

Células autólogas de la sangre del cordón umbilical y placenta para la encefalopatía hipóxica-isquémica. Estudio de Seguridad y Factibilidad.

Protocolo Argentina: CL Solana, A del Pozo, N Balanian, S Kuperman, C Gamba, M Procacci Ríos

Protocolo Original Duke University: CM Cotten, RN Goldberg, RF Goldstein, JM Provenzale, A Song, J Kurtzberg.

Fecha de la versión original: 30/09/2009

Fecha de la versión Argentina: 02/08/2011

Contacto: Dr. Claudio Solana

claudiosolana@gmail.com

Cel.: 15-4444-6489

Objetivo del estudio

Evaluar la seguridad y factibilidad de las infusiones de células autólogas de la sangre del cordón umbilical, de volumen reducido, en dosis fraccionadas, en recién nacidos con encefalopatía hipóxica isquémica.

Diseño del estudio: estudio clínico preliminar de diseño abierto. El trasplante autólogo de células madre será desenmascarado.

Tamaño de la muestra: 12 recién nacidos.

Criterios de aptitud: las madres tienen que haber prestado su consentimiento para la recolección de sangre del CU (cordón umbilical) en el momento del nacimiento y la sangre del CU debe estar disponible para la extracción de células madre. Los recién nacidos aptos son los que tienen >36 semanas de gestación con un pH < 7,0 (cordón o neonatal precoz) o déficit basal <16 mEq/L ó antecedentes de un episodio perinatal agudo y un Apgar de 10 minutos <5, o una necesidad permanente de ventilación. Todos los bebés deben presentar signos de encefalopatía hipóxica isquémica (EHI) dentro de las primeras 6 horas del nacimiento. Para demostrar la viabilidad y comenzar a evaluar la seguridad, planificamos reclutar a 12 recién nacidos. Toda la sangre del CU utilizada en el estudio debe aprobar los controles de calidad del Banco Nacional de Sangre del Cordón Umbilical del Hospital Garrahan antes de usarse en el estudio.

Participación en el estudio: las células madre autólogas de la sangre del CU serán recolectadas durante la tercera etapa del parto o inmediatamente después del alumbramiento de la placenta de los recién nacidos cuyas madres ya han prestado consentimiento informado escrito, o, en ausencia del consentimiento informado otorgado por escrito, consentimiento verbal para la recolección de sangre del CU. La sangre del CU será de volumen reducido y se fraccionará en un mínimo de cuatro partes siguiendo los procedimientos operativos estándares aceptados provistos por el Banco de Sangre de CU. Se refrigerará un máximo de cuatro porciones para este protocolo, y todas las porciones restantes serán congeladas. Para los bebés que reúnan los criterios de ingreso al estudio, la primera dosis de células será infundida en forma intravenosa lo

antes posible, con un tiempo meta que está dentro de las 72 horas post nacimiento, utilizando los procedimientos operativos estándares del Banco de Sangre del CU Htal. Garrahan. La segunda dosis de células se administrará a las 24 horas de la primera dosis, y así sucesivamente para la tercera y cuarta dosis. La administración de todas las dosis de células dentro de las primeras 72 horas del nacimiento evitará la necesidad de congelar y después descongelar las células de la sangre del CU para este estudio. Si se dispone de <4 porciones de células, se administrarán la dosis inicial y las subsiguientes (por ejemplo, si hay dos porciones: se administrará la inicial y la siguiente a las 24hs.). Si la primera dosis se administra entre las 12 y las 24 horas después del nacimiento, entonces sólo se darán 3 dosis, y la segunda será a las 48 horas del nacimiento. Se controlará la toxicidad de las infusiones y la incidencia de infección que puedan asociarse al producto que se utiliza en la terapia celular. Como parte de los cuidados de rutina a los recién nacidos con EHI, se realizarán RM (resonancia magnética) en todos para evaluar la neuropatología entre 1 y 4, en forma ideal entre 1 y 2 semanas después del nacimiento, ya que las imágenes en este momento han podido predecir con exactitud un posterior deterioro (Biagioni 2001, Baumgart 2001). También se recolectará la información de los escaneos de RM repetidas que se realizan con posterioridad por indicaciones clínicas. Para el estudio, se hará otra RM a los 4 -6 meses post nacimiento para evaluar el desarrollo cerebral desde el daño inicial. Durante esta RM y la que fue inicialmente indicada, se incluirá un tiempo adicional de RM de 5 -10 minutos de para permitir recolectar nuevos datos para categorizar el daño de sustancia blanca. Los recién nacidos con EHI reciben un seguimiento de rutina para evaluar las consecuencias neurológicas a los 4 - 6 y 9 - 12 meses en el Consultorio de Recién Nacidos de Alto Riesgo de la Maternidad Sardá. Para este estudio se realizarán pruebas más profundas en estos períodos, y se agregará un estudio adicional inmediatamente antes del alta y al mes de ella.

Se controlará la condición cardiorrespiratoria, renal, metabólica y hematológica y la temperatura de la piel abdominal y esofágica durante las 72 horas del enfriamiento, junto con la administración de células como práctica de rutina.

Criterios de valoración: los principales criterios de valoración de este estudio son la seguridad y factibilidad de la administración de células autólogas de la sangre del CU a recién nacidos con encefalopatía hipóxica isquémica. Las complicaciones de la infusión de sangre del CU podrían incluir infección, exceso de volumen, hipertensión, reacciones alérgicas o anafilácticas, hiperviscosidad o edema pulmonar, y serán controladas durante y después de la infusión. Los índices de episodios adversos que suceden en esta población de alto riesgo en este estudio clínico preliminar se compararán entre los receptores de células madre de la sangre del CU y los controles históricos de los estudios de hipotermia (Shankaran 2005). La viabilidad de la infusión de células madre de la sangre del CU se controlará y describirá para la coordinación de procedimientos para recolectar, preparar y administrar las células madre de sangre del CU.

Los criterios de valoración secundarios de este estudio clínico preliminar incluirán la eficacia inicial medida por la función del desarrollo neuronal a los 4 -6

meses y 9 -12 meses de edad, frecuencia de trastornos convulsivos o epilépticos, ceguera y nivel de discapacidad neurológica general. Además, se recolectarán los resultados de las imágenes neurológicas y se compararán con los resultados disponibles provenientes de ensayos anteriores en este grupo.

Cálculo del tamaño de la muestra: el tamaño de esta muestra es estándar para la fase I del ensayo de seguridad y factibilidad. No se extraerán conclusiones acerca de la eficacia de este ensayo, debido al tamaño extremadamente pequeño de la muestra y la falta de un grupo comparativo concurrente.

Resumen

Este estudio analizará si la recolección, preparación e infusión de hasta cuatro dosis de células madre autólogas de la sangre del CU en las primeras 72 horas después del nacimiento a recién nacidos con encefalopatía hipóxico-isquémica es factible y segura, o no.

Si la Fase I de este estudio es exitosa, seguiremos evaluando la seguridad y eficacia inicial de un estudio aleatorizado más grande Fase II, en el que la mitad de los sujetos inscriptos reciben placebo y la mitad recibe células madre de la sangre del CU.

A. EXPOSICIÓN DEL PROBLEMA

El daño hipóxico-isquémico permanece como una causa importante del daño cerebral adquirido en forma perinatal en recién nacidos a término. La incidencia de muerte o daño neurológico grave después del daño cerebral hipóxico-isquémico a partir de la asfixia perinatal aguda es de 0,5 a 3 cada 1000 nacimientos con vida en los países desarrollados (Finer 1981, Levene 1985, Thornberg 1995, Graham 2008). En los países en desarrollo, la asfixia perinatal parece ser más común (al-Alfry 1990, Airede 1991, Boo 1991, Kinnoti 1993, Singh 1991). Por lo tanto, es probable que el daño cerebral hipóxico-isquémico perinatal produzca una gran carga de discapacidad en todo el mundo (Evans and Levene 1998).

La presencia de encefalopatía neonatal es un fuerte indicio de mortalidad y de consecuencias a largo plazo después del daño cerebral perinatal (Volpe 1994). Si se presenta encefalopatía moderada, el riesgo de muerte es de 6% y hasta el 30% de los sobrevivientes tienen discapacidades físicas en la infancia. Si se presenta encefalopatía grave, la mortalidad es alta (hasta 60%) y muchos, sino todos los que sobreviven (100%) quedan minusválidos (Low 1985, Robertson 1997, Shankaran 1991, Dixon 2002).

Teniendo en cuenta que hay 700.000 nacimientos por año en la Argentina, los episodios que ocurren durante el parto estarían etiológicamente relacionados con aproximadamente 250 casos de parálisis cerebral en recién nacidos a término anualmente (Perlman 1997). Las consecuencias devastadoras y duraderas del daño cerebral hipóxico-isquémico perinatal se acentúan con la impotencia frustrante de la

mayoría de las opciones terapéuticas (du Plessis 1998). Las terapias de rescate basadas en mecanismos en modelos de animales se han traducido en ensayos clínicos. La hipotermia moderada inducida parece ser la terapia neuroprotectora más prometedora que ha surgido de los estudios tanto en animales como en adultos con daño cerebral. Dos estudios de hipotermia moderada sugieren enfáticamente la eficacia de la hipotermia para recién nacidos con asfixia (Shankaran 2005, Gluckman 2005); sin embargo, en ambos estudios, la incidencia de muerte o encefalopatía moderada a grave desafortunadamente permanece mayor al 40%, con lo cual se necesitan terapias complementarias.

