

Transportadores de oxígeno. Obtención de hematíes a partir del cultivo de células madre embrionarias humanas

Informe de síntesis de tecnología emergente

Oxygen carriers. Production of red blood cells from human embryonic stem cells. *Executive abstract*

Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias AETSA 2007/2-18

INFORMES, ESTUDIOS E INVESTIGACIÓN



MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN



Ministerio de Ciencia e Innovación
AIC/Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias
Instituto de Salud Carlos III



MINISTERIO DE SANIDAD, POLÍTICA SOCIAL E IGUALDAD



Impreso en cartulina  y papel fabricado con pasta libre de madera.

Transportadores de oxígeno. Obtención de hematíes a partir del cultivo de células madre embrionarias humanas

Informe de síntesis de tecnología emergente

Oxygen carriers. Production of red blood cells from human embryonic stem cells. *Executive abstract*

INFORMES DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SANITARIAS
AETSA 2007/2-18

Aguado Romeo, María José

Transportadores de oxígeno. Obtención de hematíes a partir del cultivo de células embrionarias humanas. Informe de síntesis de tecnología emergente. M^a José Aguado Romeo y Aurora Llanos Méndez.—Sevilla: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía, 2010.

32 p.; 24 cm. (Colección: Informes, estudios e investigación. Ministerio de Sanidad y Política Social. Serie: Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias)

1. Sustitutos sanguíneos 2. Hemoglobina 3. Células cultivadas 3. Células madre I Llanos Méndez, Aurora II Andalucía. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias III. España. Ministerio de Sanidad y Política Social IV. España. Ministerio de Ciencia e Innovación.

Autores: M.^a José Aguado Romeo y Aurora Llanos Méndez.

Edita: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía
Avda. de la Innovación s/n
Edificio RENTA SEVILLA, 2^a planta
41020 Sevilla
España – Spain

Este documento se ha realizado en el marco de colaboración previsto en el Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud elaborado por el Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad, al amparo del convenio de colaboración suscrito por el Instituto de Salud Carlos III, organismo autónomo del Ministerio de Ciencia e Innovación y la Fundación Progreso y Salud de Andalucía

ISBN: 978-84-96990-63-0

NIPO: 477-10-026-4

Depósito Legal: SE-6700-2010

Imprime: Coria Gráfica,S.L.

Este documento puede ser reproducido en todo o en parte, por cualquier medio, siempre que se cite explícitamente su procedencia

Transportadores de oxígeno. Obtención de hematíes a partir del cultivo de células madre embrionarias humanas

Informe de síntesis de tecnología emergente

Oxygen carriers. Production of red blood cells from human embryonic stem cells. *Executive abstract*

Conflicto de Interés

Las autoras declaran que no tienen intereses que puedan competir con el interés primario y los objetivos de este informe e influir en su juicio profesional al respecto.

Índice

Puntos clave.....	7
Executive abstract.....	9
Introducción	11
Descripción de la tecnología.....	13
Características clínicas	15
Justificación y Objetivos	17
Metología.....	19
Resultados	21
Aspectos económicos.....	25
Referencias bibliográficas	27
Anexos 1: Estrategia de búsqueda	29

Puntos clave

- El cultivo de células madre humanas embrionarias se perfila como una potencial fuente para obtener a gran escala eritrocitos maduros con capacidad de transportar oxígeno dado que biológica y funcionalmente se comportan como hematíes maduros.
- Los trabajos recuperados son estudios que se encuentran en fase experimental. No se han recuperado estudios en los que se estudie la eficacia de la transfusión de células eritroides obtenidas por cultivo ni en animales ni en humanos.
- Han resultado ineficaces otros transportadores de oxígeno como los procedentes de emulsiones perfluorocarbonadas, de soluciones de hemoglobina modificada, de hemoglobina recombinante y otros de origen artificial.
- Posibles beneficios de la transfusión de los eritrocitos obtenidos por cultivo de células madre embrionarias humanas serían: eliminar, al menos en parte, los problemas de compatibilidad y de transmisión de enfermedades relacionadas con la transfusión sanguínea tradicional y sustituir la fuente actual de obtención, los donantes humanos voluntarios cada vez menos numerosos.
- Todavía persisten limitaciones tecnológicas: se obtienen células rojas con cadenas de hemoglobina fundamentalmente embrionarias y fetales y pocas cadenas adultas (las que liberan O_2 con más facilidad) y tienen determinantes antigénicos, luego no son del tipo donante universal.
- La cantidad de cadenas globina que se consiguen son inferiores a la que existe en los glóbulos rojos de un individuo adulto, en situaciones de hipoxia puede suponer una menor disponibilidad de oxígeno y por lo tanto es un aspecto pendiente de mejorar.

