

de especialización. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos Peru. 2002.

47. Hiraki A, Aoe K, Eda R, Maeda T, Murakami T, Sugi K, Tafeyama H. Comparison of six biological markers for the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Chest*. 2004;125:987-989.
48. Diacon A H, Van de Wal BW, Wyser C, Smedema JP,

Bezuidenhout J, Bolliger CT, et al. Diagnostic tools in tuberculous pleurisy: A direct comparative study. *Eur Respir J*. 2003;22:589-591.

49. Sakuraba M, Masuda K, Hebisawa A, Sagara Y, Komatsu H. Pleural effusion adenosine deaminase (ADA) level and occult tuberculous pleurisy. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2009;15:294-296.

Gac Méd Caracas 2012;120(3):197-212

Identificación de células madres hematopoyéticas fetales y de adultos. Mitos y realidades de los trasplantes

Drs. Aixa Müller de Soyano ^(1,2), Andrés Soyano ⁽³⁾

e-mail: amuller@gmail.com

RESUMEN

Las células madres hematopoyéticas son células indiferenciadas con una amplia capacidad de proliferación y de autorrenovación; están presentes en médula ósea (1 %-3 %) y en sangre (0,1 %), identificándose por la expresión del marcador CD34. Pueden ser movilizadas desde la médula ósea a la sangre después de quimioterapia o con citoquinas. En este estudio se identificaron células madres en sangre de fetos, neonatos y adultos. Se analizaron 278 muestras de sangre de fetos de 17-32 semanas, neonatos, y en productos de aféresis de células madres de pacientes con enfermedades malignas. La cantidad de células CD34+

disminuyó con el aumento de la edad gestacional de 6,10 % a 1,03 %. De estas células se obtuvo la formación de colonias granulocíticas y eritrocíticas en cultivos. En sangre de cordón se obtuvieron 0,86 ± 0,33 % células CD34+. Se analizaron las indicaciones y resultado de trasplantes de médula ósea y de sangre de cordón en diferentes patologías. Hasta ahora no existe indicación médica para el uso de células madres autólogas de sangre de cordón en leucemias infantiles, ni en enfermedades genéticas. En infarto del miocardio no se han obtenido resultados satisfactorios con los protocolos clínicos evaluados, mientras que en daño neurológico, el uso de células madres permanece todavía como una aproximación experimental.

⁽¹⁾ Unidad de Hematología y Oncología, Ministerio de Salud / Universidad Central de Venezuela, Caracas.

⁽²⁾ Banco de Sangre, Clínica El Ávila, Urbanización Altamira, Caracas.

⁽³⁾ Centro de Medicina Experimental, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas.

Palabras clave: Célula madre hematopoyética. Trasplante de médula ósea. Trasplante de células de cordón. Trasplante de células madres. Aféresis.

SUMMARY

Hematopoietic stem cells are undifferentiated cells with high proliferative rate and autorenewal; they are found in bone marrow (1 %-3 %) and blood (0,1 %), being identified by the expression of the marker CD34. They may be mobilized from bone marrow (B.M.) into the blood after chemotherapy or cytokine treatment. In this study, stem cells were identified in fetal and adult blood. Two hundred and seventy eight blood samples were analyzed; they were obtained from fetuses (17-32 weeks-old), neonates, and in the products from apheresis performed to patients with malignancies. The amount of CD34+ cells decreased as the gestational age increased (6,10 % to 1,03 %). These cells grew in culture to produce granulocytic and erythrocytic colonies. In cord blood CD34+ cell were identified (0,86 % ± 0,33 %). Indications and results of bone marrow and cord blood stem cell transplants in different pathologies are analyzed. The transplant of allogeneic cord blood stem cells in patients not having a compatible donor is the worldwide approved indication for this procedure. No satisfactory results has been obtained in cases of myocardial infarct. The treatment of neurological damage remains experimental.

Key words: Hematopoietic stem cell. Bone marrow transplant. Cord blood transplant. Stem cell transplant. Apheresis.

INTRODUCCIÓN

En un sentido amplio se define en la actualidad como célula progenitora (*stem cell*, en la terminología inglesa) a un tipo celular no diferenciado que posee una amplia capacidad de proliferación, de autorrenovación (capacidad de producir nuevas células de su misma clase) y de diferenciación (capacidad de generar células especializadas).

Es importante aclarar que algunos autores reservan el concepto de *stem cell* o célula madre para designar a las células indiferenciadas pluripotenciales, es decir, aquellas que poseen la capacidad de diferenciarse en más de un tipo celular, mientras que utilizan el término célula progenitora para el tipo celular indiferenciado pero comprometido a diferenciarse hacia un solo tipo celular (1).

Por definición una célula no puede ser considerada hematopoyética progenitora a menos que la célula haya demostrado su capacidad de autorrenovación y los estudios *in vivo* o *in vitro* hayan demostrado que la mencionada célula es capaz de diferenciarse en todas las líneas celulares hemáticas.

HEMATOPOYESIS EMBRIONARIA Y FETAL

El término hematopoyesis se refiere a la producción continua de células sanguíneas. Desde comienzos de la vida embrionaria y durante toda la vida del individuo, nuevas células entran en la circulación sanguínea mientras que las células envejecidas o dañadas son retiradas de la circulación (2).

Hematopoyesis intrauterina humana según criterio morfológico

Durante el desarrollo humano *in utero* las primeras células sanguíneas se desarrollan en el saco vitelino entre los días 16 y 19 después de la concepción; a continuación, entre las semanas 5 y 6 la hematopoyesis se centraliza fundamentalmente en el hígado y entre la semana 8 y 9 las células hematopoyéticas se localizan en la médula de los huesos largos (2).

