidad
Sangre periférica x Post-crio x UFC x Morbilidad
Sangre periférica x Pre-crio x Azul tripán x Morbilidad
Sangre periférica x Post-crio x Azul tripán x Morbilidad
Sangre periférica x Pre-crio x CD34 x Morbilidad
Sangre periférica x Post-crio x CD34 x Morbilidad

Cordón umbilical x Pre-crio x UFC
Cordón umbilical x Post-crio x UFC
Cordón umbilical x Pre-crio x Azul tripán
Cordón umbilical x Post-crio x Azul tripán
Cordón umbilical x Pre-crio x CD34
Cordón umbilical x Post-crio x CD34

Médula ósea x Pre-crio x UFC





CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeiss.sa.cr

Médula ósea x Post-crio x UFC
Médula ósea x Pre-crio x Azul tripán
Médula ósea x Post-crio x Azul tripán
Médula ósea x Pre-crio x CD34
Médula ósea x Post-crio x CD34

Para efectuar una evaluación *in vitro* del potencial de crecimiento y proliferación de progenitores humanos hematopoyéticos a partir de muestras de sangre periférica, sangre de cordón umbilical y médula ósea se efectuará un MANOVA con pruebas de cuatro o tres vías según el siguiente diseño:

Sangre periférica x Pre-crio x UFC x Morbilidad
Cordón umbilical x Pre-crio x UFC
Médula ósea x Pre-crio x UFC

Sangre periférica x Post-crio x UFC x Morbilidad
Cordón umbilical x Post-crio x UFC
Médula ósea x Post-crio x UFC

Con la finalidad de analizar la relación del total de células CD34+ con el total de UFC presentes en una misma muestra de sangre periférica, sangre de cordón umbilical o médula ósea se efectuará un MANOVA con pruebas de cuatro o tres vías según el siguiente diseño:

Sangre periférica x Pre-crio x UFC x Morbilidad
Sangre periférica x Pre-crio x CD34 x Morbilidad
Sangre periférica x Post-crio x UFC x Morbilidad
Sangre periférica x Post-crio x CD34 x Morbilidad

Cordón umbilical x Pre-crio x UFC
Cordón umbilical x Pre-crio x CD34
Cordón umbilical x Post-crio x UFC
Cordón umbilical x Post-crio x CD34

Médula ósea x Pre-crio x UFC
Médula ósea x Pre-crio x CD34
Médula ósea x Post-crio x UFC
Médula ósea x Post-crio x CD34

Con el fin de analizar la relación del total de células vivas según el método de exclusión de colorante con azul tripán con el total de UFC presentes en una misma muestra de sangre periférica, sangre de cordón umbilical o médula ósea se efectuará un MANOVA con pruebas de cuatro o tres vías según el siguiente diseño:

Sangre periférica x Pre-crio x UFC x Morbilidad
Sangre periférica x Pre-crio x Azul tripán x Morbilidad
Sangre periférica x Post-crio x UFC x Morbilidad
Sangre periférica x Post-crio x Azul tripán x Morbilidad

Cordón umbilical x Pre-crio x UFC
Cordón umbilical x Pre-crio x Azul tripán





CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeisss.sa.cr

Cordón umbilical x Post-crio x UFC
Cordón umbilical x Post-crio x Azul tripán

Médula ósea x Pre-crio x UFC
Médula ósea x Pre-crio x Azul tripán
Médula ósea x Post-crio x UFC
Médula ósea x Post-crio x Azul tripán

Se efectuarán además pruebas de Chi cuadrado para determinar diferencias significativas entre las frecuencias celulares encontradas en las muestras analizadas.

- a. **Cuestionarios o encuestas:** Ninguno. Se colectarán los datos mediante el "Formulario de Ensayos AT, CD34 y UFC" (anexo 1).

4.6 Almacenaje de los datos y confidencialidad

El **Formulario de Ensayos AT, CD34 y UFC** (anexo 1) con la información recopilada para cada muestra se almacenará en el Laboratorio de Investigación en Hematología del HSJD, donde será custodiado en la oficina de la jefatura de este laboratorio. Además, una copia se enviará al Laboratorio de Ingeniería en Tejidos del ITCR donde será custodiada por el responsable del proyecto. Solamente los participantes del estudio tendrán acceso a la información recopilada. El personal del ITCR no tendrá acceso al nombre, número de expediente u otra información del paciente/donador de la muestra. Con el fin de proteger la confidencialidad de los datos se pretende prevenir el acceso a la información por parte de personas no autorizadas.

Cuando el estudio finalice, la información recopilada se someterá a los análisis antes indicados. Se entregará un informe final de la práctica de especialidad al ITCR, además de un informe trimestral y un informe final al Comité Institucional de Bioética en Investigación del CENDEISSS. Los resultados de la investigación podrían ser publicados en artículos científicos, congresos o similares.

5. EVALUACIÓN DEL RIESGO / BENEFICIO DE LA INVESTIGACIÓN

5.1 Riesgos potenciales: Ensayo de UFC

Ninguno para el paciente, lesión por punción para el investigador.

5.2 Clasificación de riesgo

Riesgo menor que el mínimo.

5.3 Beneficios potenciales al sujeto o a la sociedad

Al efectuar este proyecto se pretende estandarizar los procedimientos necesarios para efectuar un ensayo que permita determinar si los procedimientos de extracción, criopreservación y descongelación aplicados a muestras de sangre de cordón umbilical, sangre periférica y médula ósea son adecuados. Además, se propone el uso de este ensayo para comprobar *in vitro* la viabilidad de las células madre.

Se espera también fomentar el desarrollo de la biotecnología médica mediante el desarrollo y aplicación de conocimientos científicos y tecnológicos no utilizados actualmente en nuestro país.

