

Caracterización morfológica de las células de sangre de cordón umbilical

Morphological characterization of umbilical cord blood cells

Lidyce Quesada Leyva^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-8919-7054>

Yanet Lázara Fonseca Rey¹ <https://orcid.org/0000-0002-0135-3364>

Sandra Fernández Torres¹ <https://orcid.org/0000-0003-4447-9140>

Cira Cecilia León Ramentol¹ <https://orcid.org/0000-0002-2858-8884>

Elizabeth Nicolau Pestana¹ <https://orcid.org/0000-0003-1975-3419>

Ever Quintana Verdecía¹ <https://orcid.org/0000-0003-1305-1643>

¹Centro de Investigación y Productos Biológicos. Universidad de Ciencias Médicas. Camagüey, Cuba.

*Autor para la correspondencia: lidyce.cmw@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: El cordón umbilical se ha convertido en un elemento de interés para la medicina regenerativa en los últimos años, pues constituye una fuente importante de células madres y progenitores hematopoyéticos.

Objetivo: Caracterizar morfológicamente la sangre del cordón umbilical para terapia regenerativa en recién nacidos del Hospital Universitario Ginecobstétrico “Ana Betancourt de Mora”.

Métodos: Estudio observacional, analítico y transversal realizado en el Centro de Inmunología y Productos Biológicos de Camagüey, entre enero y diciembre de 2017. Se evaluaron 35 muestras de sangre del cordón umbilical obtenidas de recién nacidos, que fueron partos eutócicos y sus madres no tuvieron procesos de enfermedades infecciosas.

Resultados: El promedio mayor de células mononucleares correspondió a los linfocitos. En el conteo diferencial los polimorfonucleares neutrófilos ocuparon el primer lugar, seguido de los linfocitos, con medias de 0,50 y 0,46 x 10⁹/L, respectivamente. De las células presentes en el frotis del botón, fueron más frecuente los linfocitos con 0.59 x 10⁹/L; se observó un promedio de monocitos de 0,00-0,07 x 10⁹/L.

Conclusiones: La obtención de células mononucleares viables a través de la vena umbilical, constituye una técnica promisoría en las investigaciones biomédicas. Entre las células mononucleares predominaron los linfocitos, tanto en la sangre del cordón umbilical como en el botón celular aislado.

Palabras clave: cordón umbilical; células mononucleares; terapia regenerativa.

ABSTRACT

Introduction: In recent years, the umbilical cord has become an element of interest for regenerative medicine, based on its importance as a source of stem cells and hematopoietic progenitors.

Objective: To characterize the morphology of umbilical cord blood for regenerative therapy in newborns from Ana Betancourt de Mora Gyneco-obstetric University Hospital.

Methods: Observational, analytical and cross-sectional study carried out at the Center of Immunology and Biological Products in Camagüey, between January and December 2017. We evaluated 35 samples of umbilical cord blood obtained from newborns who were eutocic deliveries and whose mothers did not have infectious disease processes.

Results: The highest average of mononuclear cells corresponded to lymphocytes. In the differential count, neutrophil polymorphonuclear cells ranked first, followed by lymphocytes, with averages of 0.50×10^9 and 0.46×10^9 per liter, respectively. Of the cells present in the button cell smear, lymphocytes were more frequent, with 0.59×10^9 per L; an average of monocytes was observed, with $0.00-0.07 \times 10^9$ per L was observed.

Conclusions: Obtaining viable mononuclear cells through the umbilical vein is a promising technique in biomedical research. Among the mononuclear cells, lymphocytes predominated, both in the cord blood and in the isolated cell button. **Keywords:** umbilical cord; mononuclear cells; regenerative therapy.