Executive abstract

Title: Oxygen carriers. Production of red blood cells from human embryonic stem cells.

Authors: María José Aguado Romeo, Aurora Llanos Méndez.

Key points:

- The culture of human embryonic stem cells is outlined as a potential source for the large scale production of erythrocytes with the capacity to carry oxygen, as they behave biologically and functionally like mature erythrocytes.
- The recovered works are studies in the experimental phase. No studies into the effectiveness of the transfusion of cultured erythroid cells, in animals or in humans, were found.
- Other oxygen carriers have been ineffective, such as perfluorocarbon emulsions, modified haemoglobin solutions, recombinant haemoglobin and others of artificial origin.
- Possible benefits of the transfusion of erythrocytes obtained by the culture of human embryonic stem cells would be to eliminate, at least partly, the problems of compatibility and transmission of diseases related to the traditional blood transfusion, and to replace the current source, the ever diminishing voluntary human donors.
- Technological limitations still persist: red cells with fundamentally embryonic and foetal haemoglobin chains and few adult chains are obtained (those that release O₂ more easily) and which have antigenic determinants, therefore they are not of the universal donor type.
- The quantity of globin chains obtained is inferior to that which exists in the red cells of an adult individual, and in hypoxia situations this could mean less oxygen availability and therefore it is an aspect pending improvement

Introducción

Para poder entender la tecnología que se describe en los estudios seleccionados nos parece oportuno, dada su complejidad terminológica, hacer una pequeña introducción orientada a entender el mecanismo fisiológico de la formación del hematíe, célula cuya función principal es el transporte de oxígeno.

Hematopoyesis

La hematopoyesis o hemopoyesis es el proceso de formación, desarrollo y maduración de los elementos formes de la sangre (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) a partir de un precursor celular común e indiferenciado conocido como célula madre hematopoyética pluripotencial o “*stem cell*”¹.

Eritropoyesis

La eritropoyesis es el proceso que se corresponde a la generación de los eritrocitos (glóbulos rojos) que se inicia a partir de una célula madre (stem cell hESCS). Mediante diferentes mecanismos enzimáticos la célula madre genera una célula diferenciada o eritrocito. El siguiente paso es la eliminación del núcleo formando reticulocitos, primeras células eritroides circulantes en la sangre periférica, que posteriormente perderán el resto de organelas internas (mitocondrias, retículo y ribosomas) para dar paso a los hematíes maduros. La vida media de un eritrocito es de 120 días².

La hematopoyesis comienza entre la segunda y la tercera semana de la embriogénesis en el saco vitelino de York, con la formación de islotes sanguíneos derivados del mesodermo. Estos islotes persisten hasta la semana novena de la gestación. Las células que forman los islotes sanguíneos, llamadas hemangioblastos, tienen una capacidad de desarrollo bipotencial, es decir, pueden dar lugar tanto a las células madre endoteliales como a las células madre hematopoyéticas. Estas últimas evolucionan hacia todos los tipos de células que se encuentran en la sangre embrionaria. La hematopoyesis del saco vitelino es una adaptación transitoria para satisfacer las necesidades inmediatas del embrión hasta que los tejidos que normalmente producen las células de la sangre en el adulto empiezan a formarse^{1,2}.

A partir de la sexta semana de gestación, la eritropoyesis comienza a realizarse en el hígado fetal y continúa hasta el nacimiento. En la semana once de la gestación se inicia la hematopoyesis en la médula ósea y va sustituyendo progresivamente la producción en el hígado fetal hasta sustituirla casi por completo en el momento del nacimiento¹.