5.4 Balance del riesgo / beneficio





CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeisss.sa.cr

Se presentan mayores beneficios debido a que el riesgo es menor que el mínimo y a que la implementación de esta metodología representaría grandes ventajas respecto a la supervivencia celular post-trasplante de células madre.

6. OBLIGACIONES FINANCIERAS Y COMPENSACIÓN

6.1 Obligaciones financieras del participante.

Los participantes no deben asumir ninguna obligación financiera como resultado de su participación en el estudio. La responsabilidad financiera relativa a las pruebas de tinción con azul tripán la asumirá el Hospital San Juan de Dios. La responsabilidad financiera relativa a las pruebas de citometría de flujo para CD34 la asumirá el Hospital Nacional de Niños.

La responsabilidad financiera por concepto de reactivos y equipo la asumirá la empresa Sinertec Costa Rica Internacional Ltda, cédula jurídica número tres - ciento dos - trescientos cinco mil ochocientos setenta y cuatro; cuyo representante legal y judicial es el señor Rodolfo Gerardo Alvarado Coto, cédula de identidad número tres - trescientos cincuenta y tres - setecientos quince; en calidad de apoderado generalísimo sin límite de suma.

6.2 Compensación financiera por participación.

No se contempla.

7. IDENTIFICACIÓN DE PARTICIPANTES, RECLUTAMIENTO Y CONSENTIMIENTO

7.1 Método de identificación y reclutamiento

Se utilizarán las muestras de todos los productos de recolección de células madre sangre de cordón umbilical donada pre y post-criopreservación, producto de leucoféresis para recolección de células madre de sangre periférica de pacientes o donadores sanos pre y post-criopreservación y médula ósea de donadores sanos no criopreservada. **Todas las muestras estarán constituidas por 1ml del producto que se guarda rutinariamente para control de calidad como parte del protocolo de trabajo del servicio de hematología del HSJD.**

7.2 Protocolos paralelos

No aplica.

7.3 Competencia del participante

No aplica.

7.4 Excepciones para obtener el consentimiento informado

No aplica.

7.5 Propósito de información retenida

No aplica.

8. INFORMACIÓN DE LOS INVESTIGADORES

8.1 Compromiso de declarar los potenciales conflictos de interés

No existe ningún potencial conflicto de interés que pudiera influir en el buen desarrollo del estudio.





CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeisss.sa.cr

8.2 Código y atestados de los investigadores

El investigador principal y el personal del estudio están capacitados para realizar los procedimientos incluidos en el protocolo. Los currículos de las personas involucradas en el estudio se muestran en el documento CV-I adjunto.

9. CONSIDERACIONES BIOÉTICAS

9.1 Principio de autonomía

En este estudio no hay intervención alguna al paciente, además no se va a realizar ningún procedimiento adicional a lo normal en cualquier procedimiento de donación de células madre.

9.2 Principio de justicia

De igual manera, al no haber intervención alguna ni grupos expuestos o no expuestos, no habrá ningún grupo expuesto a riesgos mayores. El estudio esta planteado para desarrollarse en el lapso cinco meses, y este es el tiempo necesario para alcanzar una muestra lo suficientemente grande como para obtener resultados significativos.

9.3 Principio de beneficencia

El principal objetivo del proyecto es comprobar *in vitro* la viabilidad de las células madre a trasplantar antes de efectuar su aplicación en los pacientes, de manera que se compruebe que los procedimientos de extracción, congelamiento y descongelación de las mismas son los adecuados, garantizando la supervivencia celular post-trasplante de células madre en los pacientes que son sometidos a este tratamiento, lo que eventualmente resultará beneficioso para los pacientes que vayan a ser sometidos a trasplantes de células madre.

9.4 Principio de no maleficencia

El estudio que se pretende efectuar no implica riesgo alguno adicional para el paciente o donador. Tampoco alterara de modo alguno el producto que se va a congelar y luego trasplantar. Además, los procedimientos a utilizar cumplen con altas normas de control, asepsia y calidad requeridas.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Mera C, Roa A y Ramírez S. Células madre hematopoyéticas, generalidades y vías implicadas en sus mecanismos de auto-renovación. Rev Cienc Salud Bogotá 2007;5:67-89.
2. Rodríguez VM, Cuéllar A, Cusposa LM, Contreras CL, Mercado M y Gómez A. Determinación fenotípica de subpoblaciones de células madre derivadas de sangre de cordón umbilical. Biomédica 2006;26:51-60.
3. Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I, Kollet O, DiPersio JF, Link D y Devine S. Stem Cell Mobilization. Hematology 2003;419-437.
4. Schmidt NJ. Cell culture techniques for diagnostic virology. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. Washington; American Public Health Association. 1979. pp 65-139.
5. Szilvassy S. The Biology of hematopoietic stem cells. Arch Med Res 2003;34:446-60.
6. Lanza F, Healy L, Sutherland DR. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. J Biol Regul Homeost Agents 2001;15:1-13.
7. Sutherland DR, Keating A. The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications. J Hematother 1992;1:115-29.





CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeiss.sa.cr



8. Young PE, Baumhueter S, Lasky LA. The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development. *Blood* 1995;85:96-105.
9. Civin CI, Trischmann T, Kadan NS, Davis J, Noga S, Cohen K. Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis. *J Clin Oncol* 1996;14:2224-33.
10. Vogel W, Scheding S, Kanz L, Brugger W. Clinical applications of CD34 (+) peripheral blood progenitor cells (PBPC). *Stem Cells* 2000;18:87-92.
11. Katayama Y, Yano T, Bessho A, Deguchi S, Sunami K, Mahmut N, Shinagawa K, Omoto E, Makino S, Miyamoto T, Mizuno S, Fukuda T, Eto T, Fujisaki T, Ohno Y, Inaba S, Niho Y y Harada M. The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplantation* 1997;19:283-287.
12. Kudo Y, Minegishi M, Itoh T, Miura J, Saito N, Takahashi H, Suzuki A, Narita A, Sato Y, Kameoka J, Imaizumi M, Sato M, Murakawa Y y Tsuchita S. Evaluation of Hematological Reconstitution Potencial of Autologous Peripheral Blood Progenitor Cells Cryopreserved by a Simple Controlled-Rate Freezing Method. *Tohoku J Exp Med* 2005;205:37-43.
13. Migliaccio AR, Adamson JW, Stevens CE, Dobrila NL, Carrier CM y Rubinstein P. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood* 2000;96:2717-2722.
14. StemCell Technologies. 2004. Technical manual: Human Colony-Forming Cell Assays Using MethoCult® <http://www.stemcell.com/technical/28404_methocult%20H.pdf> (16/04/08).
15. Sigma-Aldrich. 2003. HISTOPAQUE®-1077 <<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/general%20information/1077.pdf>> (11/04/08)
16. Young-Jin K. Culture of Umbilical Cord- and Cord Blood-Derived Stem Cells. *Culture of Human Stem Cells*. RI Freshney, GN Stacey y JM Auerbach. 2007. pp159-186.
17. R&D Systems. Procedure for the Human Colony Forming Cell (CFU) Assay Using Methylcellulose-based Media <http://www.rndsystems.com/stem_cell_protocol_detail_objectname_CFC.aspx> (04/01/2008).





CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
 Centro de Desarrollo Estratégico e Información
 en Salud y Seguridad Social
 Área de Bioética
 Subárea de Bioética en Investigación
 Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeisss.sa.cr

11. ANEXOS

FORMULARIO DE ENSAYOS UFC, AT Y CD34	
 Caja Costarricense de Seguro Social Hospital San Juan de Dios Laboratorio de Hematología	 Instituto Tecnológico de Costa Rica Centro de Investigación en Biotecnología Laboratorio de Ingeniería en Tejidos
Instrucciones: <ol style="list-style-type: none"> 1. Complete toda la información en letra imprenta o a máquina. 2. Utilice bolígrafo de tinta azul o negra. 3. Utilice letra legible. 4. Al terminar el formulario entregar el original a la oficina de la jefatura del Laboratorio de Investigación en Hematología del Hospital San Juan de Dios y entregar una copia al encargado del proyecto del ITCR. 	
DATOS DE LA MUESTRA	
Código asignado:	
Tipo de donador:	() Donador sano () Paciente _____
Tipo de muestra:	<input type="checkbox"/> Sangre de cordón umbilical pre-criopreservación. <input type="checkbox"/> Sangre de cordón umbilical post-criopreservación. <input type="checkbox"/> Producto de leucoféresis de sangre periférica pre-crio. <input type="checkbox"/> Producto de leucoféresis de sangre periférica post-crio. <input type="checkbox"/> Médula ósea no criopreservada.
Fecha de obtención de la muestra:	
Responsable de la obtención:	
Código profesional:	
Fecha de criopreservación:	
Responsable de la criopreservación:	
Código profesional:	
TRASLADO DE LA MUESTRA	
Fecha de recepción:	
Hora y lugar de recepción:	
Responsable de la entrega:	
Hora y lugar de llegada:	
Responsable del traslado:	
Especificaciones del traslado:	<input type="checkbox"/> Hielera con hielo (muestras recién colectadas) <input type="checkbox"/> Tanque con nitrógeno líquido (muestras criopreservadas)
Incidentes ocurridos:	
RESULTADOS DEL LOS ENSAYOS	





CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
 Centro de Desarrollo Estratégico e Información
 en Salud y Seguridad Social
 Área de Bioética
 Subárea de Bioética en Investigación
 Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeisss.sa.cr

Conteo con Azul de tripán:	
Citometría para CD34:	
Ensayo de UFC:	

FORMULARIO DE CONTEO CON AZUL DE TRIPÁN - HSJD



Caja Costarricense de Seguro Social
 Hospital San Juan de Dios
 Laboratorio de Hematología



Instituto Tecnológico de Costa Rica
 Centro de Investigación en Biotecnología
 Laboratorio de Ingeniería en Tejidos

Instrucciones:

1. Complete toda la información en letra imprenta o a máquina.
2. Utilice bolígrafo de tinta azul o negra.
3. Utilice letra legible.
4. Al terminar el formulario entregar el original a la oficina de la jefatura del Laboratorio de Investigación en Hematología del Hospital San Juan de Dios y entregar una copia al encargado del proyecto del ITCR.

DATOS DE LA MUESTRA

Código asignado:	
Tipo de donador:	() Donador sano () Paciente _____
Tipo de muestra:	() Sangre de cordón umbilical pre-criopreservación. () Sangre de cordón umbilical post-criopreservación. () Producto de leucoféresis de sangre periférica pre-crio. () Producto de leucoféresis de sangre periférica post-crio. () Médula ósea no criopreservada.

RESULTADOS

Fecha del conteo:	
Hora del conteo:	
Resultados:	
Observaciones:	
Responsable:	
Código profesional:	
Firma:	

ENTREGA DE LOS DATOS

Fecha de entrega:	
Responsable de la entrega:	





CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
 Centro de Desarrollo Estratégico e Información
 en Salud y Seguridad Social
 Área de Bioética
 Subárea de Bioética en Investigación
 Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeisss.sa.cr

Código profesional:	
Firma:	
Responsable de la recepción:	
Código profesional:	
Firma:	

FORMULARIO DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA CD34 – HNN



Caja Costarricense de Seguro Social
 Hospital Nacional de Niños
 Laboratorio de Investigación



Instituto Tecnológico de Costa Rica
 Centro de Investigación en Biotecnología
 Laboratorio de Ingeniería en Tejidos

Instrucciones:

1. Complete toda la información en letra imprenta o a máquina.
2. Utilice bolígrafo de tinta azul o negra.
3. Utilice letra legible.
4. Al terminar el formulario entregar el original a la oficina de la jefatura del Laboratorio de Investigación en Hematología del Hospital San Juan de Dios y entregar una copia al encargado del proyecto del ITCR.