Recibido: 10/07/2019

Aceptado: 04/10/2019

Introducción

Tanto la placenta humana como el cordón umbilical, fueron considerados por muchos años un material de desecho posparto. Sin embargo, a partir de las investigaciones realizadas en la década del 70 del siglo XX, las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) provenientes de las unidades de sangre de cordón umbilical (USCU) se utilizan en la terapia de diversas enfermedades hematológicas, así como en enfermedades quimio y radiosensibles.⁽¹⁾ Durante los últimos años, las CPH provenientes de las USCU se han aprovechado en terapia celular por las ventajas que presentan sobre las CPH de médula ósea y sangre periférica. No obstante, el poco volumen que se obtiene resulta en una pequeña cantidad de células CD34+; su uso se restringe, casi exclusivamente, a pacientes pediátricos o con peso corporal menor de 35 kg. Aunque se han desarrollado técnicas para superar esta limitación, como el uso de CPH proveniente de dos cordones umbilicales y la expansión celular *ex vivo*, estas alternativas se encuentran aún en investigación.^(2,3,4,5)

En los últimos tiempos, el cordón umbilical se ha convertido en un elemento de interés para la medicina regenerativa, pues representa la unión entre el feto y la madre durante el embarazo, interviene en la nutrición fetal y permite resistir las presiones intrauterinas y las tracciones fetales.^(6,7)

Se ha demostrado que el cordón umbilical de los recién nacidos tanto a término como pretérmino, contiene un número determinado de CPH inmaduros y comprometidos, resultado de la hematopoyesis fetal, que es el proceso fisiológico por el cual se produce la maduración de todos los tipos celulares que componen la sangre. Su funcionamiento correcto permite la formación de células responsables del transporte de oxígeno, de la coagulación sanguínea y la inmunidad.⁽⁸⁾

Las células madre (CM) presentes en la circulación fetal tienen características diferenciales con respecto a las del hígado y médula ósea fetales; su volumen se mantiene elevado durante toda la vida intrauterina hasta el momento del nacimiento.⁽⁹⁾ Las CM cumplen con dos propiedades fundamentales: son capaces de autorrenovarse y diferenciarse en múltiples tipos celulares hasta llegar a especializarse; además, son consideradas como CM adultas pluripotenciales. El proceso de diferenciación para adquirir compromiso de estirpe está condicionado por el microambiente en que se encuentran.^(9,10,11)

La sangre del cordón umbilical (SCU) es una fuente de diversos tipos celulares, entre ellos las células mononucleares, las que se incluyen: los monoblastos, los linfoblastos, los

linfocitos, los monocitos y los precursores eritrocíticos, proeritroblastos y eritroblastos.^(12,13.,14)

La obtención de células mononucleares constituye una técnica promisoriosa en las investigaciones biomédicas. El objetivo de este estudio es caracterizar morfológicamente la sangre del cordón umbilical para terapia regenerativa en recién nacidos del Hospital Universitario Ginecobstétrico “Ana Betancourt de Mora”.

Métodos

Se realizó un estudio observacional analítico transversal en el Centro de Inmunología y Productos Biológicos de Camagüey, entre enero y diciembre de 2017. Se evaluaron 35 muestras de USCU de recién nacidos; estos fueron partos eutócicos y sus madres no tuvieron procesos de enfermedades infecciosas concurrentes. Se obtuvo el consentimiento informado de las madres.

Las muestras fueron obtenidas en el Hospital Universitario Provincial “Ana Betancourt de Mora”. Estas fueron colectadas luego de pinzar el cordón umbilical y antes de producirse el alumbramiento. Se depositaron 10 mL de sangre venosa en tubo heparinizado. Una vez homogenizada la sangre con el anticoagulante y rotulado el tubo, se colocó en una gradilla de metal y previa conservación en cadena de frío fue trasladado hasta el laboratorio para su procesamiento final.

Para realizar el conteo diferencial de las células presentes en la sangre, obtención del botón celular y la coloración con azul tripán para determinar la viabilidad celular, se siguió la metodología descrita en los procedimientos del sistema de gestión de la calidad de la institución, que norma la realización de estos procedimientos.

