

Células Autólogas de la Sangre de Cordón Umbilical y Placenta para la Encefalopatía Hipóxica Isquémica. Estudio de Seguridad y Factibilidad.

Dra. Valeria Roca

Lab. de Procesamiento de Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH)
& Banco Público de Referencia Nacional de Sangre de Cordón Umbilical
Centro Regional de Hemoterapia - Hospital de Pediatría SAMIC Prof Dr JP Garrahan



Centro Regional
de Hemoterapia



Ministerio de Ciencia,
Tecnología e Innovación Productiva
Presidencia de la Nación



HOSPITAL MATERNO INFANTIL
Ramón Sardá



Hospital de Pediatría
Garrahan

Protocolo ENCEL

**Células Autólogas de la Sangre de Cordón Umbilical y Placenta para la
Encefalopatía Hipóxica Isquémica.
Estudio de Seguridad y Factibilidad.**

Investigador Principal: Dr. Claudio Solana

Aprobado por INCUCAI: Resolución N 273/13.



Desde 2008 - 10 años
Fundación Delfina Baratelli
Por la Prevención y Reparación de Lesiones Cerebrales
www.delfi.org.ar

La **Encefalopatía Neonatal Hipóxico Isquémica (EHI)** es una condición patológica expresada por depresión neonatal al nacimiento, la misma se asocia a alta mortalidad y la presencia de secuelas neurológicas en el largo plazo.

Daño en la EHI es un proceso complejo:

Fase primaria: es la fase aguda de la injuria hipóxica, con falla del metabolismo energético primario y muerte neuronal por necrosis

Fase latente: reperfusión de oxígeno y recuperación parcial del metabolismo oxidativo del cerebro

Fase de falla energética secundaria: el metabolismo puede deteriorarse nuevamente. Muerte neuronal por necrosis y por apoptosis.

TABLA 1. Clasificación de la encefalopatía hipóxico-isquémica de Sarnat y Sarnat

Categoría	Grado de encefalopatía (Sarnat y Sarnat)	
	Moderada	Grave
Nivel de conciencia	Letargo.	Estupor, coma.
Actividad espontánea	Disminuida.	Sin actividad.
Postura	Flexión distal. Extensión total.	Brazos extendidos y rotados internamente. Piernas extendidas con pies en flexión plantar forzada.
Tono	Hipotónico.	Flácido.
Reflejos primitivos	Reflejo de succión débil. Reflejo de Moro incompleto.	Ausencia de reflejo de succión y reflejo de Moro ausente.
Sistema autonómico	Pupilas contraídas. Bradicardia. Respiración periódica.	Variables, desiguales, no reactivas a la luz, dilatadas. Frecuencia cardíaca variable. Apnea.

Encefalopatía moderada



riesgo de muerte aprox 6%
discapacidad a largo plazo 30%

Encefalopatía severa



riesgo de muerte aprox 60%
discapacidad a largo plazo 100%

La **hipotermia terapéutica** es una estrategia que permite disminuir la mortalidad y la discapacidad mayor en este grupo de RN.

**Encefalopatía moderada
o severa**



riesgo de muerte o
discapacidad >30%

El Grupo de Trabajo Hipotermia Terapéutica del Comité de Estudios Feto-neonatales (CEFEN) de la Sociedad Argentina de Pediatría (SAP) elaboró recomendaciones para el tratamiento de estos pacientes.

- ✓ **Enfriamiento corporal** puede ser total o parcial (cabeza):
Temperatura objetivo de 33°C-34°C,
Hipotermia moderada debe ser mantenida durante 72 horas,
- ✓ Esta terapia debe utilizarse con los **criterios de inclusión** que fueron publicados en los estudios de investigación.
- ✓ Debe realizarse en **centros de alta complejidad** que permitan resolver las potenciales complicaciones.
- ✓ La **detección precoz** de estos niños es sumamente importante debido a la estrecha **ventana terapéutica** y a que, muchas veces, deben ser referidos a otros centros

Necesidad de terapias complementarias

La **SCU** se ha utilizado en modelos animales de asfixia y ACV, demostrando mejoras clínicas y permitiendo establecer potenciales ventanas terapéuticas.