DATOS DE LA MUESTRA

Código asignado:	
Tipo de donador:	() Donador sano () Paciente _____
Tipo de muestra:	() Sangre de cordón umbilical pre-criopreservación. () Sangre de cordón umbilical post-criopreservación. () Producto de leucoféresis de sangre periférica pre-crio. () Producto de leucoféresis de sangre periférica post-crio. () Médula ósea no criopreservada.
Leucocitos	

RESULTADOS

Fecha del análisis:	
Hora del análisis:	
Resultados obtenidos:	
Observaciones:	
Responsable:	
Código profesional:	
Firma:	

ENTREGA DE LOS DATOS





CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
 Centro de Desarrollo Estratégico e Información
 en Salud y Seguridad Social
 Área de Bioética
 Subárea de Bioética en Investigación
 Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeisss.sa.cr

Fecha de entrega:	
Responsable de la entrega:	
Código profesional:	
Firma:	
Responsable de la recepción:	
Código profesional:	
Firma:	

FORMULARIO DE ENSAYO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS - ITCR



Caja Costarricense de Seguro Social
 Hospital San Juan de Dios
 Laboratorio de Hematología

Instituto Tecnológico de Costa Rica
 Centro de Investigación en Biotecnología
 Laboratorio de Ingeniería en Tejidos

Instrucciones:

1. Complete toda la información en letra imprenta o a máquina.
2. Utilice bolígrafo de tinta azul o negra.
3. Utilice letra legible.
4. Al terminar el formulario entregar el original a la oficina de la jefatura del Laboratorio de Investigación en Hematología del Hospital San Juan de Dios y entregar una copia al encargado del proyecto del ITCR.

DATOS DE LA MUESTRA

Código asignado:	
Tipo de donador:	() Donador sano () Paciente _____
Tipo de muestra:	() Sangre de cordón umbilical pre-criopreservación. () Sangre de cordón umbilical post-criopreservación. () Producto de leucoféresis de sangre periférica pre-crio. () Producto de leucoféresis de sangre periférica post-crio. () Médula ósea no criopreservada.

RESULTADOS

Fecha del conteo:	
Hora del conteo:	
Resultados obtenidos:	UFC-E: BFU-E: CFU-GM: CFU-GEMM:
Total de UFC:	
Observaciones:	
Responsable:	





CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeisss.sa.cr

Firma:	
ENTREGA DE LOS DATOS	
Fecha de entrega:	
Responsable de la entrega:	
Código profesional:	
Firma:	
Responsable de la recepción:	
Código profesional:	
Firma:	



APÉNDICE 4. FORMULARIO AP-IV
LABORATORIOS A UTILIZAR EN EL ESTUDIO



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506)519-3044
www.cendeiss.sa.cr

Para uso administrativo

**FORMULARIO AP-IV
PRUEBAS DE LABORATORIO A UTILIZAR EN EL ESTUDIO**

Título del estudio: **Estandarización del protocolo de ensayo de unidades formadoras de colonias de células progenitoras hematopoyéticas a partir de células mononucleadas de sangre periférica, sangre de cordón umbilical y médula ósea.**

Nombre del investigador principal: **Stephanie Alvarado Valverde**

Nombre de la prueba	Nombre del laboratorio donde se analizarán las pruebas (si el laboratorio no es parte de la CCSS, agregue la dirección y el teléfono)	Número de veces por sujeto que el estudio requiere que se realice la prueba	Número total de participantes propuestos en el estudio	Costo total presupuestado por prueba
Pruebas de CD34 y mediante citometría de flujo*	Laboratorio de Investigación, Hospital Nacional de Niños.	1	50	¢ 805.500,00 *
Ensayo de viabilidad por el método de exclusión de colorante*	Laboratorio de Investigación y Enseñanza de Hematología, Hospital San Juan de Dios.	1	50	¢ 10.000,00 *
Ensayo de colonias de células progenitoras hematopoyéticas.	Laboratorio de Ingeniería en Tejidos, Instituto Tecnológico de Costa Rica.	1	50	¢ 715.000,00
Conteo y clasificación de unidades formadoras de colonias.	Laboratorio de Ingeniería en Tejidos, Instituto Tecnológico de Costa Rica.	1	50	-

COSTO TOTAL PRESUPUESTADO PARA LAS PRUEBAS DE LABORATORIO

¢ 715.000,00

*Estas pruebas se efectúan de manera rutinaria para el control de calidad de las muestras que se utilizarán para efectuar trasplantes de células madre. En este estudio solamente se tomarán los resultados arrojados por estas pruebas, por lo que sus costos no se contabilizarán en el total presupuestado.

Certifico que este desglose es preciso con respecto al tipo, número y clasificación de todas las pruebas de laboratorio que se realizarán como parte de este estudio.

Stephanie Alvarado V.

Nombre del investigador principal

1-1269-609

Cédula

Firma

01 / 10 / 08

Fecha

APÉNDICE 5. FORMULARIO AP-V
PRESUPUESTO INICIAL (OBSERVACIONAL)



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506) 519-3044
www.cendeisss.sa.cr

PERIODO
ESTABLECIDO

De: ___/___/___

Hasta: ___/___/___

FORMULARIO AP-Va
PRESUPUESTO INICIAL (OBSERVACIONAL)

Título del estudio: Estandarización del protocolo de ensayo de unidades formadoras de colonias de células progenitoras hematopoyéticas a partir de células mononucleadas de sangre periférica, sangre de cordón umbilical y médula ósea.