Se ha demostrado que la infusión de células madre de la sangre del CU inmediatamente después del nacimiento mejora los resultados clínicos y amplía la ventana terapéutica en modelos de animales con asfixia y ACV (accidente cerebrovascular). Se han establecido las técnicas para el cultivo, preparación, criopreservación, almacenamiento y administración y que se utilizan en las prácticas clínicas de rutina en el trasplante de células hematopoyéticas en humanos (Kurtzberg, Transfusion 2005). La infusión intravenosa de células madre autólogas de sangre del CU de volumen reducido a recién nacidos conlleva un riesgo mínimo (Sun 2010, Young-Ho Lee 2012). También se comprobó que la previa recolección de glóbulos rojos a recién nacidos es segura (Bifano 1994, Brune 2002). La principal limitación de la infusión de células nucleadas autólogas de la sangre del CU es el volumen. Las técnicas estándares para la reducción de volumen mediante la disminución de glóbulos rojos y plasma se pueden aplicar para crear un producto celular de la sangre del CU que contenga una cantidad potencialmente beneficiosa de células en un volumen que sea seguro para el paciente recién nacido (por ejemplo, <10 cc/kg). La experiencia clínica en >5000 niños, >3000 adultos y lo más importante, >20 recién nacidos con trasplante de sangre del CU humano ha demostrado que se puede preparar una dosis determinada de células para infundir <2 horas después de su recolección e infundirla en recién nacidos en forma segura (Staba 2005, Escolar 2005). A partir de este trabajo, la infusión de 30 - 200 millones de células/kg como dosis única ha sido tolerada sin problemas y se pueden hacer cálculos de una dosis celular razonable para este ensayo.

El objetivo primordial de este estudio y estudios subsiguientes es probar la hipótesis central que la infusión de células autólogas de la sangre del CU inmediatamente después del daño hipóxico al SNC minimizará el daño neurológico y resultará en un mejor desenlace clínico cuando se utiliza junto con hipotermia moderada, y cuando se utiliza en recién nacidos en los que la hipotermia no es factible. El protocolo del estudio preliminar propuesto evaluará la factibilidad, seguridad y eficacia preliminar de este enfoque.

B. ANTECEDENTES

Mecanismos del daño después de la asfixia aguda

Se han revisado recientemente los mecanismos del daño después de la asfixia aguda y las potenciales estrategias para la protección neuronal (du Plessis and Johnston

1997, Gluckman 1996, Williams 1997). Un episodio de asfixia aguda grave puede disparar una cascada de eventos que conduzcan a una deficiencia en la energía celular, daño celular y muerte. El daño celular se ha descrito como “primario” y “secundario”. El daño primario resulta del traumatismo de asfixia inicial, en tanto el secundario sucede después de un período latente (posiblemente 6 - 15 horas después) durante la recuperación del traumatismo. Si la primera lesión es grave, algunas células no se recuperan y el daño es irreversible. Si es menos grave, puede haber recuperación parcial con una posterior muerte celular. La cascada de procesos que conducen al daño secundario no queda claro, pero los mecanismos bioquímicos que siguen han demostrado: (a) la acumulación de lactato y piruvato, (b) acumulación de aminoácidos excitatorios (AA) debido a la excesiva producción y menor recaptación de neurotransmisores, (c) liberación de óxido nítrico sintasa (NOS), (d) producción de radicales libres (superóxido, peróxido de hidrógeno, hierro), (e) acumulación de calcio, sodio y cloruro intracelular, y (f) peroxidación lipídica. La elevación del calcio intracelular parece matar las células por activación de las proteasas, lipasas, proteínas kinasas C y la generación de radicales libres. Los radicales libres provocan daño a los tejidos atacando los lípidos plasmáticos llevando a la fragmentación de la membrana. El exceso de NO también es neurotóxico. Estos factores bioquímicos actúan en minutos hasta horas para provocar una deficiencia energética secundaria y necrosis neuronal tardías que culminan en una muerte o apoptosis celular programada. Se ha demostrado que la apoptosis sucede debido a la pérdida de factores de crecimiento y el aumento de la actividad de las células inflamatorias.

Terapias potenciales

Los datos de estudios en animales demuestran que: (a) el daño cerebral comienza durante la hipoxia-isquemia y empeora durante la recuperación. Durante la Hipoxia-isquemia, el flujo sanguíneo en el encéfalo es lento, hay pérdida de sustratos y las células están acidófilas; (b) el daño secundario ocurre durante la recuperación de la hipoxia-isquemia cuando se restituyen la perfusión y la oxigenación (daño de la reperfusión). El flujo sanguíneo cerebral generalmente es alto, el pH puede ser normal o alto. Este período puede durar hasta 8 horas después de la resucitación; (c) el daño secundario puede ser mejorado por procedimientos iniciados durante la recuperación (por ejemplo, terapias que apunten a reducir la acumulación de aminoácidos (AA) o calcio intracelular (du Plessis and Johnson 1997, Vannucci and Perlman 1997).

La estrategia de rescate ideal debe tener una ventana terapéutica post-traumatismo clínicamente viable, debe bloquear rápidamente múltiples cascadas dañinas en puntos críticos y debe brindar una fuerte protección celular a las estructuras cerebrales más vulnerables (du Plessis 1998). Es irreal que vaya a existir una “bala mágica” que sea efectiva después de la lesión; se necesita evaluar una combinación de tratamientos. El trasplante autólogo de células madre puede resultar mínimamente riesgoso en los tratamientos actuales y brindaría nuevos beneficios.

Ventana terapéutica

Se desconoce la duración de la ventana terapéutica para iniciar la terapia de rescate después de la resucitación, pero parece ser no mayor de 2 a 6 horas (Gunn 1998b, Thoresen and Wyatt 1997, Williams 1997). El desafío para el médico es la identificación bien temprana de los recién nacidos adecuados para el tratamiento. El objetivo de toda neuroprotección debe ser interferir con mecanismos antes o durante las etapas iniciales de la muerte neuronal tardía. En modelos animales, el rescate neuronal funcional puede suceder en horas y posiblemente en días después de que ocurrió el daño. Se describen más adelante los beneficios de los mecanismos neurotrópicos y otros mecanismos regenerativos de células madre, que pueden incluir una ventana terapéutica más amplia en la que la intervención hasta 72 horas después del daño brindaría beneficios.

¿En qué se basa el uso de Células Madre de la Sangre del CU? Antecedentes e Importancia

La sangre del CU humana (SCUH) es rica en células madre y progenitoras movilizadas por señales producidas en la placenta para que circulen a través de la sangre fetal y desarrollen tejidos mientras el feto madura (Broxmeyer 1989,1992, 2001, 2002; Lu 1993; Hao 1995; Alakahata 1982). La SCU, comparada con la médula ósea, contiene células con mayores capacidades proliferativas y de autorenovación (Broxmeyer 2002). Además de su función en el desarrollo normal sin inconvenientes, las células y factores que contiene la SCUH pueden facilitar y mejorar la reparación endógena y la plasticidad después del daño al cerebro o a la médula espinal (Chopp 2002).

Una serie de estudios demostró que la médula ósea o las células de la SCUH, cuando se infunden en animales recién nacidos y en animales adultos con accidente cerebrovascular (ACV), daño térmico, isquemia, hemorragia intracraneal o daño en la médula espinal, dan como resultado una dramática recuperación del daño neuronal (Zhao 2002; Croft 2004; Nan 2005; Sanberg 2000; Ioannides 2003; Hao 2003; Iihoshi 2004; Akiyama 2002; Sasaki 2001; Irons 2004). La infusión de células mejora la respuesta al daño agudo y aumenta la recuperación. Los mecanismos exactos para la preservación de la integridad neuronal y la recuperación no quedan claros, pero se han postulado una variedad de mecanismos. Las células madre pueden infiltrarse, proliferar y diferenciarse dentro de las células neuronales y gliales de “reemplazo”. Las células madre emigran hacia la zona dañada y desprenden factores angiogénicos, neurotrofinas, antioxidantes, metabolitos anti-apoptóticos y agentes antiinflamatorios al lugar del daño, que puede aumentar la potencia para la supervivencia de células endógenas. Ellas pueden inducir a la migración y proliferación de células madre neuronales endógenas desde la zona subventricular. Las células trasplantadas también pueden contribuir a la reparación por medio de la remielinización. Estas células pueden segregar interleuquinas, factores estimulantes de colonias, y pueden brindar una fuente

fundamental de monocitos activados que puede llegar rápidamente a la zona dañada para comenzar el proceso de reparación (Honma 2002; Ourednik 2002) (English 2006).

El estudio clínico preliminar comprobará la seguridad y factibilidad de la utilización de células madre autólogas del CU para el tratamiento de asfixia perinatal. Se cuenta con una vasta experiencia con este procedimiento en casos de daño neuronal en animales, y en recién nacidos con trastornos metabólicos, pero faltan conocimientos en lo que respecta a la seguridad y factibilidad de la utilización de células madre de la sangre del cordón umbilical para este caso. En los párrafos siguientes, les presentaremos pruebas que sustentan la capacidad protectora y regeneradora de la SCUH y de las células madre derivadas de la médula, sus mecanismos de acción postulados y las sugerencias de óptima coordinación relacionados con el daño, para determinar la dosificación.

¿Qué células utilizar?