Hematopoyesis en el hígado fetal

A la 5ª o 6ª semana de gestación ocurre hematopoyesis en el hígado. La célula sanguínea observada en los vasos y en los sinusoides hepáticos en desarrollo es el eritroblasto primitivo. En las cuatro semanas siguientes hay una diferenciación del eritroblasto primitivo al eritroblasto definitivo con producción de eritrocitos maduros enucleados en el hígado fetal. De la semana 5 a la semana 22 también se pueden identificar en el hígado macrófagos, megacariocitos, granulocitos y linfocitos. Los megacariocitos están presentes en todas las fases de la hematopoyesis hepática. Un aumento significativo de granulocitos se observa después de la semana 21 de desarrollo coincidiendo con el aumento de la hematopoyesis de la médula ósea. Los linfocitos permanecen en una menor cantidad en el hígado (1 % de las células sanguíneas) desde la semana 7 a la 13. El timo es exclusivamente epitelial hasta la semana 7, cuando comienza a ser invadido por linfocitos. El porcentaje de células madres (hemocitoblastos o *stem cells*) es alto y hasta 10 % de las células sanguíneas en el hígado del embrión en las semanas 5ª y 6ª (2).

Hematopoyesis en la médula ósea fetal

La muestra más temprana de la médula ósea en la cual células hematopoyéticas están presentes fue tomada de un embrión de 8 semanas de desarrollo. La célula predominante a las 8 - 9 semanas fue el eritroblasto primitivo. La producción del eritroblasto

definitivo aumenta de la semana 11 a la 14, llegando al 100 % en esta semana. Los granulocitos aparecen de la semana 8 a la 9 del desarrollo embrionario en la médula ósea de embriones de la semana 10 a la semana 16. Los linfocitos aumentan desde el 12 % de las células totales de la médula a la 12ª semana hasta 20 %-30 % en embriones de mayor edad. Los megacariocitos están presentes desde la semana 8. Las células inmaduras, que probablemente representan las células madres (*stem cells*) y las células progenitoras varían de 15 % en la semana 12-13 a 1 %-4 % en la semana 21-23 (2).

Desarrollo de la hematopoyesis en el bazo fetal

A las 8 semanas de gestación el bazo está primariamente compuesto de una malla de células mesenquimales con algunos eritroblastos primitivos contenidos dentro de los vasos sanguíneos, con pocos macrófagos y precursores de neutrófilos presentes (3).

Calhoun y col. (4) usaron métodos para determinar si el bazo humano fetal de una gestación del segundo trimestre (entre 13-22 semanas) era un sitio activo de hematopoyesis. Muestras de la médula ósea, bazo e hígado fueron examinadas histológicamente y las suspensiones celulares de cada sitio fueron preparadas para enumeración de células sanguíneas maduras y sus precursores inmediatos. Linfocitos, macrófagos y células eritroides predominaron a las 13 semanas de gestación. Neutrófilos inmaduros y maduros fueron identificados en el bazo solo a las 16 semanas de gestación. A lo largo del estudio, focos de hematopoyesis activa estuvieron presentes en el hígado y la médula ósea, pero no en el bazo. Estos estudios sugieren que el bazo no es normalmente un órgano activo de hematopoyesis durante el segundo trimestre de gestación.

En resumen, durante la vida fetal la hematopoyesis o producción de las células hematopoyéticas que darán origen a leucocitos, eritrocitos y plaquetas ocurre por primera vez en el saco vitelino y luego en el hígado fetal, siendo posteriormente transferida a la médula ósea. Mientras esta transición ocurre, las células madres (*stem cells*) y las células progenitoras circulan en abundancia en la sangre fetal.

Identificación de las células madre hematopoyéticas

La irradiación letal de ratones deprime la hematopoyesis y causa una pancitopenia (disminución extrema de todos los tipos celulares hemáticos) fatal (5). La pancitopenia letal causada por la irradiación

puede evitarse si el bazo mórvido es protegido de la irradiación o si se infunden células hematopoyéticas al ratón irradiado (6). Till y MacCulloch lograron identificar precursores hematopoyéticos individuales *in vivo* al irradiar un ratón con una dosis suficiente para destruir su sistema hematopoyético, y luego su reconstitución con un determinado número de células de médula ósea provenientes de otro ratón genéticamente idéntico. Parte de las células inoculadas migran al bazo donde comienzan a proliferar dando origen a un grupo de células que forman una colonia o nódulo que, 7 a 10 días después de la inoculación, pueden ser visualizadas a simple vista en la superficie esplénica. Histológicamente se pueden identificar 4 clases de colonias: eritrocíticas, granulocíticas, trombocíticas, y mixtas. Con esta técnica Till y MacCulloch demostraron que, cuando se forman colonias mixtas que contienen elementos eritroides, granulocíticos, y trombocíticos, tales elementos tienen su origen en una única célula progenitora que ellos identificaron funcionalmente como la unidad formadora de colonias esplénicas (*CSF-U, colony forming unit* en la terminología inglesa). A pesar de que en el ensayo original no se formaron colonias de linfocitos, puesto que las células se dispersan por todo el bazo, se pudo concluir que además de CFU-S, debería existir una célula aun más primitiva que sería un precursor común tanto de la serie mieloide como de la linfoide (6,7).

En 1966 Pluznik y Sachs (8), y Bradley y Metcalf (9) reportaron que las células hematopoyéticas mórvidas podían ser cultivadas *in vitro* y que la adición de líquidos solubles de órganos mórvidos (orina, o extracto de útero de ratonas embarazadas) resultaba en la formación de colonias *in vitro*. Este líquido tisular biológicamente activo fue llamado actividad estimulante de colonias (*CSA, colony stimulant activity*). Cada colonia mieloide fue derivada de una sola célula precursora, llamada unidad formadora de colonias en cultivo (CFU-C). Otros trabajos revelaron que las colonias estaban compuestas de granulocitos, macrófagos o ambos (CFU-GM) y que el tipo de colonia formado tenía relación con el CSA añadido.