Se determinaron los estadígrafos de tendencia central y dispersión de la morfología celular de la sangre del botón celular aislado y del cordón umbilical. Se utilizó la técnica de componentes principales para crear un constructo que incluyó las variables: conteo y la viabilidad celular en la sangre del cordón y del botón celular aislado. La información se organizó en una base de datos para su procesamiento con el paquete estadístico SPSS versión 21 para Windows. Los datos se procesaron con un nivel de confiabilidad del 95 %. Para el análisis de los resultados se empleó la estadística descriptiva e inferencial. Se presentaron los datos en tablas y gráficos.

Resultados

El mayor recuento del tipo de células mononucleares procedentes de la SCU observado fue de linfocitos, con una media de $0,46 \times 10^9/L$; con una desviación estándar de 0,10 y recuento mínimo de 0,23 y máximo de $0,61 \times 10^9/L$. Le siguieron las células linfomonocitarias con un promedio de $0,02 \times 10^9/L$, desviación estándar de 0,01 y recuento mínimo de 0,01 y máximo de $0,05 \times 10^9/L$; las células de tipo mieloblastos, linfoblastos presentaron promedios de 0,01 y $0 \times 10^9/L$ (Tabla 1).

Tabla 1- Recuento de células mononucleares de la sangre del cordón umbilical según el tipo celular

Tipo de célula mononuclear	Media ($\times 10^9/L$)	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Linfocitos	0,46	0,10	0,23	0,61
Monocitos	0,02	0,04	0,00	0,07
Mieloblastos	0,01	0,01	0,00	0,06
Monoblastos	0,00	0,01	0,00	0,02
Linfoblastos	0,01	0,01	0,00	0,03
Linfomonocitarias	0,02	0,01	0,01	0,05

En el conteo diferencial de las células de la SCU predominaron los neutrófilos y linfocitos, con medias de 0,50 y $0,46 \times 10^9/L$, respectivamente; no presentaron diferencias significativas (Tabla 2).

Tabla 2- Recuento diferencial de células de la sangre del cordón umbilical según el tipo celular

Tipo celular	Media ($10^9/L$)	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Polimorfonuclear neutrófilo	0,50	0,08	0,38	0,70
Linfocito	0,46	0,10	0,23	0,61
Monocito	0,02	0,02	0,00	0,07
Polimorfonuclear eosinófilo	0,02	0,02	0,00	0,08
Polimorfonuclear basófilo	0,00	0,00	0,00	0,02
Stab	0,00	0,01	0,00	0,05

De las células mononucleares presentes en el botón, fueron más frecuente los linfocitos, con $0,59 \times 10^9/L$ y una desviación estándar de 0,11; mientras que en el recuento de monocitos se observó un promedio de $0,004 \times 10^9/L$, con desviación estándar de 0,13 (Tabla 3).

Tabla 3- Recuento celular del frotis del botón según el tipo de célula mononuclear

Tipo de célula	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Linfocitos	0,59	0,11	0,40	0,91
Monocitos	0,004	0,013	0,00	0,07

Discusión

La sangre contenida en la vena umbilical presenta células precursoras, las cuales dan lugar a células maduras que se encuentran en la circulación fetal. Por esta razón, es frecuente encontrar diversos tipos celulares como linfoblastos, mieloblastos, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, monocitos en diferentes proporciones, que evidencian el grado de inmadurez inmunológica existente en el período neonatal.^(15,16,17)

La obtención de células mononucleares viables a través de la vena umbilical, constituye una técnica promisoriosa en las investigaciones biomédicas. En la cuantificación de las células mononucleares se incluyen los monoblastos, los linfoblastos, los mieloblastos, los linfocitos, los monocitos y las células linfomonocitarias encontradas en las muestras de SCU, como resultado de tres procesos importantes: hematopoyesis, migración celular y circulación fetal.^(16,17,18,19)

El número absoluto de neutrófilos segmentados se eleva tanto en los lactantes a términos como en los prematuros en las primeras 24 h de vida. Los granulocitos segmentados son las células predominantes en los primeros días de vida. Cuando sus cifras descienden, el linfocito se convierte en la célula más numerosa, que permanece así durante los primeros cuatro años de vida, lo cual explica el comportamiento de este conteo diferencial.⁽¹⁶⁾