La SCUH es una fuente segura y disponible de inmediato para una gran cantidad de células progenitoras mesenquimales autólogas, y precursores celulares endoteliales. Estas células progenitoras/madre inmaduras tienen una extensa capacidad de proliferación *in vitro*, y se han utilizado como fuente de células madre y progenitoras trasplantables (Chen 2001). *In vitro*, subpoblaciones de células (células no CD34⁺) se diferencian en células que mostraron características de los tres tipos de células del SNC: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Habich 2006). El uso de células madre autólogas de la SCU evitaría las dificultades en la recolección de médula ósea de recién nacidos y el riesgo de efectos colaterales del trasplante alogénico de células de la SCU o de la médula ósea, como la enfermedad de injerto contra huésped.

¿Cómo llegan las Células Madre a la zona dañada?

Las pruebas sugieren que la isquemia cerebral transitoria provoca una reacción inflamatoria aumentada por la reperfusión e infiltración de leucocitos (Kochanck 1992). Las células inflamatorias actúan de mediadoras en el daño local y alteran la microperfusión. El “proceso de regreso a casa” de las células madre de la SCUH infundidas hacia el encéfalo isquémico es mediado por factores quimiotáxicos y moléculas de adhesión que aumentan en el encéfalo isquémico (Kim 1996; Zhang 1995). Las moléculas de adhesión y sus receptores se expresaron en las células inflamatorias y las células progenitoras de los vasos sanguíneos hacia el tejido dañado, y transportan estas células por los límites del sistema vascular (Persedsky 1999). Una vez que llegan, los mecanismos exactos involucrados en los efectos reparadores y protectores de las células progenitoras de la médula ósea y de la SCUH no están totalmente definidos, pero se ha atribuido un resultado beneficioso a las células madre transfundidas y a sus productos (Janson 2001; Hao 2003; Stetlov 2004; Locatelli 2003; Goolsby 2003; Masuya 2003; Mezey 2004; Gao 2005).

¿Las células madre reemplazan a células neuronales dañadas?

Existen pruebas que demuestran que las células madre se diferencian en células neuronales en zonas en las que hubo daño previo (4), aunque la evidencia no sustenta el concepto que la diferenciación de estas células principales en células neuronales como la base principal del beneficio terapéutico que brindan los trasplantes de médula ósea o SCUH (Wagers 2002; Lin 2003; Moore 2003; Holden 2002; Limke 2003; Cova 2004; Massengale 2005; English 2006). En tanto queda claro del análisis de marcadores genéticos que las células donantes se acumulan en el lugar del daño neuronal, su diferenciación en células neuronales y gliales en vivo varía, pero en general, es inusual (English 2006). Algunas células progenitoras en la médula ósea y la sangre del cordón umbilical pueden diferenciarse en fenotipo neuronal *in vitro* (Woodbury 2000) e *in vivo*.

Las células madre trasplantadas que encuentran su camino hacia el lugar del daño neuronal podrían integrarse y reemplazar al tejido neuronal dañado. Cuando las células trasplantadas llegan al sitio del daño, es posible que un pequeño porcentaje se injerte en los márgenes del daño y se distinguen en fenotipos de células neuronales y gliales. Los investigadores que analizan la infusión de células madre de médula ósea inyectadas en un modelo de ACV en roedores murinos, notaron que aproximadamente 6 a 8% de las células trasplantadas se injertó en el límite de la zona dañada (Mahmood A 2001; Li 2002). Entre 1 a 5% de estas células trasplantadas tienen marcadores neuronales o astrocíticos. En otro estudio, en menos del 10% de las células madre que emigran a las zonas dañadas se expresaron ya sea antígenos neuronales o marcadores gliales (Honma 2006). Es probable que las células madre autólogas pudieran contribuir a repoblar las zonas dañadas. Lee y otros demostraron que después del daño al SNC, en la infusión de células madre de la médula ósea, el 15 - 20 % de las células autólogas injertadas eran positivas para los marcadores neuronales y astrocíticos (Lee 2004).

Si bien podrían contribuir a la reparación y repoblación neuronal del tejido dañado, es improbable que estas células se diferencien en forma sustancial y se repliquen para reemplazar células neuronales muertas.

A pesar de la falta de pruebas sólidas que sustenten la repoblación real de zonas dañadas por parte de células madre, los modelos de infusiones de células madre muestran un efecto reparador y protector consistente y fuerte (Lu 2005). Se han propuesto mecanismos distintos de la repoblación con mecanismos de células progenitoras.

Mecanismos de respuesta al daño mejorado y óptima reparación

Aún se considera una cuestión crítica cómo mejora el daño neuronal y se logra la regeneración del tejido con la infusión de células progenitoras, sin la simple repoblación de una zona dañada (Sandberg 2005; Borlonyan 2004). En un estudio reciente, Borlonyan y otros no pudieron detectar células madre de la SCUH en el encéfalo de

ratas trasplantadas con bajas dosis de células luego de un ACV; sin embargo, un ACV de menor dimensión y niveles mayores de factores neuroprotectores en animales tratados con células llevaron a los investigadores a sugerir que la recuperación observada después del ACV fue mediado por factores tróficos y moléculas inducidas a partir de células locales, o producidas por las células de la sangre del cordón umbilical infundidas, independientemente de la supervivencia duradera de las células injertadas en la zona del daño.

Una explicación razonable de los efectos terapéuticos de las células de la SCUH es su potencial para modificar la reacción innata al daño y activar los efectos reconstructivos endógenos del encéfalo. Las células progenitoras administradas a través de la médula ósea o las infusiones de SCUH producen cantidades diferentes de citoquinas y factores tróficos tales como VEGF, factor de crecimiento derivado de los nervios y factor neurotrófico derivado del encéfalo (BDNF) (Chen 2001). Las células donantes proveen factores de crecimiento angiogénicos VGF y bFGF (Hamano 2000), y mediadores solubles que regulan la respuesta inmunológica (Bernstein 1988). Los efectos beneficiosos resultantes incluyen angiogénesis, neurogénesis, sinaptogénesis, arborización dendrítica y reducción de apoptosis en la zona límite del tejido neuronal dañado (Zhang 2000; Zhang 2001).

Angiogénesis: ¿respuesta beneficiosa para el daño?

Si bien se pensó que el desarrollo postnatal de vasos sanguíneos resultó sólo del sistema vascular preexistente, es evidente que las células progenitoras endoteliales circulatorias en una población celular CD 34⁺ enriquecida en sangre del CU tienen la capacidad de participar en la neovascularización del tejido isquémico (Asahara 1997). Informes recientes demostraron que la infusión de células progenitoras en animales resultaron en su incorporación en el nuevo sistema vascular en la zona isquémica y la limitación concurrente del daño al tejido (Kawamoto 2001). Además de las células progenitoras endoteliales, se demostró que las células CD34⁺ segregan numerosos factores angiogénicos, que incluyen VEGF, HGF e IGF-1 (Majka 2001).

Taguchi y otros (2004) demostraron que la administración sistémica de células humanas CD34⁺ a ratones inmunocomprometidos sometidos a un ACV 48 horas antes, aceleraron la neovascularización de la zona isquémica. La veloz revascularización aislada del tejido dañado puede no ser beneficiosa, pero la generación de otros mediadores neuronales enriquecedores, tales como VEGF, FGF2 e IGF-1 por parte de células CD34⁺ aumentaron la regeneración neuronal posterior en zonas reperfundidas (Nakatomi 2002; Drago 1991 ; Jin K 2002). En resumen, la neurogénesis endógena se acelera cuando los progenitores neuronales migran a la zona dañada, seguida de su maduración y supervivencia, que tiene influencia en la formación de nuevos canales vasculares y la producción de factores neurogénicos. Este trabajo ofrece un enlace directo entre la vasculogénesis y la neurogénesis en la reparación de lesiones cerebrales isquémicas.

Enlaces con Células Madre Neuronales Endógenas

El tratamiento de ACV con células madre en animales resulta en la inducción de la neurogénesis y un aumento significativo en la cantidad de células en la zona subventricular (ZSV), en la que residen los progenitores neuronales endógenos (Zhang 2001; Li 2002). La presencia de células madre de la SCUH parece promover la rápida inducción y migración de nuevas células desde la fuente principal de células madre neuronales endógenas dentro de la ZSV a la zona dañada del encéfalo.

Apoptosis modificada post-daño

Cuando se infunden, las células madre donantes proveen mediadores tróficos y antiinflamatorios al tejido dañado (Akyama 2001). Se informa que estos factores, incluso GDNF, BDNF, NGF, EGF limitan el alcance del daño isquémico (Schabitz 1997; Ay 2001) y pueden funcionar para disminuir el daño mediante actividad antioxidante, antiapoptótica y antiinflamatoria (Hirouchi 2002; Akiyama 2001). Estos mecanismos del daño son componentes de daño hipóxico-isquémico agudo en los recién nacidos. En particular, la muerte de células apoptóticas persiste durante meses después del ACV o de observarse el daño cerebral hipóxico-isquémico en recién nacidos. El tratamiento experimental de ACV con células donantes reduce la apoptosis dentro del área dañada, un efecto que puede ser mediato por la producción de factores de crecimiento, tales como NFG, dentro del encéfalo dañado (Guegan 1998). Las células gliales estimuladas por las células madre de la médula ósea (BM por su sigla en inglés) trasplantadas en las zonas isquémicas proveen neurotrofinas tales como BDNF y NGF que hacen efectiva la supervivencia, el crecimiento y la diferenciación de células neuronales endógenas (Li 2002). La influencia trófica de las células progenitoras trasplantadas que emigran al tejido dañado pueden evitar que el encéfalo isquémico sufra este daño secundario devastador (Iihoslin 2004).