Experiencia clínica demuestra que el procesamiento de la SCU y la infusión en recién nacidos es segura.

THE JOURNAL OF PEDIATRICS • www.jpeds.com

ORIGINAL
ARTICLES

Feasibility of Autologous Cord Blood Cells for Infants with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy

C. Michael Cotten, MD¹, Amy P. Murtha, MD², Ronald N. Goldberg, MD¹, Chad A. Grotegut, MD², P. Brian Smith, MD¹, Ricki F. Goldstein, MD¹, Kimberley A. Fisher, PhD¹, Kathryn E. Gustafson, PhD³, Barbara Waters-Pick, BS, MT(ASCP)⁴, Geeta K. Swamy, MD², Benjamin Rattray, MD¹, Siddhartha Tan, MD⁵, and Joanne Kurtzberg, MD⁶

Feasibility of Autologous Cord Blood Cells for Infants with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy

C. Michael Cotten, MD¹, Amy P. Murtha, MD², Ronald N. Goldberg, MD¹, Chad A. Grotegut, MD², P. Brian Smith, MD¹, Ricki F. Goldstein, MD¹, Kimberley A. Fisher, PhD¹, Kathryn E. Gustafson, PhD³, Barbara Waters-Pick, BS, MT(ASCP)⁴, Geeta K. Swamy, MD², Benjamin Rattray, MD¹, Siddhartha Tan, MD⁵, and Joanne Kurtzberg, MD⁶

Objetivo:

Factibilidad y seguridad de la infusión de SCU autóloga fresca a neonatos con diagnóstico de EHI

Diseño:

- Neonatos con diagnóstico de EHI, en hipotermia terapéutica con SCU autóloga.
- Hasta 4 dosis de SCU fresca (reducida en volumen y glob rojos)
- Concentración: $1-5 \times 10^7$ células /dosis.

Table I. Baseline characteristics

	Cell recipients mean (range) or n (%) n = 23	Concurrent cooled mean (range) or n (%) n = 82	P
Gestational age, wk	38 (34, 40)	39 (34, 41)	.10
Birth weight, kg	3130 (2120, 4660)	3310 (1850, 4840)	.67
Abruption	1 (5)	9 (12)	.44
Cord prolapse	3 (14)	2 (3)	.08
Non-reassuring fetal status	9 (41)	23 (32)	.45
Cesarean delivery	16 (70)	48 (59)	.47
Outborn	6 (26)	73 (88)	<.001
SGA*	1 (5)	7 (8)	.45
LGA	2 (9)	6 (7)	.99
Males	10 (44)	56 (68)	.05
African American†	10 (50)	32(40)	.52
5 min Apgar ≤5	19 (83)	61 (75%)	.58
10 min Apgar ≤5	14 (61)	42 (57%)	.81
Cord pH	6.99 (6.72, 7.26)	6.96 (6.48, 7.44)	.82
Base Deficit	17 (8, 32)	18 (3, 36)	.70
Cord pH <7	13 (57)	47 (61)	.44
Base deficit >16	18 (78)	65 (78)	.99
NICHD score‡	23 (15, 39)	20 (8, 59)	.64
NICHD score ≥30	5 (22)	23 (27)	.79
Seizures	5 (22)	29 (35)	.17

SGA, small for gestational age; LGA, large for gestational age.

*Small and large for gestational age measurements were defined using growth charts from US births.²⁴

†20 cell recipients and 80 concurrently cooled with race reported.

‡NICHD score is an estimate of likelihood of positive outcome with cooling.

Table II. Characteristics of cord blood collections

	Median (range) or n (%)
Volume collected, mL	36 (3, 178)
Number of cells collected ($\times 10^6$)	4.8 (0.99, 48.3)
Number of cells post-processing ($\times 10^6$)	4.1 (0.97, 31.2)
Viability	99 (92, 100)
CFU ($\times 10^5$)	14.2 (0.8, 75.3)
CD34 ($\times 10^6$)	0.03 (0.004, 0.158)
Time to first infusion, h	25 (4, 220)
≤6 h	6 (26)
>6 h	17 (67)
Number of infusions	
4	11 (48)
3	3 (13)
2	6 (26)
1	3 (13)
Infusion volume, mL	4.3 (1.1, 10)

CFU, colony forming units.