Más tarde, usando suero de ratones anémicos como fuente de CSA de eritrocitos, Axelrad y col. (10) demostraron que las colonias de eritrocitos tenían un origen clonal *in vitro* y denominaron a la célula precursora más primitiva de eritrocitos, unidad inicial formadora de eritrocitos (*BFU-E, erythroid burst-forming unit*).

Células progenitoras multipotentes fueron también

identificadas y llamadas unidades formadoras de colonias mixtas. Estos ensayos realizados en ratones fueron rápidamente adaptados a humanos para detectar las células hematopoyéticas progenitoras humanas (11).

Un nuevo impulso en este campo surge de los estudios de Donald Metcalf y Malcolm A.S. Moore, quienes lograron cultivar diversos tipos de células hematopoyéticas *in vitro*, utilizando para ello un soporte semisólido (agar, agarosa, o metilcelulosa) y un medio de cultivo de sustancias inductoras, posteriormente identificadas como citoquinas. Muchas de estas citoquinas han sido identificadas como factores estimulantes de colonias entre las cuales se puede mencionar particularmente la eritropoyetina (EPO), el factor estimulante de colonias de eritrocitos, la trombopoyetina, el factor estimulante de colonias de megacariocitos, el factor estimulante de colonias de granulocitos, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, la interleuquina 3 (IL-3) y la timopoyetina (12).

Identificación de progenitores hematopoyéticos con cultivos en agar

Si se siembran células madres (*stem cells*) en cultivos de agar con múltiples citoquinas, se pueden identificar progenitores hematopoyéticos con un alto grado de proliferación, esto es células formadoras de colonias altamente proliferativas o HPP-CFC (*high proliferative potential-colony-forming cells*) que producen colonias que contienen más de 50 000 células, las cuales son visibles a simple vista. La mayoría de las colonias que provienen de unidades formadoras de colonias en cultivo contienen menos de 50 000 células y son microscópicas.

Cultivos *in vitro* de células madres hematopoyéticas sobre una monocapa de células de médula ósea o células del estroma tisular no hematopoyético del hígado fetal (incluyendo macrófagos, células endoteliales, fibroblastos, y preadipocitos) resultan en hematopoyesis sostenida por varios meses (13,14).

Las células hematopoyéticas más primitivas (esto es, las que originan los progenitores hematopoyéticos) residen debajo de las monocapas del estroma, donde las células de la sangre maduras producidas son liberadas dentro del medio de cultivo como células no adherentes. Estas células muridas o humanas que inician los cultivos de larga duración y dan origen a progenitores multipotentes y comprometidos durante 3-4 semanas *in vitro* se les ha denominado LTC-IC

(*long term culture initiating cells*). Estas células son consideradas los precursores hematopoyéticos más primitivos detectados por medio de ensayos *in vitro* (15,16).

Evaluación de las células madres pluripotenciales por citometría de flujo

En un esfuerzo para caracterizar mejor las células madres y progenitoras y obtener resultados con mayor rapidez con los cultivos en placas, en horas en vez de semanas, los investigadores generaron anticuerpos monoclonales capaces de reconocer los antígenos de la superficie de las células que participan en el desarrollo hematopoyético. A través del uso de los anticuerpos monoclonales y la citometría de flujo el fenotipo de la célula madre se ha identificado, de manera que actualmente pueden reconocerse y aislarse células hematopoyéticas madres y progenitoras. Desafortunadamente no se ha descubierto un antígeno único por el cual se reconozca exclusivamente una célula hematopoyética madre.

Muchos de los antígenos son coexpresados por una proporción de la progenie de las supuestas células hematopoyéticas madres y por lo tanto varios anticuerpos monoclonales pueden reconocer el mismo antígeno de la superficie celular. Por esta razón los investigadores del campo diseñaron una clasificación internacional para uniformar los hallazgos. De tal forma que a cada anticuerpo monoclonal que reacciona con un antígeno de superficie de una sola célula sanguínea se les asigna un número de *cluster* de diferenciación denominado CD (17,18).

Antígeno CD34

Uno de los anticuerpos más usados para reconocer dichas células es un anticuerpo dirigido contra la proteína sialomucina, conocida también como antígeno CD34. El CD34 fue identificado por un anticuerpo monoclonal originado contra una línea celular de eritroleucemia KG-1^a (19) y ha sido usado ampliamente en la selección positiva de células madres y progenitoras hematopoyéticas (20). El CD34 es también expresado sobre las células hematopoyéticas del hígado fetal humano y mayor cantidad de este antígeno CD34 es expresado sobre las células progenitoras hematopoyéticas fetales que sobre las células progenitoras hematopoyéticas del adulto (21,22).

Células CD34+ en el saco vitelino y en embriones

Las células progenitoras hematopoyéticas han sido identificadas tan temprano como el día 23 de la gestación humana en el saco vitelino y dentro del propio embrión. Las células CD34+ intraembrionarias estuvieron localizadas en la porción ventral de la aorta dorsal. Los grupos hematopoyéticos estuvieron ubicados en el lumen fuertemente asociados a las células endoteliales (23).

Huyhn y col. (24) aislaron células CD34+ los días 35-40 de gestación a partir del saco vitelino y del hígado y cultivaron esas células en ensayos de células progenitoras hematopoyéticas. Las células progenitoras hematopoyéticas fueron más numerosas en el embrión que en el hígado y saco vitelino. Esos resultados fueron interpretados como evidencia que precursores hematopoyéticos intraembrionarios ocurren en altas concentraciones cuando el hígado está iniciando la hematopoyesis.