Efectos antiinflamatorios

En este último tiempo ha crecido la comprensión del rol que cumple la inflamación en la enfermedad y daño neuronal (Vendrame 2005, 2006; Weiner 2002). Luego de un episodio isquémico en el encéfalo hay una cascada de episodios inflamatorios, cuyo alcance se correlaciona con la gravedad del daño al SNC (Stoll 1999). Durante la fase aguda, se activa la microglia (macrófagos residentes del SNC) para facilitar la remoción de células muertas y sus restos. Esto se sigue de una segunda fase en la que la microglia participa en la producción de una cantidad de citoquinas proinflamatorias, que incluyen $TNF\alpha$ y $IL1\beta$.

Lictal y Vendrame (2005) descubrieron que el daño cerebral isquémico de un ACV provocado por la oclusión en la arteria cerebral media de una rata (MCAO por su sigla en inglés) resultó en niveles elevados importantes de $TNF\alpha$, $IL1\beta$, $IL2$ mRNA en el encéfalo. Los estudios demostraron que un aumento en $TNF\alpha$ dentro de las 3 horas del traumatismo postisquémico (Buttini 1996) se asocia con neurodegeneración y

microgliosis (Sredni-Kenigsbach 2002). IL1 β aumenta a las dos horas de la MCAO (Zhai 1997). Estas citoquinas pueden agrandar la dimensión del daño cerebral (Dirnagl 1999). El bloqueo oportuno de alguna de estas dos citoquinas inflamatorias sería eficaz para reducir el daño cerebral y el volumen de la lesión (Ohtahi 2003).

Concomitante con la microgliosis provocada por el ACV, se produce la infiltración de una cantidad de sangre derivada de células inflamatorias de la sangre (neutrófilos, macrófagos y células T y B) en el tejido cerebral infartado, potenciando la neurotoxicidad dentro del tejido cerebral (Dirnagl 1999; Jarden 1995; Liu 1994; Liu 2001). Vendrame y otros (2005) demostraron que la SCUH trasplantada 24 h. después de un ACV produjo un descenso importante en la reacción inflamatoria provocada por el ACV, que incluyó una menor infiltración leucocitaria dentro del encéfalo dañado, acompañada de un menor mRNA de citoquinas y expresión de proteínas así como también una menor unión del NF κ B al ADN. Además de modular la reacción inflamatoria *in vivo*, las células de la SCUH también aumentan la supervivencia neuronal en el cultivo celular. La infusión de células SCUH también reduce la cantidad de CD45⁺/CD11b⁺ (macrófagos y células microgliales) y células CD45⁺/B220* en el encéfalo. La reducción en la cantidad de células CD45⁺/CD116⁺, la mayor fuente de producción de TNF α endógenas que aumentan a causa del ACV, es importante, dado que se cree que la microgliosis crónica media el daño neuronal no sólo en el encéfalo isquémico sino también en otras enfermedades neurodegenerativas (Tan 1999; Streit 1999).

La disminución inducida por células de la SCUH en el nivel mRNA de TNF α relacionado con MCAO en ratas sin células SCUH concuerda con el descenso observado en las células CD45⁺/CD116⁺ (Sredni-Kenigsbusch 2002). Las células SCUH también disminuyeron la muerte celular (Vendrame 2005). Sin embargo, la neuroprotección puede no estar mediada por el contacto célula-célula. Vendrame y otros (2005), utilizando capas del hipocampo separadas por una membrana semiporosa, demostraron la neuroprotección sin un contacto célula-célula, sugiriendo que por lo menos alguno de los efectos de la preservación de la integridad neuronal debe estar mediado por factores difusibles, y estos beneficios no estarían limitados a un efecto antiinflamatorio. Tomada como un todo, esta información muestra que el tratamiento con células SCUH brinda efectos antiinflamatorios, neurotróficos, angiogénicos y anti-apoptóticos importantes, y todos ellos contribuyen a mejorar el desenlace clínico después del ACV.

Tal como sucede con los efectos moderados inducidos por la hipotermia, que modifican la reacción inmediata al daño, no se pueden aislar los episodios específicos que promueven la restauración de la función neurológica después de la infusión de células SCUH (Newman 2006). El proceso que promueve la restauración de la función probablemente no sea una simple modificación del tejido (por ejemplo, neurogénesis o anti-inflamación), sino que es más probable que se trate de un conjunto interconectado de episodios - angiogénesis, neurogénesis, sinaptogénesis y reducciones en la cicatrización de los bordes, antiapoptosis - y un componente antiinflamatorio que

contribuye de manera asociada, sino sinérgica para mejorar el desenlace funcional neurológico (Chopp 2002).

Estudios clínicos y en animales utilizando células madre SCUH: Dosis y coordinación

Las células SCUH se han utilizado exitosamente como fuente de células madre en el tratamiento de enfermedades de la sangre mieloablativas y no mieloablativas, a partir de lo que ha mostrado que una subpoblación de células SCUH se diferenciaría en tipos varios de células del SNC (neuronas, astrocitos, oligodendrocitos) *in vivo* e *in vitro* (Bicknese 2002; Sanchez-Ramos 2001; Zigova 2002). Muchos estudios recientes se refirieron a la potencial utilidad terapéutica de las células SCUH en varias enfermedades y daños neurodegenerativos (Garbuzova-Davis 2005; Lu 2002; Saportu 2003; Staba 2004; Escolar 2005) sugiriendo en forma inicial que las células madre dentro de esta fracción celular heterogénea podía reemplazar neuronas perdidas.

En ratas, la oclusión pasajera y permanente de la arteria cerebral media (MCAO) tiene como consecuencia un ACV. La SCUH administrada en forma intravenosa mejora el daño y los déficits inducidos de la conducta (Vendrame 2005; Chen 2001b; Wiling 2003; Borlongan 2004; Vendrame 2004; Taguchi 2004). Resultados similares se vieron con la hemorragia intercraneal (Nan 2005).

Dosis

Vendrame y otros demostraron que los efectos beneficiosos de la infusión de células SCUH dependen de la dosis. Con dosis de $>10^6$ células, rescataron el daño provocado por MCAO y mejoraron los déficits de la conducta (13) (Vendrame 2004). La RM (Jendelova 2005) muestra las células que sobreviven cerca de la lesión; sin embargo, muy pocas de estas células se expresaron en antígenos neuronales. En consecuencia, el mecanismo subyacente a la recuperación observada como se describe anteriormente, es improbable que sea un reemplazo celular a través de la transdiferenciación de células madre del cordón dentro de las neuronas (Vendrame 2005). Meier utilizó una dosis de 1×10^7 de células mononucleares derivadas de SCUH en su estudio de ratas recién nacidas (Meier 2006).

Sincronización / Coordinación

El tiempo óptimo de infusión para obtener los máximos beneficios, sin importar el mecanismo, es una pregunta importante que se hicieron los investigadores anteriores. Un trabajo hecho por Ihoshi y otros demuestra la preservación de la integridad cerebral en un modelo de ACV en roedores infundidos con células progenitoras de médula ósea en distintos momentos después del daño. Ihoshi y otros (2004) demostraron que el mayor efecto de la preservación cerebral en la transfusión de médula ósea se notó cuando se infundieron las células dentro de las 6 horas de la lesión (que coincide con el plazo utilizado para iniciar la hipotermia inducida). Los animales que recibieron tratamientos a las 3 horas tuvieron preservación de la integridad cerebral

considerablemente mayor comparada con aquellos que recibieron células a las 6 horas. Sin embargo, según algunos investigadores, los animales tratados 72 horas después del daño mostraron los efectos buscados, lo que genera una ventana mayor entre el daño y la posibilidad de utilizar el tratamiento para la asfixia perinatal, en la que la sincronización exacta del daño generalmente se desconoce. Esta asociación del tratamiento “tardío” con la mejora se relacionó con las propiedades antiinflamatorias de las células SCUH y los picos de citoquinas a las 24 y 72 horas del ACV (Newman 2005).

En 2001, Chen y otros demostraron en un modelo de MCAO murino de ACV, que el trasplante de células estromales de la médula ósea o de SCUH mejoraban la conducta somatosensorial y la disfunción neurológica después del ACV (Chen 2001a; 2001b). Estos investigadores demostraron que las células SCUH eran reactivas para los marcadores neuronales y de astrocitos. *In vitro*, notaron una emigración significativa de las células SCUH a las 24 horas del daño. Estos estudios demostraron que estas células donantes entran al encéfalo, sobreviven, emigran y mejoran la recuperación funcional, aún 24 horas después del daño. Este grupo reportó resultados similares en un modelo de daño cerebral traumático (Lu 2002). La mejora del daño también ha sido notada por otros (Willing 2003) 24 horas después de la MCAO. Jeong y otros (2003) informaron que las células SCUH administradas vía intravenosa en modelos de hemorragia intercraneal en ratas adultas a las 24 horas del daño mostró que las células trasplantadas ingresaron al encéfalo, sobrevivieron y mejoraron el desenlace clínico funcional.