La hemoglobina

La hemoglobina (Hb) es una heteroproteína de la sangre que al interaccionar con el oxígeno toma un color rojo característico. Se encuentra en el interior de los hematíes y su función es el transporte de oxígeno a los tejidos. La forman cuatro cadenas polipeptídicas (globinas) a cada una de las cuales se une un grupo hemo, cuyo átomo de hierro es el que se une de forma reversible al oxígeno³.

Las cadenas de globina cambian según el momento evolutivo del ser humano: en el embrión se producen las hemoglobinas Gowers I ($\xi_2\varepsilon_2$), Gowers II ($\alpha_2\varepsilon_2$) y Portland ($\xi_2\gamma_2$); en el feto se produce hemoglobina F o fetal ($\alpha_2\gamma_2$) y en el adulto se produce hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$), hemoglobina A₂ ($\alpha_2\delta_2$) y persisten pequeñas cantidades de hemoglobina F (0,8% a 2%). La hemoglobina A representa el 97% del total de la hemoglobina del adulto y la A₂ menos del 2,5%⁴.

Las hemoglobinas embrionarias y fetales tienen una mayor afinidad por el oxígeno que las adultas. Para la oxigenación tisular es necesario que la afinidad sea baja de forma que puedan ser liberadas con facilidad cuando los hematíes alcanzan un tejido⁴

Descripción de la tecnología

Nombre de la tecnología

Obtención de hematíes a partir de células madre embrionarias humanas.

Descripción de la tecnología

El método de laboratorio más avanzado⁵ consiste en la generación y expansión de eritrocitos a partir del cultivo de células madre embrionarias humanas (hESCs).

Se emplean líneas celulares embrionarias: H1, MA01, MA99, HuES-3 y un complejo proceso multipaso que básicamente consiste en:

1. Formación e inducción de hemangioblastos a partir de precursores del mesodermo.
2. Expansión de los hemangioblastos.
3. Diferenciación y expansión de células eritroides.
4. Enriquecimiento y maduración de las células eritroides.

Posteriormente se realiza la identificación de las células como eritrocitos funcionales a través de:

- técnicas de citometría de flujo para conocer los determinantes antigénicos,
- técnicas de espectrometría de masas para determinar la existencia de hemoglobina funcional,
- reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (PCR-RT) para la identificación de los diferentes estadios de maduración de las células eritroides cultivadas.

Por último, se procede a la enucleación de las células eritroides obtenidas consiguiendo así hematíes maduros.

Pocas o ninguna de las células obtenidas (<5%) expresan el Antígeno Mayor de Histocompatibilidad (HLA) y el Duffy (0%).

El tipo de hemoglobinas que se sintetizan por las células cultivadas son fundamentalmente embrionarias (ξ, ϵ) y fetales (δ, γ) con muy pocas cadenas de hemoglobina adulta α y β .

Las curvas de disociación de oxígeno (O_2) de las hemoglobinas a y b obtenidas, son muy similares a las que realizan los hematíes adultos normales, aunque la respuesta al 2,3 difosfoglicerol (2-3DPG) es algo menor. Esto permite comprobar que las células eritroides obtenidas tienen propiedades transportadoras de oxígeno.

Desde una de las líneas celulares cultivada (MA99 y MA133) se obtienen células eritroides Rh negativas. El cultivo de la línea celular MA01 genera células con determinantes antigénicos A (fenotipo A+), la M99 genera células con determinantes antigénicos B (fenotipo B+) y con el cultivo de la línea celular WA01 se obtienen células sin determinantes antigénicos A y B, es decir con un fenotipo 0.

Estado de desarrollo de la tecnología

Fase experimental

Tecnologías alternativas

La transfusión de concentrados de hematíes humano de donantes voluntarios.

Hasta el momento actual todos los intentos de conseguir transportadores de oxígeno han fracasado^{6,7}.