Evaluación por citometría de flujo de las células madres pluripotenciales

El análisis inmunofenotípico con anticuerpos monoclonales de las células de la sangre, médula ósea, sangre de cordón umbilical, etc. en el citómetro de flujo de tres colores nos permite caracterizar las células CD34 pluripotenciales en dos subtipos: 1. Las células más primitivas, que son CD34+, CD38-, HLA-Dr -, las cuales tienen la potencialidad de diferenciarse en precursores hematopoyéticos y células del estroma, y 2. Las células menos primitivas son CD34+, CD38, HLA Dr +, que pueden diferenciarse en todas las líneas hematopoyéticas (25-27,28,29).

Evaluación por citometría de flujo de las células progenitoras comprometidas hacia una línea celular hematopoyética

La citometría de flujo multiparamétrica provee una rápida caracterización de preparaciones de células progenitoras y complementa el ensayo de los cultivos de las unidades formadoras de colonias. El objetivo del análisis multicolor es subdividir la población de células CD34+ y proveer un recuento diferencial que pueda ser obtenido en varias horas y no en varias semanas. Este diferencial de las células progenitoras puede proveer información en relación al potencial de injerto linaje específico de las células de la sangre, de la médula ósea, del cordón umbilical o de otras fuentes de CD34+ y también puede caracterizar los cambios que ocurren en esas poblaciones de progenitoras ya

comprometidas después que el individuo de donde se extrajeron fue sometido a diversos regímenes de movilización (quimioterapia, factores de crecimiento G-CSF o GM-CSF, o ambos). Los investigadores han utilizado el análisis de las subpoblaciones de CD34+ para definir las subpoblaciones ya comprometidas hacia una línea celular, incluyendo CD19 y CD10 encontrados sobre los linfocitos pre-B. CD7 es expresado por linfocitos pre-T. El CD45RA está presente en células progenitoras ya comprometidas a diferenciarse en células mieloides y CD45RO se encuentra en progenitores eritroides (26,28,30).

Progenitores comprometidos hacia el linaje mieloide

La diferenciación de los progenitores mieloides pueden ser determinados por la expresión diferencial de varios antígenos de la superficie celular. El antígeno CD33 es uno de los que aparece más tempranamente en la superficie de las células progenitoras que diferencia el linaje mieloide. Las células que expresan CD33 y CD34 pueden dar origen a unidades iniciales formadoras de colonias eritroides y granulocíticas-monocíticas (CFU-E y CFU-GM). Usando anticuerpos monoclonales CD33 y CD45 sobre las células CD34+ se pueden separar los progenitores mieloides, ya que la expresión intensa de CD45 representa los progenitores monocíticos. La expresión de CD13 sobre las células CD34+ parece ser más específica de la serie mieloide, ya que CD13 no es expresado por los progenitores eritroides (24,26,27).

Progenitores comprometidos hacia el linaje linfoide

Los antígenos CD19 y CD10 aparecen sobre la superficie celular tempranamente en las células de linaje linfoide B. Mientras que el antígeno CD19 es específico para el linaje de linfocito B, el CD10 es expresado sobre células comprometidas al linaje de linfocitos T o B y es gradualmente perdido en el proceso de maduración de ambas líneas (25). Los progenitores de los linfocitos T pueden ser identificados por la expresión de CD7 o CD2 en células CD34+ (19,27).

Progenitores comprometidos hacia el linaje eritroide

El antígeno CD71 aparece en la superficie celular una vez que la célula ha sido comprometida hacia el linaje de eritrocitos, lo cual ocurre simultáneamente con la pérdida de los antígenos CD34 y CD33, así

como con la disminución de CD45. La expresión de CD36 sobre las células CD34+ también pueden identificar a los progenitores eritroides (20,31,32).

Progenitores comprometidos hacia el linaje megacariocítico

La expresión del complejo de las glicoproteínas plaquetarias IIb/IIIa (CD41) sobre las células CD34+ indica compromiso hacia el linaje megacariocítico (19).

Células hematopoyéticas de embriones y fetos

El fenotipo de superficie celular que permite concentrar el mayor número de células progenitoras hematopoyéticas primitivas y comprometidas a diferenciarse se encuentra en las células hematopoyéticas de embriones y fetos, las cuales no expresan ningún antígeno de las células sanguíneas maduras tales como Lin-; CD38 (una glicoproteína de la transmembrana); CD71 (receptor de la transferrina); pero expresan CD4, CD34, CD117 (receptor Kit de la tirosina quinasa) y CD90 (20,33,34).

Fuentes de células progenitoras

Hasta hace unos pocos años las células madres y progenitoras para trasplantes, se obtenían exclusivamente por múltiples aspiraciones de la médula ósea del donante bajo anestesia; pero desde que se descubrió que tales células también se encontraban en la sangre periférica y en sangre de cordón, estas fuentes han sido utilizadas para obtenerlas y luego trasplantarlas en un receptor alogénico (individuo genéticamente distinto), en un receptor singénico (un gemelo idéntico) o en el mismo donante (autotrasplante) (12).

Células CD34+ en sangre y médula ósea

En condiciones normales el porcentaje de células madres y progenitoras que expresan el antígeno CD34 en médula ósea es de 1 %-3 % y en sangre periférica es de aproximadamente 0,1 % (26). Las células CD34+ son capaces de dar origen a todos los tipos de células hematopoyéticas *in vitro* y la mayoría de los investigadores ha encontrado que el número de células CD34+ en sangre periférica o médula ósea

se correlaciona bien con las unidades de formación de colonias (29,30). Aún más importante es que las células CD34+ altamente purificadas derivadas de la médula ósea o de la sangre periférica son capaces de injertarse completamente en humanos una vez infundidas en el receptor (28,30,34).