**Feasibility of Autologous Cord Blood Cells for Infants with
Hypoxic-Ischemic Encephalopathy**

Conclusión general:

A partir de sus resultados, concluyeron que la infusión de células autólogas de SCU para la EHI es factible y que un ensayo aleatorizado, doble ciego es necesario.

Otras conclusiones:

Colaboración multidisciplinaria. Necesidad de capacitar y reforzar el estado de alerta para detectar los casos, realizar la colecta de SCU (obstétricos, neonatólogos, enfermeros y técnicos).

Protocolo ENCEL

**Células Autólogas de la Sangre de Cordón Umbilical y Placenta para la
Encefalopatía Hipóxica Isquémica.
Estudio de Seguridad y Factibilidad.**

El **objetivo** de este estudio es evaluar si la infusión de células autólogas de la sangre de cordón inmediatamente después del daño hipóxico al SNC minimizará el daño neurológico y resultará en un mejor desenlace clínico cuando se utiliza junto con la hipotermia moderada.

Se evaluará factibilidad y seguridad.

Objetivos específicos de este ensayo

- FACTIBILIDAD! Existe una ventana terapéutica (hasta 24 horas para la primer infusión)
- SEGURIDAD

Elección de candidatos (N=12)

- Cumplir con los criterios de inclusión y exclusión en el programa de hipotermia
- Tener colecta de SCU
- Firma del Consentimiento informado

Quienes participan? Maternidad Sardá

Obstetricia

- Indicación de colecta SCU
- Identificación de bolsa de SCU**

Hemoterapia

- Avisar al BSCU
- Almacena la colecta hasta que el BSCU la retira
- Recibe las dosis para infusión

T. Int. Neonatología

- Evalua EHI

Enfermeras y auxiliares

- durante todo el proceso

VENTANA TEMPORAL

<6 HORAS

HIPOTERMIA

**<12 HORAS IDEAL
(HASTA 24HS)**

INFUSIÓN

Quienes participan? Hospital Garrahan

Colecta

- Retira la colecta
- Realiza las entrevistas
- Obtiene las muestras de sangre materna para los controles
- Realiza el transporte con el producto a la maternidad

Lab de procesamiento

- Procesa y fracciona la SCU
- Acondiciona las dosis para el transporte
- Deriva las muestras para los distintos controles

VENTANA TEMPORAL

<6 HORAS

HIPOTERMIA

**<12 HORAS IDEAL
(HASTA 24HS)**

INFUSIÓN

- La **Resolución 119/2012 del INCUCAI** para Elaboración de Preparaciones Celulares establece que el centro Elaborador de Productos Celulares (EPC) debe **identificar los trabajos de validación** requeridos para controlar operaciones particulares en protocolos de investigación.
- En estos casos, la SCU es recolectada, procesada, fraccionada y el producto final es **infundido fresco** hasta **72 horas** después del nacimiento de recién nacidos con este diagnóstico.

Validación de este procedimiento.

Objetivo general

Determinamos la viabilidad, esterilidad y condiciones de:

- Procesamiento
- Fraccionamiento
- Acondicionamiento para su transporte
- Almacenamiento hasta el momento de uso del producto final.

Metodología

Diseño

•Muestras:

*10 Unidades de SCU

•Procedimiento

De acuerdo a los POEs de rutina

Recolección

Transporte

Procesamiento



•Recolección de data:

•Criterios de aceptación:

*Viabilidad > 70%
* esterilidad

Nuevo diseño

Fraccionamiento

Empaquetado & Transporte

Jeringas con dosis únicas

36°C; 2 hs

4°C



48 hs

72 hs

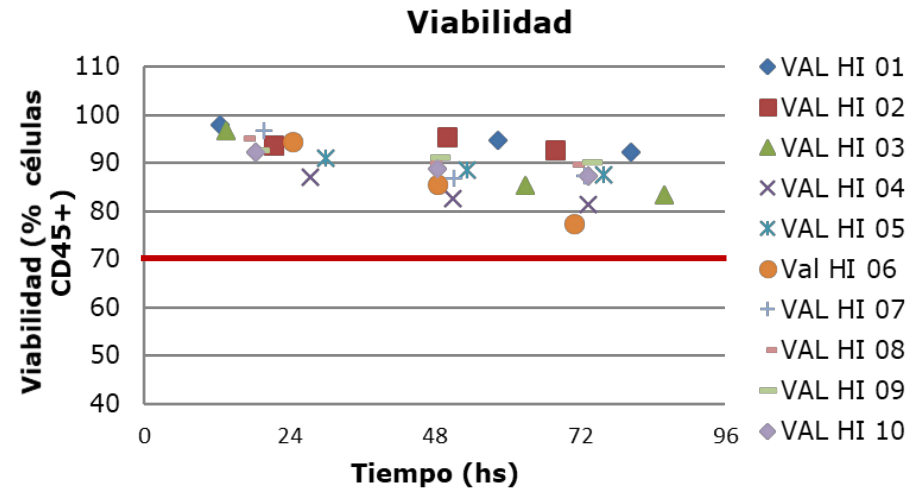
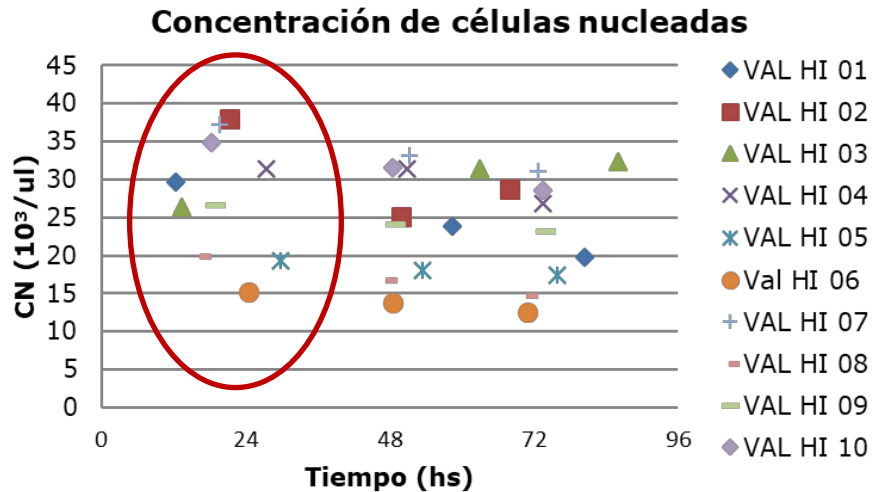
*viabilidad
*CFU
*Esterilidad