Características clínicas

Tipo de tecnología

Tratamiento

Ámbito de aplicación de la tecnología

Hospitalario

Indicaciones

En medicina, todas aquellas situaciones en las que existe un descenso importante de los glóbulos rojos por cualquier etiología (congénita y/o adquirida) y consecuentemente los problemas derivados de una mala oxigenación tisular, son tratadas con la administración de glóbulos rojos (concentrados de hematíes) obtenidos de la sangre humana de donaciones voluntarias.

Los productos obtenidos por cultivo de células madre humanas, según los investigadores, podrían ser empleados en primera instancia en aquellos pacientes en los que la transfusión tradicional es imposible, como es el caso de pacientes con glóbulos rojos de fenotipo raro y en pacientes poli-inmunizados. También serían subsidiarios pacientes que por su patología precisan transfusiones repetidas desde edades muy tempranas, como es el caso de las hemoglobinopatías (talasemias) o la anemia falciforme y posiblemente los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos con requerimiento de grandes volúmenes de hemoderivados.

Otras posibles indicaciones serían la utilización de las células obtenidas por cultivo como vectores transportadores de fármacos. Esto se basa en el hecho de que los glóbulos rojos tienen una adecuada biodistribución y no pueden dividirse al no tener núcleo. El fármaco se incorporaría en las células eritroides cultivadas y éstas lo liberarían progresivamente en el organismo reduciendo, con ello, los efectos adversos que tienen cuando se administran de forma intravenosa (ej: L₁ asparaginasa en la leucemia aguda infantil).

Si se reduce la complejidad técnica de producción, se consigue perfeccionar la técnica de almacenamiento y con ello el coste del

procedimiento, en un futuro es posible que pudieran beneficiarse todos los pacientes que precisen una transfusión de glóbulos rojos con independencia de la etiología y de los volúmenes de sangre requeridos.

Número de pacientes

En Estados Unidos, en el año 2000, se obtuvieron 13,4 millones de unidades de sangre y fueron transfundidas 12,5 millones en el año 2003, un 93% de las unidades donadas⁸.

Según la Federación Española de Donantes de sangre, en España se llevan a cabo 38 donaciones por cada mil habitantes, pero el índice ideal debería alcanzar las 43 donaciones.

Datos de la Cruz Roja de Madrid afirman que en 2006 se realizaron 1.695.465 donaciones de sangre en toda España, un número importante, pero que no garantiza el autoabastecimiento, cifrado en 1.950.000 donaciones anuales. Por lo tanto hay un déficit de 300.000 donaciones al año⁹.

Justificación y Objetivos

Actualmente, se ha venido observando que el número donantes voluntarios, como única fuente de obtención de los concentrados de hematíes y de otros componentes sanguíneos, es cada vez menor y paralelamente las necesidades y la demanda no cesan en su aumento, lo cual plantea problemas de abastecimiento de hemoderivados en las Unidades de Hemoterapia (Centros Regionales de Transfusión y Bancos de Sangre). Hasta el momento, reproducir total o parcialmente el complejo mecanismo de la hematopoyesis no ha sido factible y por otra parte, los intentos de encontrar sustitutos a los hemoderivados han fracasado.

De ahí, el interés de los resultados obtenidos en los estudios que abordan la obtención de eritrocitos a partir del cultivo las células madre embrionarias humanas.

Los objetivos generales de los informes de síntesis de tecnologías emergentes son:

- Detectar precozmente nuevas tecnologías o cambios en las existentes con impacto potencial sobre el Sistema Sanitario.
- Sintetizar la información disponible sobre las tecnologías detectadas.
- Aportar información actualizada que ayude a la toma de decisiones en los distintos niveles del Sistema Sanitario.

Por todo ello, el objetivo específico planteado es conocer el estado actual de la investigación en esta área.

Metodología

La metodología se basó en una búsqueda estructurada en bases prefijadas, lectura crítica de la literatura localizada, síntesis de los resultados y valoración de los mismos en relación al contexto del Sistema Nacional de Salud.