Las células CD34+ son una población heterogénea con grados variables de compromiso para diferenciarse en una determinada línea celular y de la capacidad proliferativa y solo una pequeña fracción de ellas representa verdaderas células madres o *stem cells* (22,35). Las células CD34+ más primitivas (1 %-3 % del total) coexpresan HLA-Dr y niveles variables de CD13, CD49, CD50 y CD54, pero esas células no expresan CD38 o marcadores de linajes ya comprometidos como CD13, CD15, CD3 y CD20 (32). A medida que la célula se diferencia en respuesta a los factores de crecimiento, el antígeno CD34 disminuye y la célula adquiere CD38 y marcadores específicos de linaje (29,35).

Movilización de células madres y progenitoras con quimioterapia

Las células madres y progenitoras pueden ser movilizadas hacia la sangre periférica durante la fase de rebote de los leucocitos después de la mielosupresión causada por la quimioterapia. La movilización también puede ser inducida por la administración de factores estimulantes de colonias. Varios regímenes de quimioterapia mielosupresiva son capaces de movilizar las células madres y progenitoras hematopoyéticas dentro de la sangre periférica. La ciclofosfamida a dosis de 4-7 g / m² o combinaciones de drogas (adriamicina, carboplatino, taxol, etopósido, ifosfamida, daunorubicina, ara-C, 6-tioguanina, y otros) han sido usados para este propósito (29,36). Todos los regímenes de quimioterapia inducen una mielosupresión transitoria e intensa que produce una leucopenia de hasta 100 células / μ l a los 7-14 días posquimioterapia. Esta fase de leucopenia es típicamente seguida de un aumento de los leucocitos circulantes por encima de los valores basales. A medida que los leucocitos aumentan, las células madres y progenitoras hematopoyéticas comienzan a reaparecer en la sangre y aumentan rápidamente. Con la quimioterapia hay un aumento de las unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos circulantes, comparado con los valores previos, los cuales persisten por varios días (37).

Movilización por quimioterapia y factores de crecimiento

Socinski y col. fueron los primeros que demostraron que un factor de crecimiento hematopoyético (el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, GM-CSF) aumenta la concentración de progenitores hematopoyéticos circulantes y si este fue administrado después de una terapia mielosupresiva, los valores de unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos (CFU-GM) se incrementaban aún más (38).

Gianni estudió la movilización de CFU-GM después de quimioterapia en 9 pacientes con cáncer; en 5 pacientes les administró también GM-CSF. Los valores de CFU-GM circulante aumentaron aproximadamente 100 veces en el grupo que recibió solo quimioterapia y 250 veces en el grupo que recibió también GM-CSF. Los niveles aumentados de CFU-GM persistieron por 7-10 días (39).

Existen numerosos reportes que demuestran que la recuperación de la hematopoyesis es más rápida después de un trasplante de células madres de sangre periférica movilizadas con quimioterapia y factores de crecimiento como G-CSF, GM-CSF, IL-3, etc. La combinación de quimioterapia mielosupresiva y administración de factores de crecimiento hematopoyético resulta en un aumento 73 veces de las unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos (39).

Movilización por factores de crecimiento

Los factores de crecimiento han sido usados solos para movilizar células progenitoras sanguíneas, como lo describió Socinsky. La administración de G-CSF (10 mg / kg / d) produce típicamente un aumento de 20 a 50 veces de las CFU-GM y un aumento de 10 a 30 veces en las células CD34 + con un máximo al 5º día, seguida de una disminución inclusive en los casos en que se aumente la dosis. Cuando el factor es administrado subcutáneamente esos efectos son dependientes de la dosis. El uso de GM-CSF (10 mg /kg / d x 4 días) generalmente produce un aumento menos marcado de CFU-GM (mayor que 10 veces) y células CD34 (mayor que 4 veces) que el G-CSF (40-42).

Otras citoquinas y sus combinaciones pueden ser usadas para movilizar las células progenitoras sanguíneas, tales como interleuquina-3 (IL-3) e IL-6, individualmente o combinadas con GM-CSF (43).

TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS SANGUÍNEAS

En la década de 1970 se describió que las células progenitoras con potencial para injertarse están presentes no solamente en la médula ósea sino también en la sangre circulante, por lo cual se planteó la realización de transfusiones de células progenitoras obtenidas de la sangre como una alternativa al trasplante de médula ósea (37-40,44-46).

El principio que motivó el desarrollo de esta nueva tecnología se basó en la capacidad que tienen las células progenitoras, primordialmente las células con el fenotipo CD34+, de restaurar la hematopoyesis afectada por diferentes condiciones. La médula ósea es el órgano hematopoyético por excelencia y por ende la fuente principal de células progenitoras. Sin embargo, para efectos de trasplante es difícil de obtener y de bajo rendimiento y se requiere practicar múltiples punciones al donante en el caso de los trasplantes alogénicos o al paciente en el caso de los trasplantes autólogos. En este último caso, el paciente suele encontrarse en malas condiciones generales debido a la quimioterapia y radioterapia cuando se trata de pacientes con leucemia o tumores sólidos, a tal punto, que si los huesos ilíacos del paciente han sido irradiados, no es una buena fuente de células progenitoras (47).

Gabutti y col. en 1975 demostraron que la sangre de recién nacidos humanos contenía abundantes células formadoras de colonias hematopoyéticas (48). Posteriormente se demostró que la sangre de cordón umbilical tiene también una proporción de células progenitoras comparable al de la médula ósea y en mayor cantidad que la sangre periférica del adulto (12,49,50-52).