Vendrame y otros (2004) extendieron las observaciones de las mediciones anatómicas de la recuperación examinando la recuperación de la conducta y el volumen del infarto en presencia de mayores dosis de células SCUH. A las cuatro semanas después de la infusión, hubo una recuperación significativa cuando se administraron 10^6 o más células SCUH. Las mediciones volumétricas del infarto revelaron una relación inversa entre la dosis de las células SCUH y el volumen del daño, y tuvieron importancia a una dosis de 10^7 células. Además, las células SCUH se ubicaron por PCR e inmunohistoquímica sólo para el encéfalo dañado y el bazo. Estos resultados demostraron mejora en el comportamiento y preservación de la integridad neuronal (Vendrame 2004). Los datos de este grupo también demostraron que las células SCUH trasplantadas 24 horas después del ACV produjeron un importante descenso en la reacción inflamatoria provocada por el ACV. A groso modo, esto fue demostrado por una disminución en la infiltración de leucocitos en el encéfalo que sufrió el ACV. La disminución de células inflamatorias fue acompañada por disminuciones en el mRNA de la citoquina y la expansión de proteínas, así como también disminución de la unión de NF_κB a ADN. Además de modular la reacción inflamatoria, las células SCUH también aumentan en forma directa la supervivencia de la célula neuronal en cultivo.

Administrar células SCUH aún a las 48 horas tiene resultados favorables. Taguchi y otros (2004) administraron células $\text{CD}34^+$ derivadas de SCUH a ratones inmunocomprometidos sometidos a ACV 48 horas antes. Notaron que estas células provocaron neovascularización en la zona isquémica y brindaron un medio favorable para la regeneración neuronal. Mostraron que la neurogénesis endógena suprimida por

un agente anti-angiogénico se acelera como resultado de la emigración de células progenitoras neuronales hacia la zona dañada, seguida de su maduración y recuperación funcional (Taguchi 2004).

En uno de los pocos estudios de células SCUH en animales recién nacidos, Meier y sus colaboradores (2005) se refirieron al rol de las células SCUH en un modelo de daño cerebral hipóxico-isquémico en ratas recién nacidas. Las células SCUH se administraron en forma intraperitoneal 24 horas después del daño. Notaron que la parálisis espástica estaba muy aliviada y que los mononucleares de la SCUH entraron al encéfalo y fueron incorporados a un lado de la zona del daño. El injerto se asoció con el alivio sustancial de la parálisis espástica. La asfixia perinatal tiene como consecuencia un traumatismo neurológico significativo en el período neonatal, y es una de las causas principales de discapacidad permanente y consumo de recursos para el cuidado de la salud. El único tratamiento aplicado clínicamente que tiene eficacia terapéutica es la hipotermia, cuando se aplica, ya sea a la cabeza o a todo el cuerpo dentro las 6 horas del nacimiento. El trasplante autólogo de células madre a través de las células SCUH es una técnica segura y relativamente sencilla que podría ser un tratamiento complementario con amplios efectos terapéuticos en el recién nacido dañado por asfixia perinatal.

Transfusión de sangre del cordón umbilical humano pediátrico

En 1988, un niño de 6 años de Carolina del Norte con anemia Fanconi fue trasplantado exitosamente por la Dra. Eliane Gluckman en el hospital St. Louis en París, Francia, con sangre del placentaria/cordón umbilical criopreservada después del nacimiento de una hermana, sana, HLA-compatible (Gluckman 1989), probando de esa forma que la sangre del cordón umbilical alogénica contenía suficientes células progenitoras y madre hematopoyéticas para reconstituir en forma duradera la médula ósea y el sistema inmunológico después de una terapia mieloablativa. Este paciente está vivo, bien de salud y permanece como una total quimera más de 24 años después del trasplante. Durante los siguientes 5 años, se hicieron aproximadamente 60 trasplantes en niños usando sangre del cordón umbilical criopreservada y HLA-compatible con un hermano/a demostrando la viabilidad del injerto y los menores índices de enfermedad crónica injerto vs. huésped (GvHD), comparado con la médula ósea del hermano/a HLA-compatible (Wagner 1995). Dado el hecho que muchos pacientes que necesitan un trasplante alogénico carecían de un donante compatible, pariente o no, se estableció que la sangre del cordón umbilical podría servir como otra fuente de células alogénicas para trasplante y también que la compatibilidad entre la sangre del cordón umbilical del donante y del receptor no necesitaría ser completa. En 1991, el Dr. Pablo Rubinstein fundó el primer banco de sangre del cordón umbilical para donantes no emparentados en el Centro de Sangre de Nueva York con apoyo RO1* (Rubinstein 1995). En 1993, se realizó en el mundo y en el Centro Médico de la Universidad Duke, el primer trasplante de sangre del cordón umbilical procedente de personas no emparentadas (Kurtzberg 1996). Desde entonces se han establecido aproximadamente 30 bancos públicos (Fraser 1998; Ballar 2001; Kurtzberg 2005; hospital de Pediatría Garrahan 2005) y se han

realizado más de 10,000 trasplantes en niños y adultos en todo el mundo, con malignidades (tumores), insuficiencias en la médula ósea, inmunodeficiencia, hemoglobinopatías y errores metabólicos congénitos (Rubinstein 1998, Gluckman 1998, Goussetis 2000; Rocha 2001; Kurtzberg 2005; Staba 2004, Escolar 2005). En el hospital Garrahan y otros centros de trasplante de Argentina se transplantaron 15 unidades de SCU en pacientes con requerimiento de Trasplante de MO, recogidas, procesadas y congeladas en su banco.

Informes y registros de centros únicos demuestran las ventajas y desventajas del trasplante de sangre del cordón umbilical alogénico de un donante no emparentado, que incluye la ablación quimioterapéutica, y abarca:

Ventajas

Falta de necesidad de control completo de HLA
Menor GvHdD agudo y crónico

Negativo para patógenos en sangre

Injerto retenido vs. efecto leucemia
Rápida disponibilidad

Desventajas

Injerto más lento
Insuficientes dosis de células para algunos adultos
Reconstitución inmunológica tardía

En los últimos 15 años varios centros de trasplante de CPH del mundo han utilizado el trasplante de sangre del cordón umbilical para corregir errores metabólicos congénitos en >200 niños con formas letales de estas enfermedades. El injerto y la supervivencia general en esta población de pacientes excede el 80% cuando los pacientes reciben un trasplante en la primera etapa de su enfermedad. Se alarga la vida y las historias naturales de estas enfermedades se modifican en forma significativa y favorable (Escolar 2005, Staba 2004).

En tanto el primer intento de trasplante de sangre del cordón umbilical fue brindar una forma permanente de terapia de reemplazo de enzimas a través del injerto duradero de células alogénicas, se ha observado que estas células facilitan la reparación de tejidos no hematopoyéticos dañados por la enfermedad, antes de que se realice el procedimiento de trasplante. Se han documentado nuevas mielinizaciones de zonas previamente desmielinizadas del encéfalo, mejoras en las velocidades de conducción nerviosa y aumento de la función neurocognitiva en pacientes con la enfermedad de Krabbe, leucodistrofia metacromática y adrenoleucodistrofia durante este procedimiento. Se ha visto retroceso de la opacidad corneal, resurgimiento del crecimiento de la estructura ósea y resolución de cifosis en pacientes con síndromes de MPS (mucopolisacaridosis). También se observó prevención de enfermedades cardíacas en pacientes con MPS.

Reparación del Daño General

Resumen de Terapias Potenciales

El uso del tratamiento con células madre autólogas de la sangre del cordón umbilical conlleva un gran potencial para la reducción del daño neurológico relacionado con daño cerebral hipóxico en recién nacidos. En consecuencia, la factibilidad, seguridad y a continuación la eficacia de este nuevo enfoque necesita probarse en

ensayos controlados. Si este estudio preliminar indica que el proceso es factible y seguro, se debe realizar un ensayo clínico, aleatorizado, controlado con placebo antes de extender la práctica.

CRITERIOS PARA LA SELECCIÓN DE RECIÉN NACIDOS A TÉRMINO EN RIESGO DE SUFRIR DCHI (Daño Cerebral Hipóxico-Isquémico)

A partir de los criterios clínicos, bioquímicos y de neuroimágenes se debe tener en cuenta lo siguiente como criterios razonables de admisión:

- Los recién nacidos ≥ 36 semanas de gestación deben ser nacidos en el centro del estudio (Maternidad Sardá).
- Se debe disponer de células autólogas de la sangre del CU de la madre para lo cual la madre debe haber prestado el consentimiento informado.
- La necesidad de recurrir a la resucitación, que incluye la intubación y la necesidad permanente de ventilación, también debe constituir un criterio. Esto excluirá a recién nacidos que sólo necesiten succionar o aquellos que están “deprimidos” durante un corto período. Estrictos criterios de resucitación tienen un PPV de $\geq 50\%$ por muerte o discapacidad (Ekert 1997).
- La acidosis metabólica grave y persistente es un indicador confiable de morbilidad neonatal después del daño perinatal agudo.
- Condición neurológica anormal/convulsiones ≤ 6 horas después del nacimiento es un fuerte indicador de desenlace clínico. El examen neurológico temprano (≤ 6 horas) recién ha sido evaluado por su valor predictivo, y se descubrió (junto con la falta de inicio de respiración espontánea antes de los 10 minutos) que tiene PPV de 69% (Ekert 1997). Se ha demostrado que un examen neurológico anormal y los resultados tempranos de la gasometría arterial predicen un resultado pobre a pesar del uso de hipotermia (Ambalavanan 2006).

Antecedentes de episodios perinatales agudos (desprendimiento prematuro de la placenta, prolapso del cordón, desaceleraciones variables o tardías) ayudarían a limitar episodios al período perinatal.