La búsqueda se centró en localizar ensayos clínicos aleatorizados y estudios observacionales con grupo control. Las bases de datos usadas fueron (sin límite de fecha hasta noviembre de 2008): Medline, Embase, Scirus, WOK y el registro de ensayos clínicos de la Cochrane Library. También se buscó en la Red Internacional de Agencias de Evaluación de Tecnologías (INAHTA) a través del *Center for Reviews and Dissemination* (CRD), la Red Europea de Detección Precoz de Tecnologías (EuroScan) y el registro de ensayos clínicos norteamericano ClinicalTrials.gov (<http://clinicaltrial.gov/>).

La estrategia de búsqueda se muestra en el Anexo 1.

Para el análisis crítico se plantearon las recomendaciones de la Critical Appraisal Skills Programme adaptadas para España (CASPe)

Resultados

Descripción de la búsqueda

Recuperamos 31 referencias bibliográficas de las fuentes investigadas después de eliminar duplicados. Tras la primera fase de lectura de título y resumen, fueron seccionados 17 trabajos para su lectura a texto completo. De ellos, se eliminaron 2 artículos por ser trabajos realizados únicamente en células madre de animales, 3 artículos que realizaban co-cultivos de células embrionarias humanas con células animales y nueve revisiones narrativas. Tres fueron los artículos seleccionados para su evaluación crítica^{5,10,11}.

Descripción de los estudios

Los tres estudios seleccionados han conseguido producir a gran escala células eritroides a partir de células embrionarias humanas “*ex vivo*”. No obstante, está por demostrar que estas células transporten oxígeno “*in vivo*” tanto en animales como en humanos.

Los trabajos de Olivier et al.¹⁰ y Qiu et al.¹¹ fueron realizados por el mismo equipo de investigación y consiguieron, a partir de una línea de células madre humanas embrionarias (H1) co-cultivadas con una línea de células hepáticas fetales, células eritroides similares a las producidas en el saco vitelino embrionario y por lo tanto portadoras de hemoglobina embrionaria y fetal. No obtuvieron cadenas b de hemoglobina. El estudio de Qui et al.⁶ aportó una modificación en la metodología de trabajo, prolongó el tiempo de co-cultivo a 35 días, frente a los 14 días del estudio de Olivier et al.⁵. Con ello consiguieron aumentar el porcentaje de células eritroides fetales obtenidas.

El trabajo de Lu et al.⁵ describió algunas mejoras sobre los estudios previos. Obtuvieron la inducción de precursores de hemangioblastos humanos, células más precoces en la escala de la evolución eritroide, y en una serie de pasos sucesivos consiguieron su diferenciación, expansión y maduración. No realizaron co-cultivo con otras células, utilizando medios de cultivo determinados y citocinas estimulantes de la proliferación de células hematopoyéticas para intentar reproducir el mecanismo fisiológico de la hematopoyesis.

Principales resultados:

Olivier et al.¹⁰ y Qui et al.¹¹ demuestran que es posible la obtención de células eritroides hemoglobinizadas pero no su capacidad de transportar oxígeno, aportación que sí realiza Lu et al.⁵

Por otra parte, Lu et al.⁵ consiguieron una mayor cantidad de células eritroides cultivadas. Así, por cada $2-3 \times 10^6$ células madre se generaron $2-3 \times 10^6$ células eritroides cada 3-5 días frente a los 35 días que precisó Qui et al.¹¹

En el trabajo de Lu et al.⁵ se describió la obtención de células hemoblobinizadas con un 16% cadenas de globina b en el día 28 frente al 2% de las obtenidas por Qui et al.¹¹ en el día 35. Lu et al.⁵ también demostró que las células cultivadas que obtuvo estuvieron perfectamente caracterizadas antigénicamente como células eritroides, poseían la capacidad de transportar oxígeno similar a la de los glóbulos rojos normales y respondían igual a los cambios de pH y de 2,3 difosfoglicerato, factores responsables de la disociación entre la hemoglobina y el oxígeno.