La sangre de cordón umbilical como fuente de células progenitoras fue utilizada por primera vez por Gluckman y col. en 1988, para trasplantarlas en un niño de 6 años de edad con anemia aplásica congénita (síndrome de Fanconi) con retardo de crecimiento e inestabilidad cromosómica. El síndrome de Fanconi es un desorden autosómico que causa inestabilidad del genoma y los pacientes sufren de anomalías del desarrollo, comienzo temprano de hipoplasia de la médula ósea y predisposición al cáncer aumentada. La enfermedad se manifiesta por defectos en la reparación del ADN, hipersensibilidad a agentes que unen y entrecruzan el ADN y una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas. Las células de cordón del primer niño trasplantado por Gluckman se obtuvieron de una hermana compatible y no portadora

del defecto genético. Se han reportado experiencias con sangre de cordón umbilical como fuente de células progenitoras en trasplantes en pacientes con anemia aplásica severa, talasemia, anemia drepanocítica, síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome de Gunther, leucemia linfóide aguda, neuroblastoma y leucemia crónica juvenil (53-56).

Debido a la trascendencia desde el punto de vista clínico y terapéutico y a los pocos estudios que se llevan a cabo en nuestro país, en un estudio en colaboración con el Dr. Freddy Guevara y la Dra. Bahilda Martínez, del Servicio de Perinatología del Hospital Universitario de Caracas (HUC), caracterizamos las células progenitoras en sangre prenatal, sangre de cordón y sangre de adultos. Se utilizaron para estos estudios las siguientes muestras:

- A. Veintitrés muestras de sangre fetal obtenida del cordón umbilical de gestaciones de 17-32 semanas, en pacientes de la Unidad de Perinatología (HUC) y la Cátedra de Obstetricia de la Escuela "Luis Razetti" (Universidad Central de Venezuela): 6 muestras de sangre prenatal de embarazos de 17-20 semanas, 10 de 21-25 semanas, 5 de 26-29 semanas y 2 de 32 semanas.
- B. Veinticinco muestras de sangre de cordón umbilical de recién nacidos de gestaciones de 37 a 41 semanas del Servicio de Obstetricia del HUC.
- C. Ocho muestras de sangre pre-movilización de pacientes con cáncer del Instituto de Oncología y Hematología (IOH) de la UCV-MPPS.
- D. Veinticinco muestras de sangre periférica posmovilización con ciclofosfamida (CTX) y GM-CSF o G-CSF de 12 pacientes con cáncer del IOH.
- E. Treinta y nueve muestras de los productos de aféresis de 12 pacientes con cáncer previamente tratados con ciclofosfamida y factores de crecimiento:
 - 3 pacientes con carcinoma ductal infiltrante de mama
 - 6 pacientes con linfoma no Hodgkin
 - 1 paciente con mieloma múltiple tipo IgG.
 - 1 paciente con leucemia mieloide aguda en remisión completa
 - 1 paciente con leucemia mieloide crónica.

Se estudió mediante citometría de flujo una muestra de sangre periférica de una paciente con antecedente de leucemia mieloide aguda que había

recibido un trasplante alogénico de sangre periférica de su hermana HLA compatible.

Se realizaron estudios inmunofenotípicos a muestras de 64 pacientes con leucemia linfóide aguda (43 aspirados de médula ósea y 21 muestras de sangre), 7 pacientes con leucemia linfóide crónica (3 aspirados de médula ósea y 4 muestras de sangre), 66 pacientes con leucemia mieloide aguda (47 aspirados de médula ósea y 19 muestras de sangre) y 18 pacientes con leucemia mieloide crónica (aspirados de la médula ósea).

OBTENCIÓN DE SANGRE FETAL PRENATAL

Se obtuvo 23 muestras de sangre fetal del cordón umbilical por cordocentesis o por punción de la vena intrahepática guiada por ultrasonido, de pacientes embarazadas con gestaciones entre 17 y 32 semanas que asistían a la consulta de Perinatología del Servicio de Obstetricia del HUC. La toma de sangre fetal prenatal de las pacientes se realizó como parte del proceso de evaluación médica propia del caso: sospecha de malformaciones congénitas porque la paciente presentaba antecedente de embarazos anteriores con malformaciones fetales, estudio de ecosonografía fetal anormal, elevaciones de la alfa-fetoproteína y acetilcolinesterasa en el suero, en el líquido amniótico o en ambos, casos de primigesta añosa y embarazos con sensibilización Rh. En una paciente se tomó muestra de sangre fetal porque presentó elevación tanto de la alfa-fetoproteína sérica como de la alfafetoproteína del líquido amniótico, lo cual es sospechoso de malformaciones congénitas del sistema nervioso central como son los defectos abiertos del tubo neural fetal.

También pueden presentarse elevaciones de la alfa-fetoproteína sérica y de la alfa-fetoproteína del líquido amniótico en defectos del tubo gastrointestinal fetal como en el caso de onfaloceles rotos; sin embargo, en este caso el estudio ecosonográfico suele descartar onfalocele roto ya que el líquido amniótico no estuvo contaminado con meconio, como es lo usual en presencia de onfalocele roto.

En cuatro pacientes la toma de muestra se realizó para estudio virológicos, pues se había presentado rubéola durante la gestación, una causa de malformación congénita fetal.

A tres pacientes Rh negativas se les practicó cordocentesis por presentar elevación del título de anticuerpos anti-D, es decir, eran embarazos con sensibilización Rh. En estos casos se realizó la

cordocentesis para precisar la severidad de la anemia fetal y de acuerdo a los valores de hemoglobina y hematocrito de la sangre fetal determinar la cantidad de concentrado globular Rh negativo que el feto requiere y proceder a la transfusión fetal a través del cordón umbilical. En estos casos la paciente fue monitorizada con ecosonograma fetal permanentemente durante todo el procedimiento, lo cual permitió visualizar la aguja y el sitio donde se está realizando la punción.