El comportamiento acorde con la distribución normal de estas células sanguíneas, cuya proporción está en correspondencia con las funciones que desempeñan en el organismo, como se demuestra en los estudios de *Borstein* en España, evidencia que existe un mayor promedio de linfocitos con respecto a los monocitos.⁽¹⁸⁾

Estudios procedentes de bancos de SCU y la universidad chilena, describen que en un mL de sangre del cordón umbilical hay aproximadamente 8 000 progenitores de eritrocitos, de 13 a 24 000 progenitores mieloides, y entre 1 000 y 10 000 células madre pluripotenciales.^(20,21)

El comportamiento de los monocitos y los eosinófilos es similar al que se describe en la literatura, con un promedio de 0,02 en ambos casos. Estos resultados coinciden con lo observado por *Amo*,⁽²²⁾ que refiere que la fórmula leucocitaria se comportó de la siguiente manera: granulocitos ($51 \pm 8 \%$), linfocitos ($40 \pm 7 \%$), monocitos ($5 \pm 4 \%$), y un 4 % de otros tipos celulares, fundamentalmente eosinófilos.

Los resultados relacionados con el recuento celular del frotis del botón, según el tipo de célula mononuclear, coinciden además con los obtenidos por *Calatrava Ferreras*, en un estudio sobre células madre de cordón umbilical en el tratamiento de ataxias cerebelosas en Madrid.⁽²³⁾ En dicha investigación la fracción mononuclear se caracterizó a través del estudio de la expresión de antígenos hematopoyéticos y neurales durante cultivo, sin la adición de factores de crecimiento y citoquinas; se obtuvo una fracción de células adherentes, la mayoría linfocitos que expresaban antígenos hematopoyéticos.

En resumen, en la SCU obtenida en el Hospital Universitario Ginecobstétrico “Ana Betancourt de Mora” de Camagüey predominaron los linfocitos entre las células mononucleares, tanto en la sangre del cordón umbilical como en el botón celular aislado.

En el conteo diferencial fue mayor el número de polimorfonucleares neutrófilos.

Referencias bibliográficas

1. Fernández S, Reques B. Bases del tratamiento del cáncer en Pediatría: principios de la terapia multimodal. *Pediatr Integral*. 2016;20(7):465-74.
2. Santa Rita MT, García A, Cuan JR. Donación de sangre de cordón umbilical. Experiencia en Médica Sur. *Revista Invest Méd Sur*. 2009;16(2):50-4.
3. Fernández V, Ibañez G, Bello JM. Células troncales provenientes de sangre de cordón umbilical: de la investigación a la aplicación clínica. *Rev Med UV*. 2015; 15(1):45-52. 4. Ballen KK, Barker JN, Stewart SK, Greene MF, Lane TA. American Society of Blood and Marrow Transplantation. Collection and preservation of cord blood for personal use. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008 Mar;14(3):356-63. doi: 10.1016/j.bbmt.2007.11.005
5. Ávila L, Martínez C, Ávila J, Becerra A, Jaimes J, Gómez J. Caracterización de los procesos de obtención, transporte, procesamiento y criopreservación de las muestras de cordón umbilical, obtenidas de enero de 2006 a febrero de 2008 en el banco de células Stem de Colombia. *NOVA*. 2009;7(11):60-5.