MEDIDAS RESULTANTES

Seguridad

Las medidas resultantes serán una combinación de seguridad a corto y largo plazo sobre el uso de células madre autólogas de la SCU en recién nacidos con EHI. Las consecuencias a corto plazo, para ser controladas, incluyen signos vitales estándares y hemogramas, total de células nucleadas (TNC por su sigla en inglés) del producto de la SCU, viabilidad, ensayos de células progenitoras y esterilidad. Es ideal un seguimiento a largo plazo (5 a 7 años), sin embargo, 18 meses es la edad más temprana a la que, las consecuencias neurológicas y cognitivas pueden evaluarse.

Factibilidad

Evaluaremos si la sangre del CU se puede recolectar en volúmenes apropiados, y si las células madre se pueden procesar para su re infusión dentro de las 2 horas del nacimiento de acuerdo con los criterios del Banco Público de Sangre Cordón Umbilical del Htal. Garrahan. Evaluaremos si estos procedimientos estandarizados conducidos en el marco de tiempo limitado producirán una cantidad adecuada de células madre (células $\geq 3 \times 10^7$) y un volumen adecuado de infusión de células madre del CU (< 10cc/kg).

Eficacia

En este estudio preliminar, se recolectarán datos acerca de la eficacia, pero sólo se harán comparaciones entre recién nacidos que reciben células de la sangre del CU en las primeras 72 horas después del nacimiento con controles históricos de los estudios de Hipotermia sin la expectativa de identificar la eficacia para la intervención analizada teniendo en cuenta el pequeño número de la muestra. Se utilizarán también como controles aquellos pacientes que en el mismo periodo se atiendan en la Maternidad pero que no presten su consentimiento para la infusión o aquellos pacientes que se atiendan en el mismo periodo en la Maternidad pero que no cuenten con colecta de sangre de cordón umbilical (o que la misma no sea apta para su infusión). Recolectaremos información acerca de las RM obtenidas entre los días 7 - 28 después del nacimiento, y toda otra RM realizada como parte de los controles clínicos. Si se realiza otra prueba de desarrollo neuronal por indicaciones clínicas, el personal a cargo del estudio recolectará los resultados del análisis visual y audiológico, y el test psicométrico a los 4 - 6 meses y a los 9 - 12 meses.

Valor de la inclusión de la RM como criterio de valoración

Las pruebas del daño cerebral hipóxico-isquémico se pueden ver en 24 horas con una RM con contraste. El daño cerebral irreversible denominado necrosis cerebral debe producir un aumento en las imágenes intermedias ponderadas en T2 y una disminución en las imágenes ponderadas en T1. Debe notarse que puede ser difícil distinguir estas señales de aumento de CSF, edema circundante y el encéfalo normal.

La RM y el EEG tempranos pueden ayudar a identificar a los recién nacidos con infarto cerebral (en el período neonatal) que probablemente desarrollen hemiplejía (Mercuri 1999). La RM puede ser un mejor indicador de prognosis que la tomografía computada. La duración de una evaluación con RM es de 30-60 minutos, por lo que la RM no puede utilizarse como herramienta para la selección de bebés para terapia temprana.

Dos investigadores publicaron resultados de RM para bebés con EHI que fueron tratados con hipotermia. Rutherford realizó la RM en 46 recién nacidos no enfriados, 14 enfriados en la cabeza y 11 enfriados en todo el cuerpo. Ochenta y siete (87%) por ciento de los bebés no enfriados tuvieron ganglios basales y daño en los tálamos, en tanto el 50% de los que fueron enfriados en la cabeza y 36% de los que fueron enfriados en todo el cuerpo mostraron daño en estos lugares. Se notó hemorragia cerebral en el

13% de los que no fueron enfriados comparado con el 42% de los que fueron enfriados en la cabeza y el 45% de los que fueron enfriados en todo el cuerpo (Rutherford 2005).

Inder y colegas (2004) estudiaron a 26 recién nacidos con EHI inscriptos en el Ensayo de Evaluación de Enfriamiento de Recién Nacidos (ICE por su sigla en inglés) que fueron aleatorizados a normotermia (n=14) o hipotermia sistémica (n=12) durante 72 horas con RM en la primera semana postnatal (casi todos los días después del día 4). Los recién nacidos hipotérmicos tuvieron una reducción en la incidencia de anormalidad de las señales de sustancia gris cortical (1 de 12 bebés hipotérmicos vs. 7 de 14 bebés normotérmicos, Prueba exacta de Fisher; P 0,036). En contraste, la incidencia de toda anormalidad de señales de ganglios basales fue similar entre los grupos (hipotermia 7/12 vs. 9/14 normotermia). Debido a la menor incidencia de anormalidad de señales de sustancia gris cortical, los recién nacidos hipotérmicos tenían más probabilidades de tener anormalidades en las señales de los ganglios basales como patrón predominante (hipotermia 6/12 vs. normotermia 2/14; P = 0,05) (Inder 2004). Esperamos los resultados finales de este ensayo para determinar cuán bien los patrones de RM predicen las consecuencias a largo plazo.

Otros investigadores desarrollaron sistemas de puntaje utilizando técnicas de análisis de imágenes para calcular el tamaño y ubicación del tejido cerebral dañado (Parikh 2009; Heinz 2009). Cambios producidos con el tiempo en las imágenes convencionales ponderadas en T1 y T2 e imágenes ponderadas con tensor de difusión también pueden ayudar con el pronóstico (Barkovich 2006). Incluimos dos RM en nuestro protocolo de estudio para investigar la interacción del desarrollo cerebral y la recuperación del daño. Además, nuevas técnicas de imágenes permiten distinguir el daño axonal de la mielina. Agregaremos esta nueva secuencia a una RM temprana (primeras dos semanas después del nacimiento) y posterior (4-6 meses) para comenzar a evaluar la ubicación y tipo de daño (Avram 2008) (Fig. 1).

C. HIPÓTESIS

1. En recién nacidos a ≥ 36 semanas de gestación que están en riesgo de sufrir un desenlace adverso después de una encefalopatía hipóxico-isquémica perinatal aguda y que reciben hipotermia terapéutica, la recolección, preparación e infusión de células madre autólogas de la sangre del CU, en forma ideal, antes de las 72 horas de inducir hipotermia moderada comenzando a las ≤ 6 horas después del nacimiento y repitiendo a las 24, 48 y 72 horas después del nacimiento, pero no después de los 3 días post nacimiento, será factible y seguro.

2. En recién nacidos a ≥ 36 semanas de gestación que están en riesgo de sufrir un desenlace adverso después de una encefalopatía hipóxico-isquémica, con más de 6 horas de nacidos y por lo tanto no recibiendo hipotermia terapéutica, y antes de las 24 horas después del parto, la recolección, preparación e infusión de células madre autólogas de la sangre del CU ≤ 2 horas después de su llegada y repitiendo a las 24, 48 y 72 horas después del nacimiento, pero no después de los 3 días post nacimiento, será factible y seguro.

D. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. La recolección, preparación e infusión de células madre autólogas de la sangre del CU en recién nacidos ≥ 36 semanas de gestación con encefalopatía moderada a grave dentro de los primeros 3 días después del nacimiento y repitiendo a las 24, 48 y 72 horas después del nacimiento.

2. Controlar la factibilidad y seguridad de este tratamiento.

3. Recolectar muestras de sangre recuperada para iniciar el análisis de biomarcadores específicos para determinar el nivel de daño hipóxico-isquémico y la respuesta al tratamiento.

D. MÉTODOS / PROCEDIMIENTOS

Reclutamiento de Pacientes

Todos los recién nacidos ≥ 36 semanas de gestación serán examinados para ser admitidos en el estudio si ingresan a la Unidad Neonatal de Cuidados Intensivos (NICU) de la Maternidad Sardá con un diagnóstico de admisión de depresión neonatal, asfixia perinatal aguda o encefalopatía, y si la sangre autóloga del CU fue recolectada en el momento del nacimiento y preparada y manipulada en forma apropiada para el procesamiento de células de la sangre del CU. Se evaluará a los recién nacidos en Sardá o en establecimientos que han sido capacitados para la recolección y preparación de sangre del CU. Los recién nacidos en otros establecimientos deben ser trasladados, con su sangre del CU recolectada, tan pronto como sea posible a la Maternidad Sardá. El examen médico y el consentimiento para recibir células madre de sangre del CU deben realizarse antes de las 14 horas de vida para que los bebés reciban las células madre de la sangre del CU relacionadas con el estudio.

Los establecimientos que participan estarán entrenados como establecimientos de recolección de sangre del CU y tendrán el personal para la recolección, u obstetras capacitados para hacer la recolección en el lugar. La recolección de sangre del CU requiere un formulario de consentimiento de colecta, en caso que esa madre ya hubiera firmado un consentimiento de coleta para donar la SCU al banco público ese consentimiento, por ser solamente para colecta, será válido para la colecta con el propósito terapéutico. Ese consentimiento se debe obtener antes de iniciar el trabajo de parto. Se incluye en los anexos el formulario usado actualmente para prestar consentimiento para el uso de sangre del CU del Banco del Htal. Garrahan. En caso que la madre no hubiera firmado un consentimiento para donar o para la extracción en forma específica. Hay circunstancias del proceso de parto que impiden que el proceso de la información para consentir la colecta sea apropiada, para ello existe un formulario para expresar el consentimiento verbal para esas madres, que son aquellas con las que no se ha tenido el tiempo para dar su consentimiento al Banco de Sangre de CU.