RESULTADOS

Se le realizaron determinaciones de hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio y electroforesis de hemoglobina a todas las muestras de sangre fetal prenatal. La hemoglobina y el hematocrito mostraron un ascenso en sus valores desde la semana 17 hasta la semana 32 de gestación. La hemoglobina tuvo un valor de $11,6 \pm 1 \text{ g / dL}$ entre las semanas 17-20, el cual fue ascendiendo a medida que aumentaba la edad gestacional hasta $13 \pm 1 \text{ g/dL}$ entre las semanas 27 y 32 de gestación. El valor del hematocrito fue también en ascenso de 37 % a 40,9 %. El volumen corpuscular medio de los eritrocitos mostró macrocitosis severa siendo entre las 17-20 semanas de gestación de 130 fl y a medida que aumentaban las semanas de gestación el volumen corpuscular medio de los eritrocitos disminuyó hasta alcanzar entre las 27-32 semanas un volumen de 117,9 fl.

La electroforesis de hemoglobina en sangre prenatal fue realizada con el objeto de confirmar los hallazgos hematológicos, que la muestra de sangre procedía del feto y no de la madre.

Dicha electroforesis de hemoglobina realizada en membranas de acetato de celulosa a pH 8,6 mostró solamente la banda de hemoglobina fetal, la cual corrió en sentido del ánodo al cátodo por detrás de hemoglobinas controles AA, en todas las muestras de sangre menores de 32 semanas de gestación.

El análisis inmunofenotípico con anticuerpos monoclonales dirigidos hacia los complejos de diferenciación de las células provenientes de sangre fetal prenatal permitió identificar la expresión de marcadores para leucocitos totales con los anticuerpos CD45 y HLA-Dr desde la edad de 17 semanas de gestación hasta la semana 32 de gestación, lo cual nos indica la presencia de glóbulos blancos en la muestra de sangre fetal.

Las células de la sangre prenatal fetal estudiadas

mostraron expresión del marcador para células madres progenitoras CD34, el cual tuvo tendencia a disminuir a medida que aumentaba la edad gestacional en estas muestras de sangre prenatal fetal analizadas.

Hubo expresión en la sangre fetal prenatal de los marcadores para los linfocitos T: CD2, CD7, CD4 y CD8.

Los anticuerpos monoclonales CD2 y CD7 reconocen principalmente los complejos de diferenciación de la mayoría de los linfocitos T y los CD4 y CD8 reconocen subpoblaciones de linfocitos T. Los CD4 reconocen los linfocitos T cooperadores o colaboradores en su interacción con otros linfocitos y los CD8 los linfocitos T supresores o con actividad citolítica sobre distintos tipos celulares.

Hubo expresión en la sangre fetal prenatal de los marcadores para linfocitos B: CD10 (pre-B), CD19 (linfocitos B inmaduros), CD20 (linfocitos pre-B y maduros). Asimismo hubo expresión en la sangre fetal de los marcadores mieloides CD13, CD14 y CD33. El CD13 reconoce monocitos y polimorfonucleares y el CD14 solo monocitos, mientras que el CD33 reconoce células de estirpe mieloides. Hubo también expresión del marcador CD11b que identifica monocitos, mielocitos, células NK y subpoblaciones de linfocitos T.

A cada una de las muestras de sangre de cordón de recién nacido se le practicó hematología y electroforesis de hemoglobina. Los valores de hemoglobina y hematocrito en sangre de cordón de recién nacidos a término entre 37 y 41 semanas fueron en ascenso mientras que el volumen corpuscular medio del eritrocito fue en descenso. La hemoglobina mostró valores de $14,1 \pm 0,07 \text{ g / dL}$ entre las semanas de gestación de 37 y 41. El hematocrito fue de $42,8 \pm 1,6 \%$ para las mismas semanas de gestación. El volumen corpuscular medio de los eritrocitos mostró macrocitosis inmensa ($106,7 \pm 4,24 \text{ fl}$).

El estudio inmunofenotípico con anticuerpos monoclonales realizado en sangre de cordón de recién nacidos a término demostró la expresión de células CD45+ ($95,8 \pm 2,53 \%$), indicando la presencia de leucocitos en dicha sangre fetal. La mayoría de estos leucocitos son linfocitos (reconocidos por el marcador CD2: $72,1 \pm 11 \%$), entre los cuales los linfocitos pre-B (CD10+) representan $0,4 \pm 0,51 \%$, los linfocitos CD19+: $15,7 \pm 3,7 \%$ y los CD20+: $13,9 \pm 5,5 \%$; también se encontró en la sangre de cordón expresión de los marcadores para células mieloides (CD33: $0,83 \pm 0,3 \%$) y del marcador para serie monocítica (CD14: $0,54 \pm 0,2 \%$).

Se detectó en la muestra de sangre de cordón $0,86 \pm 0,33$ % células CD34+. Para diferenciar subtipos de células progenitoras CD34+ se utilizó doble marcaje con los siguientes anticuerpos monoclonales: CD34 PE / CD33-FITC y CD34 PE / HLA-Dr-FITC, obteniéndose los siguientes resultados:

CD34+ / CD33- :	$0,8 \pm 0,5$ %
CD34+ / CD33+ :	$0,3 \pm 0,1$ %
CD34+ / HLA Dr + :	$0,4 \pm 0,4$ %
CD34+ / HLA Dr - :	$0,3 \pm 0,3$ %

Estudio de pacientes sometidos a aféresis de células madres y progenitoras

A cada paciente que iba a ser sometido a movilización y recolección de células progenitoras en el banco de Sangre de la Clínica El Ávila se le practicó una hematología pre-movilización. Puede apreciarse que la mayoría de los pacientes presentaba pancitopenia pre-movilización porque habían sido tratados con quimioterapia y radioterapia, de acuerdo a la enfermedad maligna de base para obtener remisión completa antes de ser seleccionados para movilización. Una vez que el paciente se encontraba en remisión y sus valores hematológicos estaban en el rango normal se procedió a la administración de los agentes movilizantes: ciclofosfamida asociada con GM-CSF o G-CSF.