Nombre del investigador principal: Stephanie Alvarado Valverde

Nombre del centro asistencial: Hospital San Juan de Dios, Hospital Nacional de Niños.

Equipo investigador		Número de veces que atiende al participante	Salario en su institución	Remuneración por realizar el estudio		
Nombre	Función en el estudio			Salarios	Otros Beneficios	Total
Stephanie Alvarado	Investigador principal	Ninguna	-	-	-	-
Dr. Arturo Cordero	Ensayo azul tripán	Ninguna	-	-	-	-
Dra. Berta Valverde	Conteo CD34	Ninguna	-	-	-	-

SUBTOTAL

Costos por Estudio ¹	Costo por Estudio		Costo Directo	=	Total
Análisis de factibilidad	NA	x	-	=	-
Revisión, renovación y enmienda	NA	x	-	=	-
Publicidad	NA	x	-	=	-
Laboratorio y gabinete ²	¢ 14.300	x	50 muestras	=	¢ 715.000
Equipo	NA	x	-	=	-
Suministros	NA	x	-	=	-
Gastos por administración	NA	x	-	=	-
Subcontrato	NA	x	-	=	-
Otro tipo de bonificaciones	NA	x	-	=	-
SUBTOTAL					¢ 715.000
TOTAL					¢ 715.000

Stephanie AV
Nombre

1-1269-0609
Número de Cédula

[Firma]
Firma

01/10/08
Fecha

¹ Los rubros por conceptos que no son aplicables al estudio deben señalarse con las siglas NA. No deje espacios en blanco.

² El rubro por concepto de laboratorio y gabinete debe corresponder al total incluido en el formulario AP-IV.

APÉNDICE 6. FORMULARIO CV-I
CURRÍCULUM VITAE ABREVIADO DE INVESTIGADORES



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506)519-3044
www.cendeisss.sa.cr

CV-I FORMATO DE CURRICULO VITAE ABREVIADO

DATOS PERSONALES

Nombre completo: Stephanie Alvarado Valverde
Nacionalidad: Costarricense
Cédula de identidad: 1-1269-0609
Código profesional: NA
Lugar y fecha de nacimiento: Pérez Zeledón, 05-02-1986
Centro de estudio: Instituto Tecnológico de Costa Rica
Teléfono: 279-8970
Teléfono celular: 391-5574
Correo electrónico: alvarado.stephanie@gmail.com

EDUCACIÓN

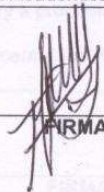
Títulos obtenidos:		
Grado	Institución y año de graduación	
Bachillerato en Educación Media	Colegio Científico Costarricense, 2003	

EXPERIENCIA ACADÉMICA

Posición	Institución	Fechas
Estudiante de último año de Ingeniería en Biotecnología.	Instituto Tecnológico de Costa Rica	2004-actual
Asistente Laboratorio Cultivo de Tejidos Vegetales.	Instituto Tecnológico de Costa Rica	2005
Presidente Asociación de Estudiantes de Ingeniería en Biotecnología.	Instituto Tecnológico de Costa Rica	2006-2007
Asistente del proyecto de investigación para la producción de piel humana <i>in vitro</i> .	Instituto Tecnológico de Costa Rica, Hospital Nacional de Niños, Hospital México y Hospital San Juan de Dios.	2006-2007
Proyecto estudiantil "Procesamiento de membrana amniótica para uso como apósito biológico".	Instituto Tecnológico de Costa Rica	2007-actual

PREMIOS Y RECONOCIMIENTOS

Primer promedio décimo nivel. Colegio Científico Costarricense, Sede Región Brunca, 2002. Tercer promedio undécimo nivel. Colegio Científico Costarricense, Sede Región Brunca, 2003. Mejor Proyecto Científico de IV Ciclo, XVII Feria Científica Nacional de Ciencia y Tecnología. UCR, MICIT, MEP y CONICIT. 2003. Bachillerato de Honor. Ministerio de Educación Pública. 2003. Beca de Excelencia Académica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 2004-2007.


 FIRMA

07/07/08
 FECHA



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506)519-3044
www.cendeisss.sa.cr

CV-I FORMATO DE CURRICULO VITAE ABREVIADO

DATOS PERSONALES

Nombre completo: Luis Arturo Cordero Soto
Nacionalidad: Costarricense
Cédula de identidad: 1-498-026
Código profesional: 613
Lugar y fecha de nacimiento: San José, 9 octubre 1958
Centro de trabajo: Hospital San Juan de Dios
Teléfono del trabajo: 2257-6282 ext 3035
Teléfono celular: 8836-6090
Correo electrónico: montura5@hotmail.com

EDUCACIÓN

Títulos obtenidos: grado	
Grado	Institución y año de graduación
Lic en Microbiología y Química Clínica	UCR, 1983
Especialidad en Hematología	UCR, 1986

EXPERIENCIA LABORAL

Posición	Institución	Fechas
Microbiólogo 1. Lab Clínico	HSJD	1983-1990
Jefe. Lab Hematología	HMex	1990-1995
Microbiólogo 3. Lab Hematología	HSJD	1995-actual

PUBLICACIONES

Artículos científicos:	Institución	Fechas
Mieloloma Múltiple y Células en Espejo. Congreso Nacional de Microbiología.	UCR	1984-actual
Síndrome de Sezary a propósito de un caso. Congreso Nacional de Microbiología.		1984, Costa Rica
Eosinofilia en la tercera edad. Congreso Nacional de Microbiología.		1984, Costa Rica

FIRMA

FECHA



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506)519-3044
www.cendeisss.sa.cr