6. Quesada L, León CC, Fernández S, Nicolau E. Células madre: una revolución en la medicina regenerativa. *MediSan*. 2017;21(5):574-81.
7. Rivero RA. Razones para un banco de sangre de cordón umbilical en el Instituto de Hematología e Inmunología de Cuba. *Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter*. 2013 [acceso 30/06/2019];30(1). Disponible en:
<http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/129>
8. López IM. Recuento de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical de madres sanas [Tesis]. Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala; 2008.
9. Pimentel G, Murcia B. Células madre, una nueva alternativa médica. *Perinatol Reprod Hum*. 2017;31(1):28-33.
10. Pievani A, Sacchetti B, Corsi A, Rambaldi B, Donsante S, Scagliotti V, et al. Human umbilical cord blood-borne fibroblasts contain marrow niche precursors that form a bone/marrow organoid *in vivo*. *Development*. 2017 [acceso 10/06/2019];144(6). Disponible en: <http://dev.biologists.org/content/develop/144/6/1035.full.pdf>
11. Garvuzova S, Ehrhart J, Sanberg PR. Cord blood as a Potential Therapeutic for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Expert Opinion Biol Ther*. 2017 Jul;17(7):837-51. doi: 10.1080/14712598.2017.1323862
12. Arévalo JA, Páez DM, Rodríguez VM. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *NOVA*. 2007;5(8):177-84.
13. Socarrás BB, del Valle LO, de la Cuétara K, Marsán V, Sánchez M, Macías C. Células madre mesenquimales: aspectos relevantes y aplicación clínica en medicina regenerativa. *Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter*. 2013 [acceso 10/06/2019];29(1). Disponible en: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/19>
14. Cortina L, Hernández P, López R, Artaza H, Dorticós E, Macías C, et al. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica para trasplante de células madre. Método simplificado. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2008 [acceso 10/06/2019];24(3).
Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892008000300004
15. Rodríguez VM, Cuéllar A, Cuspoca LM, Contreras CL, Mercado M, Gómez A. Determinación fenotípica de subpoblaciones de células madre derivadas de sangre de cordón umbilical. *Biomédica*. 2006;26(1):51-60.

16. Lichtman MA. Williams: manual de hematología. 8a edición. México: McGraw Hill; 2014.
17. Sarvaria A, Jawdat D, Madrigal JA, Saudemont A. Umbilical cord blood natural killer cells, their characteristics, and potential clinical applications. *Front Immunol.* 2017; 8:329.
18. Bornstein R. Desarrollo y estandarización de un banco de sangre de cordón umbilical [Tesis]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 1999.
19. Torres DC. Evaluación del recuento de progenitores hematopoyéticos de las unidades de sangre de cordón umbilical según criterios de celularidad NETCORD. Instituto Materno Perinatal de Lima [Tesis]. Lima: Universidad Mayor de San Marcos; 2014.
20. Petrini C. Ethical issues in umbilical cord blood banking: a comparative analysis of documents from national and international institutions. *Transfusion.* 2013;53(4):902-10.
21. Iqbal HMN, Dhama K, Munjal A, Khandia R, Karthik K, Dadar M, et al. Tissue Engineering and Regenerative Medicine Potentialities of Materials - Based Novel Constructs- A Review. *Curr Regen Med.* 2017 Jan;6(1):29-40.
22. Amo R. Los bancos de sangre de cordón umbilical: aspectos biomédicos y bioéticos. *Cuadernos Bioética.* 2009 [acceso 10/01/2018];20(2):[aprox. 10 p.]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/875/87512373005.pdf>
23. Calatrava L. Uso potencial del Factor de Crecimiento del Hígado (LGF) y células madre de cordón umbilical en el tratamiento de las ataxias cerebelosas [Tesis]. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2014.

Conflicto de intereses Los

autores declaran no tener conflictos de intereses.

Contribuciones de los autores

- Lidyce Quesada Leyva: Realizó búsqueda y organización de la información, diseño del trabajo, redacción y corrección el manuscrito, aprobación de la última versión presentada
- Yanet Lázara Fonseca Rey: Realizó diseño del trabajo, la obtención, análisis e interpretación de datos, y aprobación de la última versión presentada.

- Sandra Fernández Torres: Realizó contribuciones a la concepción y diseño del trabajo, aprobación de la última versión presentada.
- Cira Cecilia León Ramentol: Realizó diseño del trabajo, análisis e interpretación de datos, redacción y corrección del manuscrito, aprobación de la última versión presentada.
- Elizabeth Nicolau Pestana: Realizó búsqueda e interpretación de datos y aprobación de la última versión presentada.
- Ever Quintana Verdecía: Realizó búsqueda e interpretación de datos, la redacción, corrección del manuscrito y aprobación de la última versión presentada.