Por otra parte debe desarrollarse un consentimiento informado específico para la infusión de las CM de la SCU

Cuando sea posible, la sangre del CU será recolectada de la placenta de todos los bebés cuyas madres hayan prestado consentimiento. El obstetra o la partera realizarán las recolecciones *in utero* (placenta aún sin desprender) durante la tercera etapa del parto utilizando un *kit* provisto durante el estudio. La sangre del CU se llevará al laboratorio para su procesamiento y análisis, y conservada hasta utilizarse para la/s infusión/es autólogas.

Criterios de Inclusión

Los recién nacidos serán evaluados en dos pasos: evaluación teniendo en cuenta criterios clínicos y bioquímicos (Paso A), seguido de un examen neurológico (Paso B).

A. Todos los recién nacidos serán evaluados en los siguientes ítems:

1. Si la madre ha prestado consentimiento para la recolección de SCU (escrito o verbal).
2. Disponibilidad de SCU recolectada.
3. La SCU se evaluará para obtener un recuento total de células nucleadas, viabilidad, contenido de CFU, contenido y esterilidad de CD34⁺ (tinción de Gram antes de la infusión).
4. Se examinará la sangre materna para (punto B4) detectar agentes de infecciones transmisibles a través de la sangre (examen inmunológico CMV, anticuerpos Hepatitis B_{core}, Hepatitis C, Antígenos Hbs, anticuerpos VIH/1/2, anticuerpos HTLV-1/II y sífilis, anticuerpos anti-Tcruzi). A las madres que prestan consentimiento verbal se les informará acerca de la necesidad de realizar estos análisis y estar de acuerdo con la notificación de los resultados para cumplir con las especificaciones para la recolección y donación de SCU. El formulario de consentimiento para el estudio incluye la descripción de los exámenes de sangre requeridos para la madre.
5. Constatarse:
 - Evidencia clínica de encefalopatía moderada o severa (ver cuadro)
 - Evidencia de asfixia (Historia de un caso agudo perinatal (es decir, abruptio placentae, prolapso del cordón, anormalidad grave en la frecuencia cardiaca fetal : variable o desaceleraciones tardías, liquido amniótico meconial).
 - Recién nacidos > o = a 36 semanas de edad gestacional y peso >o= a 1800 gramos
6. El paciente debe cumplir con al menos 3 de los criterios de los siguientes puntos:
 - a- Una puntuación de Apgar <5 a 10 minutos.
 - b- pH del cordón o cualquier pH posterior en sangre <1 hora < o = 7.0.
 - c- Déficit de base en gas de cordón o cualquier gas en sangre posterior < 1 hora > o = - 16 mEq / L.
 - d- Necesidad de asistencia ventilatoria desde el momento del nacimiento y si continuó por lo menos hasta los 10 minutos o
 - e- Si el pH se encuentra en la primera hora de vida entre el rango de 7.01-7.15 o el EB - 10 a -15.9 acompañado de los tres ítems 1-2-5

Una vez que el recién nacido reúne criterios del punto A, se procede al examen neurológico:

B. La presencia de encefalopatía moderada/grave definida como convulsiones o la presencia de signos en 3 de las 6 categorías en la tabla que sigue.

Categoría	Encefalopatía Moderada	Encefalopatía Grave
1. Nivel de conciencia	Letárgico	Estupor/Coma
2. Actividad espontánea	Disminuido	Sin actividad
3. Postura	Flexión distal	Descerebrado
4. Tonicidad	Hipotonía (focal, general)	Flácido
5. Reflejos primitivos Succión Reflejo de Moro	Débiles Incompletos	Ausente Ausente
6. Sistema autónomo Pupilas	Estrechadas	Desviación desviación /dilatación / sin reacción a la luz
Ritmo cardíaco Respiraciones	Bradycardia Respiración periódica	Ritmo cardíaco variable Apnea

Un médico examinador realizará el examen neurológico. Si el bebé reúne los criterios A y los criterios B y no reúne los criterios de exclusión, entonces es apto para su admisión en el estudio. Si es apto, un miembro del equipo del estudio se acercará a la familia para solicitar el consentimiento para la inscripción en el estudio para la infusión, en caso que la sangre de cordón hubiera sido colectada. Si se obtiene el consentimiento (específico de infusión de CM de SCU), el equipo del estudio avisará al equipo del laboratorio del Banco Público de SCU Garrahan para que proceda al procesamiento de la unidad colectada de la placenta/SCU lo cual completará para que puedan ser infundidas al paciente según el protocolo.

Criterios de exclusión

- a. Todo recién nacido <36 sem.
- b. Incapacidad para inscribirse por pasar los 3 días de vida.
- c. Presencia de anomalías cromosómicas conocidas.
- d. Presencia de anomalías congénitas importantes.
- e. Limitación grave del crecimiento intrauterino (peso $\leq 1,800$ g).
- f. Recién nacidos *in extremis* a quienes el neonatólogo que los asiste no les ofrecerá terapia intensiva adicional.
- g. Los padres no prestan consentimiento.
- h. El neonatólogo que los asiste no presta el consentimiento.
- i. No se recolecta la SCU del bebé y/o el laboratorio no puede procesar la SCU por razones debidamente documentadas.

Procedimientos en el Estudio

Recolección de SCU:

Las células de la SCU serán recolectadas de los recién nacidos con uno de dos métodos. Los obstetras/las parteras harán la recolección antes del alumbramiento de la placenta, tal como se describe en los procedimientos operativos estándar del Banco de Sangre del CU. De inmediato, se proveerá un *kit* que contiene todos los materiales necesarios para la extracción de la SCU para el estudio y que se conservará en la Sala de Partos. La persona que realice el parto lo hará siguiendo las prácticas clínicas estándares. El cordón será doblemente sujetado en los extremos del bebé y de la madre. Una vez que el bebé se entrega al Pediatra o a otro equipo de resucitación, el obstetra/la partera secarán y limpiarán con alcohol el CU próximo al clamp en el lado materno, lo estabilizarán, punzarán la vena umbilical con una aguja calibre 17 unida a la bolsa de recolección de la SCU que contiene anticoagulante CPD (Pall/Medsep), bajarán la bolsa de recolección al nivel del mas bajo para favorecer la salida de sangre de la placenta por la gravedad. Colocar la bolsa sobre paño limpio dejando que la sangre fluya espontáneamente dentro de la bolsa mientras se desprende la placenta, hacerlo durante por lo menos 5 minutos. La recolección continuará hasta que la vena umbilical se blanquee o se desprenda la placenta, lo que ocurra primero. Luego de la recolección, se procede a la remoción de la aguja y a la rotulación adecuada de la unidad y de los tubos de muestras maternas correspondientes, la unidad de SCU será transportada al laboratorio que procesará las células.

Procesamiento de las Células de la SCU

Luego de su recepción en el laboratorio, la unidad de SCU se pesará para determinar el volumen de recolección. Se hará un recuento y se determinará la viabilidad celular por medio del test de exclusión con azul de tripano. Se reducirá el volumen de la unidad de SCU y los glóbulos rojos serán reducidos utilizando sedimentación y centrifugado con *hidroxietil almidón* de acuerdo con el procedimiento estándar del Banco de SCU del Htal. Garrahan (a disposición, si se solicita). Las células nucleadas de la SCU se concentrarán en un volumen de 20,5 ml. Se obtendrá un recuento celular y se extraerá una dosis de 5×10^7 células/Kg para su reinfusión directa al bebé donante durante los 3 días después del nacimiento. Las células preparadas para las infusiones programadas del estudio serán refrigeradas de acuerdo a las dosis establecidas para las primeras 72 horas posteriores al nacimiento. Se realizará un estudio bacteriológico de una muestra de la unidad para determinar si hay contaminación bacteriana.

Análisis de las Células de la SCU: La SCU será analizada para determinar el contenido total de células nucleadas, el diferencial para enumerar el contenido celular de NRBCs, HCT, CD34 y CD3, enumeración de CFU-GM, CFU-GEMM, BFU-E, ABO/tipos Rh y esterilidad.

Examen de sangre de la madre para detectar enfermedades infecciosas:

Se obtendrá una muestra de sangre de la madre para evaluar antígenos de la superficie en Hepatitis B, anticuerpos principales de Hepatitis B(anti Hbcore y anti Hbs), anticuerpos Hepatitis C, anticuerpos VIH 1 y VIH 2, anticuerpos HTLV-I/II, anticuerpos anti Tcruzi, examen inmunológico CMV, RPR (reagina plasmática rápida) y prueba de NAT (prueba de ácido nucleico) para VIH, Hepatitis C. Estas pruebas sirven como exámenes médicos sustitutos para el recién nacido.

Criopreservación de las Células SCU

La SCU se criopreservará mediante congelamiento controlado de acuerdo con los procedimientos operativos estándar del Banco de SCU del Htal. Garrahan. La sangre congelada no se utilizará para este estudio.

Refrigeración / Conservación de las Células SCU

Las unidades de SCU para este protocolo, hasta cuatro por recién nacido, se refrigerarán a 4° centígrados siguiendo procedimientos operativos escritos para ello en el Banco de SCU Garrahan.

Infusión de células autólogas de la SCU

Las células de la SCU se infunden mediante gravedad o bombeo con una jeringa durante 15 -20 minutos después de la premedicación, tal como se especifica más adelante. Se evaluarán los signos vitales antes de la infusión, cada 5 minutos durante la infusión, cada 15 minutos en la primera hora después de la infusión y luego, de acuerdo con la práctica hospitalaria de rutina.