CV-I FORMATO DE CURRICULO VITAE ABREVIADO

DATOS PERSONALES

Nombre completo: Berta Eugenia Valverde Rojas
Nacionalidad: Costarricense
Cédula de identidad: 1-490-386
Código profesional: 814
Lugar y fecha de nacimiento: San José, 14 de Setiembre, 1957
Centro de trabajo: Hospital Nacional de Niños
Teléfono del trabajo: 2222-4779
Teléfono celular: 8821-7620
Correo electrónico: luismorab@yahoo.com

EDUCACIÓN

Títulos obtenidos: grado	
Grado	Institución y año de graduación
Lic en Microbiología y Química Clínica	UCR, 1984-1991
Especialidad de Hematología	UCR, 1991-1992
Master <i>Scientiae</i> en Hematología	UCR, 1995- actual

EXPERIENCIA EN INVESTIGACIÓN

Investigaciones codirigidas: 4
Leucemia mielomonocítica crónica: una mielodisplasia singular a propósito de un caso. Rev. costarric. cienc. méd vol.18 no.4 San José Dec. 1997
Evaluación de parámetros plaquetarios en trombocitosis pediátrica. Rev. costarric. cienc. méd v.20 n.3-4 San José dic. 1999

EXPERIENCIA LABORAL

Posición	Institución	Fechas
Asistente de laboratorio en el Departamento Análisis Clínicos	UCR	1986-1988
Asistente laboratorio de Investigación en Hematología	HNN	1989-1995
Microbióloga 3, Lab investigación	HNN	1995-actual

EXPERIENCIA ACADÉMICA

Posición	Institución	Fechas
Profesora del curso de Hematología de Microbiología	UCR	1995-actual
Profesora de Maestría en Hematología	UCR	1995-actual

PUBLICACIONES

Libros publicados: 3
Artículos científicos: 14

FIRMA

FECHA

APÉNDICE 7. FORMULARIO DE ENSAYO DE UFC, AT Y CD34

FORMULARIO DE ENSAYOS UFC, AT y CD34



Caja Costarricense de Seguro Social
Hospital San Juan de Dios
Laboratorio de Hematología



Instituto Tecnológico de Costa Rica
Centro de Investigación en Biotecnología
TEC Laboratorio de Ingeniería en Tejidos

Instrucciones:

1. Complete toda la información en letra imprenta o a máquina.
2. Utilice bolígrafo de tinta azul o negra.
3. Utilice letra legible.
4. Al terminar el formulario entregar el original a la oficina de la jefatura del Laboratorio de Investigación en Hematología del Hospital San Juan de Dios y entregar una copia al encargado del proyecto del ITCR.

DATOS DE LA MUESTRA

Código asignado:	
Tipo de donador:	<input type="checkbox"/> Donador sano <input type="checkbox"/> Paciente _____
Tipo de muestra:	<input type="checkbox"/> Sangre de cordón umbilical pre-criopreservación. <input type="checkbox"/> Sangre de cordón umbilical post-criopreservación. <input type="checkbox"/> Producto de leucoféresis de sangre periférica pre-crio. <input type="checkbox"/> Producto de leucoféresis de sangre periférica post-crio. <input type="checkbox"/> Sangre periférica pre-crio. <input type="checkbox"/> Sangre periférica post-crio. <input type="checkbox"/> Médula ósea no criopreservada.
Número de leucocitos:	
Fecha de obtención de la muestra:	
Responsable de la obtención:	
Código profesional:	
Fecha de criopreservación:	
Responsable de la criopreservación:	
Código profesional:	

TRASLADO DE LA MUESTRA

Fecha de recepción:	
Hora y lugar de recepción:	
Responsable de la entrega:	
Hora y lugar de llegada:	
Responsable del traslado:	
Especificaciones del traslado:	<input type="checkbox"/> Hielera con hielo (muestras recién colectadas) <input type="checkbox"/> Tanque con nitrógeno líquido (muestras criopreservadas)
Incidentes ocurridos:	

RESULTADOS DEL LOS ENSAYOS

Conteo con Azul de tripán:	
Citometría para CD34:	
Ensayo de UFC:	

APÉNDICE 8. PREPARACIÓN DE MEDIOS

PREPARACIÓN DE MEDIOS

MethoCult GF H4434

Se dejó una botella de 100ml de MethoCult GF H4434 (#4434, StemCell Technologies) en refrigeración a 2-8°C durante la noche. Cuando el medio se observó totalmente descongelado, se mezcló vigorosamente por 1-2 minutos y luego se dejó reposar al menos 10 minutos para disipar las burbujas. Seguidamente, utilizando una jeringa *luer lock* de 3ml unida a una aguja de calibre 16 con extremo burdo (#28110, StemCell Technologies) se prepararon alícuotas de 3ml en tubos cónicos de 15ml (#21008-216, WWR) que se almacenaron a -20°C en un congelador Fischer Scientific (modelo Isotemp). Se registró el lote y la fecha de vencimiento.

Fosfato buffer salino de Dulbecco sin Ca²⁺ y Mg²⁺

Se preparó DPBS disolviendo 200mg de KCl (#P5405, Sigma), 200mg de KH₂PO₄ (#P5655, Sigma), 8000mg de NaCl (#S5886) y 1150mg de Na₂HPO (#S5136) por cada litro de agua bidestilada estéril. Se ajustó el pH a 7.4 ± 0.1 en un pHmetro WTW (modelo InoLab pH730) y se esterilizó por filtración con un filtro Millipore de 0.22µm (cat. YT30-142-HW).

Solución salina isotónica tamponada con fosfato

Se preparó PBS utilizando agua bidestilada estéril y tabletas de PBS (#P4417, Sigma). El buffer se autoclavó a 121°C y 1,2 kg/cm₃ durante 20 minutos en una autoclave Tomin (modelo TM-3210) y se almacenó a temperatura ambiente.