Perspectivas

Esta tecnología permitiría la producción masiva “*ex vivo*” bien de precursores eritroides, bien de hematíes funcionales, según el momento de maduración elegido. Ambos productos podrían ser transfundidos¹²:

- Los precursores eritroides: son las células obtenidas en el día 10 del cultivo, pueden conseguirse hasta 1000 veces su cifra normal. Se podrían congelar sin que perdieran su capacidad proliferativa y podrían continuar su proliferación “*in vivo*”. La ventaja principal que aportan es la baja expresión de HLA-1 y HLA-DR y la desventaja es la proliferación concomitante de leucocitos, aunque en pequeñas cantidades.
- Los hematíes maduros: su amplificación permite obtener 2×10^5 a 2×10^6 células (equivalente a 2-6 concentrados de hematíes de donantes). Esto supondría conseguir una cantidad casi ilimitada de concentrados de hematíes. Este producto sería más adecuado para el uso clínico ya que permite un perfecto control de la dosis de la transfusión y pueden considerarse puros y libres de contaminantes como leucocitos, plaquetas y plasma.

Limitaciones y desventajas

La más importante es que las células obtenidas tienen poca hemoglobina formada por cadenas β , que son las más frecuentes en los hematíes maduros y que liberan el oxígeno con más facilidad.

Son pocas las células que se consiguen sin determinantes antigénicos, es decir grupo 0 Rh negativos y que pudieran servir como donantes universales¹³.

Riesgos y Seguridad

Está por demostrar su eficacia y seguridad “*in vivo*”.

No obstante, según los investigadores, al ser células carentes de ADN se evitarían los riesgos de incompatibilidad y de rechazo (reacciones hemolíticas y aloinmunización), así como otros problemas actuales relacionados con la transfusión, como el desarrollo de enfermedades infecciosas por la transmisión de virus (síndrome de inmunodeficiencia adquirida, hepatitis por los virus B y C y posiblemente otros tipos de hepatitis), transmisión de bacterias (contaminación de la sangre durante su manipulación), transmisión de parásitos (malaria) o de enfermedades causadas por microorganismos emergentes.

Estudios en marcha

Están orientados a conseguir hematíes maduros con cadenas de hemoglobina adulta que permitan una adecuada liberación de O_2 , así como el cultivo de hematíes que permitan el fenotipo de donante universal. Otros estudios trabajan sobre métodos que posibiliten, a través de destrucción enzimática, la eliminación de determinantes antigénicos de las células cultivadas con el objetivo de conseguir fenotipo de donante universal^{14,15}.

Aspectos económicos

Estudios de evaluación económica

No se han recuperado estudios que evalúen desde el punto de vista económico este procedimiento.

Coste por unidad y precio

Por determinar.

Referencias

1. Palis J. Ontogeny of erythropoiesis. *Curr Opin Hematol.* 2008;15:155-61.
2. McGrath KE, Kingsley PD, Koniski AD, Porter RL, Bushnell TP, Palis J. Enucleation of primitive erythroid cells generates a transient population of pyrenocytes in the mammalian fetus. *Blood.* 2008;111:2408-17.
3. Fantoni A, de la Chapelle A, Marks PA. Synthesis of embryonic hemoglobins Turing erythroid cell development in fetal mice. *J Biol Chem.* 1969;244:675-81.
4. Umeda K, Heike T, Nakata-Hizume M, Niwa A, Arai M, Shinoda G. et al. Sequential analysis of alpha- and beta-globin gene expression during erythropoietic differentiation from primate embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2006;24:2627-36.
5. Lu SJ, Feng Q, Park JS, Vida L, Lee BS, Strusbauch M, et al. Biological properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood.* 2008;112:4475-84.
6. Kocian R. Haemoglobin, oxygen carriers and preoperative organ perfusion. *Best Prac Res Clin Anaesth.* 2008;22:63-88.
7. Smani Y, Labrude P, Vigneron C, Faivre B. Les transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine et les tentatives de substituer les globules rouges. *Trans Clin Biol.* 2007;14:464-73.
8. Goudnough LT. Risk of blood transfusion. *Crit Care Med.* 2003;31: s678-86.
9. Cruz Roja Española. Centro de Transfusión. URL: <http://www.donarsangre.org/noticiaampliada.html?id=109>. Consultada: 2008-10-30. (Archived by WebCite® at <http://www.webcitation.org/5bxDVEIOO>)
10. Olivier AM, Qiu C, Velho M, Hirsch RE, Bouhassira E. Large-scale production of embryonic red blood cells from human embryonic stem cells. *Exp Hematol.* 2006;34:1635-42.