*temperatura

*viabilidad
*CFU

*viabilidad
*CFU
*Esterilidad

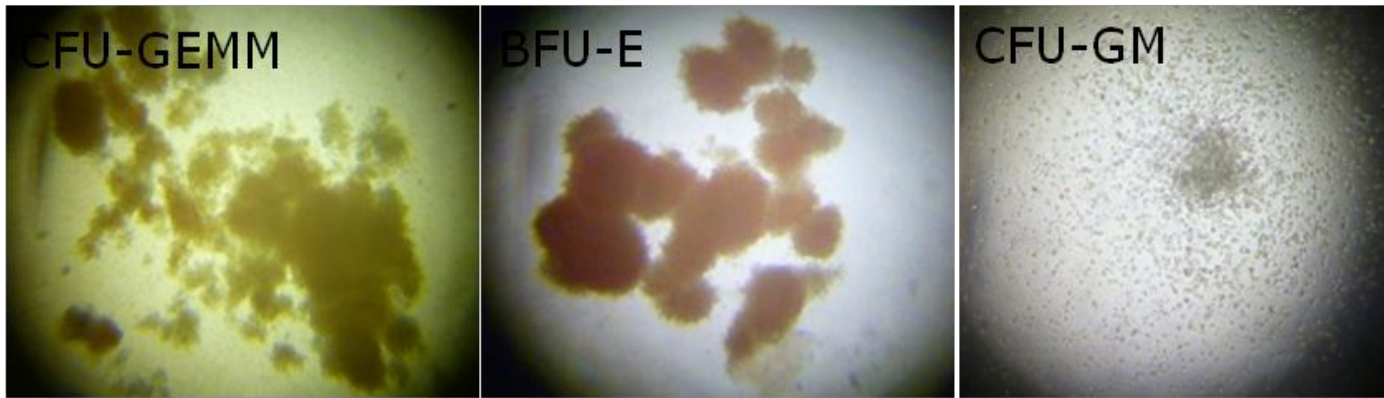
Resultados



Observamos un porcentaje de viabilidad mayor al 70% en todas las unidades evaluadas, a todos los tiempos, independientemente de la concentración inicial.

Resultados

Ensayo funcional: UFC



Observamos crecimiento de UFC en todas las muestras y tiempos estudiados

Simulación de transporte:

El rango de temperatura registrado dentro de la conservadora durante las 2 horas a 36°C fue de 4-22°C

Resultados

Esterilidad: hemocultivos



Post-procesamiento		72 hs	
aerobic	anaerobic	aerobic	anaerobic
↓	↓	↓	↓
Neg (10/10)	Neg (10/10)	Neg (10/10)	Neg (9/10)

Encontramos 1 cultivo positivo para microorganismos anaeróbico a las 72hs.

Streptococcus viridans fue detectado a las 40,9 horas.

- *Streptococcus viridans* es un microorganismo comúnmente encontrado en la flora vaginal y oral.
- De acuerdo a reportes previos, el tiempo medio de detección de este agente es $19,8 \pm 0,3$ horas para 100 UFC/ml y de $21,4 \pm 0,6$ horas para 10 UFC/ml. (Transfusion, 2004, 44(8):1174-8)

Conclusiones de la validación.

1) Las condiciones de :

- Procesamiento
- Fraccionamiento
- Acondicionamiento para su transporte
- Almacenamiento hasta el momento de uso del producto final

usadas **no afectan significativamente la viabilidad y funcionalidad** de las células.

2) Podemos definir un margen de **2 horas** para realizar el **transporte** de las dosis hacia los centros de infusión (incluso en condiciones desfavorables de temperatura).

3) Si bien no es posible definir la fuente de contaminación, el microorganismo identificado corresponde a un aerobio facultativo comúnmente hallado en la flora vaginal y oral.

Conclusiones finales

- 1) El BSCU identificó los puntos críticos con respecto al:
 - Procesamiento
 - Fraccionamiento
 - Acondicionamiento para su transporte
 - Almacenamiento hasta el momento de uso del producto final
- 2) Realizó la validación correspondiente
- 3) Se definió el procedimiento (POE) y se capacitó al personal involucrado en el BSCU (colecta de SCU y laboratorio de procesamiento)
- 4) Se diseñó la base de datos para registrar los casos clínicos

Banco de Sangre de Cordón Umbilical:

Directora Médica:

Dra. Silvina Kuperman

Área de Calidad:

Bqco. Sebastian Oknaian

Directora de Laboratorio:

Lic. Cecilia Gamba

Equipo de colecta:

Téc. Luciana Scalercio

Téc. Iris Gimenez

Téc. Florencia Velloso

Bioq. Florencia Coria

Lic. Dolores Polop

Téc. Laura Lazo

Laboratorio de procesamiento:

Bioq. Ana Agustina Miguel

Biól. María del Rosario Silvestri

Lic. Roberto Matías Ghiguly

Lic. Romina Sainz

Lic. Carolina Bentham

Bioq. Guadalupe Mougán

Laboratorio de Histocompatibilidad:

Bioq. Cintia Yanina Marcos

Bioq. Daniela Fernández Souto

Dra. Stella Maris García

Bioq. Gustavo Wildfeuer

Laboratorio de Investigación:

Dra. Valeria Roca

Lic. Julieta Rosello

Muchas gracias

vroca@garrahan.gov.ar