IMDM al 2%

Se preparó medio de Dulbecco modificado por Iscove suplementado con 10% de suero fetal bovino, para lo cual se utilizaron 2ml de SFB (#F4135, Sigma) por cada 100ml de IMDM (#12440-061, Invitrogen).

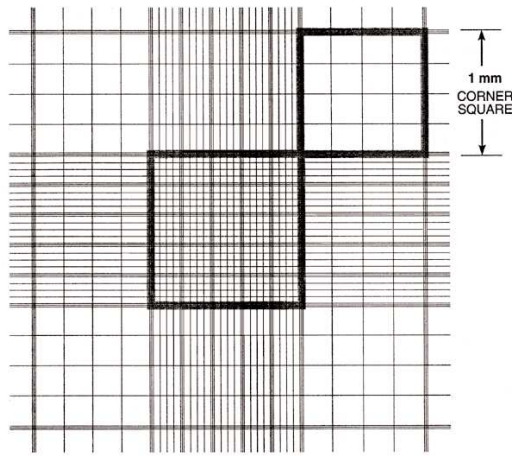
IMDM al 10%

Se preparó medio de Dulbecco modificado por Iscove suplementado con 10% de suero fetal bovino, para lo cual se utilizaron 10ml de SFB (#F4135, Sigma) por cada 100ml de IMDM (#12440-061, Invitrogen).

APÉNDICE 9. RECUENTO MANUAL CON AZUL DE TRIPÁN

RECuento MANUAL CON AZUL DE TRIPÁN

Esta técnica consiste en hacer el recuento de células en una dilución de muestra anticoagulada, utilizando como líquido diluyente solución fisiológica o solución salina isotónica tamponada con fosfato (PBS). El recuento se realiza en la cámara de Neubauer cuyo esquema es el siguiente:



Para el recuento se eligen los 4 cuadrantes de las esquinas de un retículo. Las líneas triples sirven únicamente como límites de cada cuadrante, que contiene 16 cuadrados pequeños. La superficie de este cuadrado es de 1mm^2 y la cámara tiene una profundidad de 0,1 mm.

Con la dilución indicada se carga la cámara y se cuentan las células mononucleadas de los 4 cuadrantes. La cámara puede ser cargada con un capilar o una micropipeta, evitando burbujas y efectuando una carga uniformemente.

Los cálculos para determinar el total de células viables por μl y el porcentaje de viabilidad son los siguientes:

$$\begin{aligned} \text{Células viables}/\mu\text{l} &= \text{promedio células viables por cuadrante} \times \text{dilución} \times 10 \\ \text{Porcentaje de viabilidad} &= \text{células vivas} \div (\text{células vivas} + \text{células muertas}) \times 100 \end{aligned}$$

El recuento manual de células tiene un error del 10%, el cual puede deberse a:

1. Errores de extracción: dilución o hemoconcentración. Coagulación parcial. Hemólisis.
2. Mala homogeneización por agitación insuficiente de la sangre.
3. Utilización de material mal calibrado, sucio o húmedo.
4. Falta de suficiente agitación de la sangre diluida.
5. Cámara de Neubauer mal ajustada, sucia o mojada.
6. Llenado incompleto de la cámara.
7. Empleo de cubreobjetos deformable, no rígido.
8. Células mal distribuidas en el fondo de la cámara.
9. Errores del operador al realizar el recuento.
10. Errores al efectuar los cálculos.

**APÉNDICE 10. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS
PARA EL ENSAYO DE UFC**

EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS PARA EL ENSAYO DE UFC

EQUIPOS

Producto	Marca	Modelo	Especificaciones
Baño de agua	Cole-Parmer	Polystat	Con control de temperatura
Cámara de flujo laminar	Telstar	BIO-II-AG	Certificada, Clase II
Pipeteador automático	Fisher Scientific	Standard	
Centrífuga	Fisher Scientific	AccuSpin1	
Vórtex	Scientific Industries	6-560	
Refrigerador de 2-8°C			
Congelador de -20°C	Fischer Scientific	Isotemp	
Hematocitómetro	Boeco	BOE 14	
Microscopio de luz	Novex	B-Range	
Microscopio invertido	Hund	Wlover 30	Objetivos 2X, 4X y 10X y filtro azul
Incubadora de CO ₂	Barnstead Int	397	Control de Temp, CO ₂ y humedad.

REACTIVOS

Producto	Casa Comercial	Catálogo #	Importador	Presentación
MethoCulth GF H4434	StemCell	H4434	Biología médica	100ml
MethoCulth GF H4434	StemCell	H4434	Biología médica	24x3ml
Histopaque 1077 Hybri-Max	Sigma	H8889	Analytical Instruments	500ml
IMDM 2%	StemCell	7700	Biología médica	500ml
PBS	Sigma	P4417	Analytical Instruments	50 tabletas
Azul de tripán 0,4%	Sigma	T8154	Analytical Instruments	100ml
MethoCulth GF	StemCell	H4434	Biología médica	100ml

OTROS MATERIALES

Producto	Casa comercial	Catálogo #	Importador	Presentación
Placas de cultivo, 35mm	StemCell	27100	Biología médica	10 uni/paq
Placas de cultivo, 100mm	StemCell	27125	Biología médica	10 uni/paq
Agujas extremo burdo	StemCell	28110	Biología médica	100 uni/paq
Tubos centrifugación cónicos, 15ml	WWR	21008-216	Analytical Instruments	100 uni/paq
Placa de puntuación cuadrículada	StemCell	27.500	Biología médica	5 uni/paq


**APÉNDICE 11. FORMULARIO INF-I
PRESENTACIÓN DE INFORMES (03/10/2008)**



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506)519-3044
www.cendeisss.sa.cr