11. Qiu C, Olivier E, Velho M, Bouhassira EE. Globin switches in yolk sac-like primitive and fetal-like definitive red blood cells produced from human embryonic stem cells. *Blood*. 2008;111:2400-08.
12. Douay L, Andreu G. Ex vivo production of human red blood cells from hematopoietic stem cells: what is the future in Transfusion? *Trans Med Rev*. 2007;21:91-100.
13. Chang KH, Nelson AM, Cao H, Wang L, Nakamoto B, Ware CB, et al. Definitive-like erythroid cells derived from human embryonic stem cells coexpress high levels of embryonic and fetal globins with little or no adult globin. *Blood*. 2006;108:1515-23.
14. Olsson ML, Hill CA, de la Vega H, Liu QP, Stroud MR, Valdinocci J, et al. Universal red blood cells enzymatic conversion of blood group A and B antigens. *Trans Clin Biol*. 2004;11:33-39.
15. Olsson ML, Clausen H. Modifying the red cell surface: towards an ABO universal blood supply. *BJH*. 2007;40:3-12.

Anexo 1. Estrategia de búsqueda

MEDLINE

#1 Search “embryonic stem cell*”[Title]	1254
#2 Search “embryonic stem cells”[Title]	3152
#3 Search #1 or #2	4395
#4 Search “red blood cells”[Title]	5766
#5 Search “erythroid”[Title]	4274
#6 Search #4 or #5	10035
#7 Search #2 AND #4	3
#8 Search #3 and #4	10
#9 Search #1 and #4	2
#10 Search #2and #5	1
#12 Search #7 or #9 or #10or #11Limits: Animals	11
#13 Search #7 or #9 or #10or #11 Limits: Humans	6
#14 Search (#13not #6) or #14 Limits: Humans	6
#15 Search Embryonic Stem Cells[MeSH Major Topic] Limits: Humans	1213
#16 Search Erythrocytes[MeSH Major Topic] Limits: Humans	44176
#17 Search #15and #16 Limits: Humans	3
#18 Search #14 OR #17 Limits: Humans	7

EMBASE

#1. embryonic AND stem AND cell*:ti	10.663
#2. red AND blood AND cell:ti	14.333
#3. erythroid:ti	4.569
#4. #2 OR #3	18.820
#5. ‘embryonic stem cell’/de	6.052
#6. ‘erythrocyte’/de	96.247
#7. #1 AND #4	52
#8. #5 AND #6	20
#9. #7 OR #8	68
#10. #7 OR #8 AND [humans]/lim	16

#11. #7 OR #8 AND [animals]/lim	45
#12. #11 AND nt AND #10	0
#13. #11 NOT #10	39
#14. #9 NOT #13	29

WOK

#1 Title=(EMBRYONIC STEM CELL*) AND Title=(RED BLOOD CELL*)Timespan=All Years	5
#2Title=(EMBRYONIC STEM CELL*) AND Title=(ERITHROCYTE) Timespan=All Years	0
#3Title=(EMBRYONIC STEM CELL*) AND Title=(ERYtHROCYTE) Timespan=All Years	1
#4Title=(EMBRYONIC STEM CELL*) AND Title=(ERYtHROID) Timespan=All Years	31
#4 OR #1Timespan=All Years	35

OTRAS FUENTES

Oficina europea de patentes

<http://v3.espacenet.com/textdoc?DB=EPODOC&IDX=WO2007095064&F=0>

US Patent & Trademark Office

<http://appft1.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&u=%2Fnethtml%2FPTO%2Fsearch-adv.html&r=1&p=1&f=G&l=50&d=PG01&S1=20080003674&OS=20080003674&RS=20080003674>

Impreso en cartulina  y papel fabricado con pasta libre de madera.

ISBN 978-84-96990-63-0



9 788496 990630

Precio: 10 €