Los recién nacidos inscritos en el estudio recibirán un máximo de 4 dosis de 5×10^7 de células de la SCU de volumen reducido en glóbulos rojos. La premedicación con hidrocortisona (1mg/kg IV) se administrará 20 - 30 minutos antes de cada dosis de células.

Tratamiento con hipotermia

En la Maternidad Sardá se seguirá en forma estricta la estrategia de enfriamiento y monitoreo utilizada según protocolos existentes previamente. Se utilizará el colchón térmico Amrraterm HTF frío calor con servocontrol. Los procedimientos de enfriamiento y recalentamiento se encuentran a disposición de quien los solicite.

Recién nacidos que no han sido enfriados y preinducción de la temperatura buscada para la hipotermia

Los bebés inscritos para el estudio que lleguen después de las 6 horas de vida serán tratados de acuerdo con las prácticas de rutina locales de la Unidad Neonatal de Cuidados Intensivos.

Otros Tratamientos / Análisis / Medicaciones Concurrentes

Medicaciones Concurrentes

En lo posible, no se administrará medicación anticonvulsiva y sedante antes de la hipotermia o infusión de células SCU, a menos que sea clínicamente indicado, y en tal caso estarán enunciados en la hoja de recolección de datos de medicaciones concurr

Estudios por Imágenes

Se toma una RM de rutina a los recién nacidos con EHI a los 7 - 28 días post nacimiento. Preferentemente, la RM se hará entre los 7 - 14 días post nacimiento. Si se indican otras RM, los resultados de estos estudios se incluirán en el registro del estudio.

Además de RM clínicas habituales u otras neuroimágenes, cualquier otra información relacionada con RM se recolectará con la RM realizada como práctica de rutina para bebés con EHI en las primeras semanas postnatales y se realizará un segundo estudio con RM a los 4 - 6 meses. Para cada RM, se usarán las técnicas convencionales T1 y T2 para evaluar la ubicación y alcance del daño.

Alta de la Unidad Neonatal de Cuidados Intensivos y Seguimiento del desarrollo neuronal

La información de seguimiento se registrará al dar el alta e incluirá números de teléfono y domicilio particular (es crucial que se tome mas de un contacto telefónico, dada la variación en los puntos de contacto de las familias). Todos los bebés que sobreviven reciben seguimiento en el programa de seguimiento del Consultorio de Recién Nacidos de Alto Riesgo de la Maternidad Sardá y/o del Htal. Garrahan.

Autopsia

Se hará un intento de obtener una autopsia, para en caso de muerte, ya sea antes o después del alta de la Unidad Neonatal de Cuidados Intensivos, poder realizarla sin intervenir en ese momento. Los resultados de la autopsia, si están disponibles, se incluirán en el registro del estudio.

Controles

a. Se evaluarán los signos vitales antes de la infusión de células SCH, cada 5 minutos durante la infusión, cada 15 minutos en la primera hora después de la infusión y luego, de acuerdo con la práctica hospitalaria de rutina.

b. Estado metabólico: valores químicos se obtienen diariamente en recién nacidos con EHI moderada a grave estén tratados con hipotermia o no. Se controlan los electrolitos séricos, urea en sangre y la creatinina antes del estudio y luego en forma diaria. Incluimos los resultados de los estudios metabólicos en los registros del estudio.

c. Condición respiratoria: una gasometría arterial es común en recién nacidos con EHI moderada a grave. Los resultados de las gasometrías se incluirán en los registros del estudio.

d. Cardiovascular: ritmo cardíaco, presión arterial y agentes inotrópicos que se observen al inicio, cada hora durante 12 horas y cada 4 horas durante 72 horas.

e. Condición renal: muestra de orina, controlada y registrada diariamente.

f. Condición neurológica: al inicio, en forma diaria hasta las 72 horas y al dar el alta (realizada por un neurólogo infantil entrenado).

g. Condición hematológica: el control de los estudios de coagulación se considera práctica de rutina para los recién nacidos con EHI. Los resultados PT/PTT se registrarán en las anotaciones del estudio.

CONSECUENCIAS PRINCIPALES

La consecuencia principal esperada es la seguridad de la infusión de hasta 4 dosis de células de SCU autólogas en los primeros 3 días post nacimiento. Este criterio de valoración se define como la sucesión de lo siguiente después de la infusión de células de SCU: muerte, hipertensión (presión arterial sistólica >100 x 2 mediciones por lo menos una hora después), hipotensión (presión arterial sistólica < 35 más de dos horas después), broncoespasmo que requiere terapia con broncodilatadores, fiebre, o infección atribuible a la contaminación de la infusión de células SCU.

Además, evaluaremos la factibilidad de la infusión autóloga de células SCU dentro de los primeros 3 días post nacimiento, recolectando datos acerca de la frecuencia con la que se realizaron infusiones de células SCH < 1 hora después de la recolección de la SCU.

CONSECUENCIAS SECUNDARIAS

Para este estudio de seguridad y factibilidad, la muerte o discapacidad moderada o grave se considerará como desenlace secundario. Los recién nacidos se evaluarán de acuerdo con las prácticas clínicas de rutina a los 4 - 6 y 9 - 12 meses de edad. Se tomarán los parámetros de crecimiento, y se realizarán exámenes neurológicos, psicométricos, y evaluaciones de la visión y audición tal como se ha indicado. Los resultados de las pruebas de desarrollo neuronal hechas como prácticas de rutina se incluirán en los registros del estudio.

Los resultados preliminares incluirán evaluaciones de los paneles de los marcadores séricos del daño neurológico descrito en adultos después de un ACV.

CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

Este tamaño de la muestra por Grupo es estándar para un ensayo de factibilidad y seguridad fase I.

CONTROL DE LA SEGURIDAD DEL ENSAYO

Se tomarán las siguientes medidas para controlar la seguridad del ensayo:

Aprobación por parte del Comité de Revisión Institucional de los Hospitales Sardá y Garrahan, y del INCUCAI.

Episodios Adversos y Episodios Adversos Graves

Los episodios adversos se registrarán en el formulario de Episodios Adversos que será enviado a los Comité de Revisión Institucional de los Hospitales Sardá y Garrahan y al INCUCAI.

Los recién nacidos serán controlados por sus equipos médicos y de enfermería durante 24 horas después de cada infusión para detectar toxicidad infusional (hipertensión, hipotensión, broncoespasmo, fiebre, etc.). Se completará un formulario de toxicidad 24 horas después de cada infusión.

Un episodio o efecto adverso grave que se atribuya directamente a la infusión de células madre tendrá como consecuencia la interrupción del estudio. Se define a los Episodios Adversos Graves como toda experiencia adversa que resulte en uno de los siguientes desenlaces: muerte, un efecto adverso con la infusión de las células madre o fármaco que amenace la vida, hospitalización o prolongación de la hospitalización ya existente, un defecto o anomalía congénitos. Los eventos médicos importantes que pueden no tener como consecuencia la muerte, amenazar la vida o requerir hospitalización pueden considerarse graves cuando, en base al criterio médico apropiado, puedan poner en peligro al sujeto o el sujeto puede requerir intervención médica o quirúrgica para evitar alguna de las consecuencias mencionadas en la definición. Ejemplos de dichos eventos médicos incluyen broncoespasmo alérgico que requiera tratamiento intensivo, discrasia sanguínea o convulsiones que no resulten en una hospitalización prolongada o el desarrollo de una droga dependencia o abuso de fármacos.

Se documentará una descripción detallada del episodio adverso, que incluye una evaluación de la relación del evento con el estudio, las acciones tomadas relacionadas con el estudio y el resultado. Además, el Investigador Principal es responsable de informar todos los episodios adversos graves (SAEs por su sigla en inglés) a los Comités de Docencia e Investigación hospitalarios.

Los resúmenes de alta o certificados de defunción para sustentar los datos en la hoja de trabajo de los eventos adversos graves deben enviarse al Investigador Principal y al CEI tan pronto como estén disponibles. Se deben presentar todos los informes de seguimiento necesarios tan pronto como la información esté disponible.

La seguridad general del estudio será controlada atentamente por los Investigadores Principales, Dres. Solana, del Pozo, Balanian, Gamba y Procacci Ríos que están familiarizados con esta población particular en estudio y con los procedimientos de recolección e infusión de células, y los procedimientos en la terapia intensiva de la unidad neonatal. Este grupo se reunirá mensualmente o después de cada tres recién nacidos que reciban infusiones, lo que suceda con mayor frecuencia, para tratar las consecuencias de la seguridad y el progreso del estudio.

A los fines del presente estudio consideraremos que el mismo es seguro si ningún paciente presente efectos adversos graves.

CONTROL DE LA EFICACIA DEL ENSAYO

Este es un estudio clínico preliminar que no mide la eficacia, si bien se evaluará la supervivencia y las consecuencias del desarrollo neuronal en cada recién nacido. Todo estudio que se relacione con episodios adversos graves resultará en la interrupción del ensayo hasta que los investigadores y el CEI hagan una revisión.

PRESUPUESTO

Los gastos que demanda el presente protocolo de estudio serán financiados por aportes de la Fundación Delfina Baratelli en lo que hace a los gastos de procesamiento de las muestras y por la beca Adolfo H. Aztiria que financia a la Dra. María de los Ángeles Procacci Ríos.