Para uso administrativo

FORMULARIO INF-I PRESENTACIÓN DE INFORMES

Título del estudio: Estandarización del protocolo de ensayo de unidades formadoras de colonias de células progenitoras hematopoyéticas a partir de células mononucleadas de sangre periférica, sangre de cordón umbilical y médula ósea.	
Nombre del investigador principal: Stephanie Alvarado Valverde	
Número de protocolo SABI / CLOBI: R08-SABI-00024	
Fecha de expiración de la recomendación: 14/08/2009	
2. Estado del estudio <input checked="" type="checkbox"/> Activo (continúa con la preparación de medios, el procesamiento de muestras u otras actividades) <input type="checkbox"/> Seguimiento (reclutamiento cerrado-participantes continúan recibiendo tratamiento del estudio,) <input type="checkbox"/> Seguimiento (procesamiento terminado- seguimiento de participantes o análisis de datos continúa) <input type="checkbox"/> Concluido <input type="checkbox"/> Descontinuado	
3. Número de participantes (complete los 4 apartados) 50 Número total de participantes en el estudio según el protocolo 0 Número de participantes enrolados desde el inicio del estudio - Número de participantes enrolados desde el último informe de avance 50 Número de participantes que se procesarán en el futuro <i>Ninguna muestra se ha procesado debido a que se trabaja en el Laboratorio de Citogenética del Hospital Nacional de Niños.</i>	
4. Participantes que se han retirado del estudio (número y razones) Ninguno	
5. Resumen descriptivo de los eventos adversos (adjunte páginas separadas si aplica) Ninguno	
6. Resumen descriptivo de los resultados o beneficios (adjunte páginas separadas si aplica) Se han realizado los siguientes procedimientos: 1) Descongelación y dispensado del medio MethoCult, 2) Preparación y dispensado de DPBS, 3) Preparación y dispensado de PBS, 4) Preparación y dispensado del medio 2% IMDM, 5) Preparación y dispensado del medio 10 %IMDM. Además, se han efectuado pruebas preliminares con estos medios para descartar contaminación y para adquirir práctica en su manejo.	
7. Cambios en el protocolo <input type="checkbox"/> Recomendado por el COIBI-CCSS o el CLOBI (especifique fechas desde la última revisión) <input checked="" type="checkbox"/> No recomendado aún (adjunte revisiones/enmiendas o cambios para la revisión del COIBI-CCSS o CLOBI).	
8. Nueva información o riesgos no anticipados (adjunte páginas separadas, si aplica) Ninguno	
9. Adjuntos <input type="checkbox"/> Documento de consentimiento informado <input type="checkbox"/> Publicaciones o abstractos <input type="checkbox"/> Páginas agregadas (de continuación de información) <input type="checkbox"/> Reporte de estudios multicéntricos con información relevante <input type="checkbox"/> Otros	
Fecha: <u>03 / 10 / 08</u>	Firma del Investigador Principal: 

APÉNDICE 12. FORMULARIO INF-II
PRESENTACIÓN DE INFORMES (05/01/2009)



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
Área de Bioética
Subárea de Bioética en Investigación
Teléfono: (506)519-3044
www.cendeisss.sa.cr

Para uso administrativo

**FORMULARIO INF-II
PRESENTACIÓN DE INFORMES**

Título del estudio: Estandarización del protocolo de ensayo de unidades formadoras de colonias de células progenitoras hematopoyéticas a partir de células mononucleadas de sangre periférica, sangre de cordón umbilical y médula ósea.
Nombre del investigador principal: Stephanie Alvarado Valverde
Número de protocolo SABI / CLOBI: R08-SABI-00024
Fecha de expiración de la recomendación: 14/08/2009
2. Estado del estudio <input checked="" type="checkbox"/> Activo (continúa con la preparación de medios, el procesamiento de muestras u otras actividades) <input type="checkbox"/> Seguimiento (reclutamiento cerrado-participantes continúan recibiendo tratamiento del estudio.) <input type="checkbox"/> Seguimiento (procesamiento terminado- seguimiento de participantes o análisis de datos continúa) <input type="checkbox"/> Concluido <input type="checkbox"/> Descontinuado
3. Número de participantes (complete los 4 apartados) 50 Número total de participantes en el estudio según el protocolo 16 Número de participantes enrolados desde el inicio del estudio 16 Número de participantes enrolados desde el último informe de avance 34 Número de participantes que se procesarán en el futuro
4. Participantes que se han retirado del estudio (número y razones) Ninguno
5. Resumen descriptivo de los eventos adversos (adjunte páginas separadas si aplica) No se efectuó el conteo de UFC en las muestras MO-07, MO-08, MO-09, MO-10, MO-11, MO-12, MO-13, SP-01 y SP-02 pues se desecharon al evidenciarse crecimiento microbiano (ver página 2 adjunta).
6. Resumen descriptivo de los resultados o beneficios (adjunte páginas separadas si aplica) Se prepararon los medios necesarios y se procesaron 12 muestras de médula ósea de pacientes, 2 muestras de sangre periférica movilizada criopreservada de pacientes, 1 muestra de sangre periférica de paciente y 1 muestra de sangre periférica de donador sano (ver páginas 3 a 7 adjuntas).
7. Cambios en el protocolo <input checked="" type="checkbox"/> Recomendado por el COIBI-CCSS: aprobado el 13/11/2008, en la sesión 020-11-2008 (Certificado #020-2008) <input type="checkbox"/> No recomendado aún
8. Nueva información o riesgos no anticipados (adjunte páginas separadas, si aplica) Ninguno
9. Adjuntos <input type="checkbox"/> Documento de consentimiento informado <input type="checkbox"/> Publicaciones o abstractos <input checked="" type="checkbox"/> Páginas agregadas (de continuación de información) <input type="checkbox"/> Reporte de estudios multicéntricos con información relevante <input type="checkbox"/> Otros
Fecha: <u>05/01/09</u> Firma del Investigador Principal: _____