A cada paciente se le practicó hematologías diarias posmovilización. La mayoría de los pacientes presentaba pancitopenia posquimioterapia de movilización. En general todos los pacientes presentaban anemia (Hb $11,1 \pm 0,9$ g /dL y Hto: $34,8 \pm 2,7$ %), el recuento de leucocitos en sangre fue variable desde leucopenias de 1 300 / mL hasta valores de 8 800 / mL. El recuento diferencial de los leucocitos mostró una monocitosis ($24,7 \pm 13,6$ %) con una discreta eosinofilia ($7,5 \pm 4,7$ %). En estos pacientes las hematologías fueron tomadas en diferentes días posmovilización.

Las aféresis de sangre periférica en el Banco de Sangre de la Clínica El Ávila para la recolección de células madres y progenitoras se realizó cuando la cantidad de células CD34+ (detectadas por citometría de flujo) comenzó aumentar diariamente. En el caso de hipoplasias megacariocíticas posquimioterapia o radioterapia y cuando el paciente presentaba un conteo de plaquetas menor que 50 000 / mL entonces se le administraba 8 unidades de concentrado plaquetario obtenido por aféresis de un donante voluntario antes

de comenzar el procedimiento de recolección de células madres y progenitoras.

Se realizó el estudio inmunofenotípico por citometría de flujo con anticuerpos que reconocen las diferentes células sanguíneas en muestras de pacientes posmovilización con ciclofosfamida y factores de crecimiento; la determinación de células CD34+ mostró valores promedios de $2,70 \pm 3,1$ y hubo marcaje para leucocitos, linfocitos B y T, subpoblaciones de T: cooperadores y citolíticos, monocitos y mielocitos.

Se realizaron 10 estudios inmunofenotípicos completos posmovilización a la sangre periférica de los pacientes observándose un aumento de las células marcadas con anti-CD14, que identifica las células de estirpe monocítico.

Se realizó hematología a cada uno de los productos de cada recolección, apreciándose un aumento de los leucocitos hasta 787 000 / mL y de las plaquetas hasta 5 000 000 / mL, mientras que la concentración de hemoglobina y hematocrito de dicho producto disminuyó. Las concentraciones más altas de plaquetas obtenidas en los productos de aféresis de células madres y progenitoras fueron de una paciente con el diagnóstico de leucemia mieloide crónica en fase crónica.

La citometría de flujo de los productos de aféresis de diferentes pacientes mostró un aumento de las células CD34 + desde 0,58 % a 1,48 %. En todos los casos se realizó recuento de la viabilidad celular con azul tripano del producto de aféresis antes de realizar el estudio de citometría de flujo, la cual estuvo usualmente entre 78 % y 97 %; esto dependió de si la muestra se analizó de inmediato o a las 24 horas de la recolección, en los casos en los cuales la recolección de células progenitoras se realizó en la tarde.

El análisis inmunofenotípico de los productos de aféresis demostró un aumento del porcentaje de células CD34+ en comparación con el valor de sangre periférica en la mayoría de los casos. Las células recolectadas mostraron marcaje para antígenos de superficie de leucocitos con los anticuerpos anti-HLA-Dry y anti-CD45, para antígenos de superficie mieloides con los anticuerpos anti-CD33, para antígenos de superficie de monocitos con los anticuerpos anti-CD13 y anti-CD14, para antígenos de superficie con los anticuerpos anti- CD19, anti-CD20, anti- CD10 que reconocen linfocitos B y también hubo marcaje para antígenos de superficie con los anticuerpos anti-CD2, anti-CD7 que reconocen linfocitos T totales, con los anticuerpos anti-CD4 que reconocen linfocitos T cooperadores y con anticuerpos anti CD8 que

reconocen linfocitos T citolíticos.

Los frotis de los productos de aféresis coloreados con la tinción de Wright mostraron la presencia de eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Las células en su mayoría aparecen con núcleo grande de color azul oscuro, que ocupa la mayor parte del citoplasma, con múltiples nucléolos y citoplasma basofílico escaso, con características de blastos y otras células de apariencia inmadura pero con granulaciones en el citoplasma probablemente de estirpe mieloide.

Se hizo recuento de las células recolectadas en 33 productos de aféresis posmovilización de pacientes con diferentes patologías malignas, el cual en promedio fue de $2,32 \pm 1,62 \times 10^5$ / mL. El total de células CD34+ / kg de peso corporal recolectadas en los 33 productos de aféresis fue de $2,25 \pm 2,57 \times 10^6$.

Se comparó el porcentaje de células CD34+ en sangre periférica de 3 pacientes posmovilización con ciclofosfamida y G-CSF con el valor pre-recolección de cada uno de los productos. El promedio de células CD34+ en sangre periférica fue relativamente constante; sin embargo, disminuyó desde un promedio de 1,40 % a 0,40 % en sangre de los pacientes entre el tercero al cuarto producto. La cantidad de células CD34+ de los productos de aféresis se mantuvo constante desde la primera recolección a la cuarta recolección.

El número de células CD34+ reinfundidas a 6 pacientes oscilaron desde $3,6$ a $14,7 \times 10^6$ / kg de peso corporal. Puede observarse un amplio rango de células CD34+, que dependió del paciente. Solamente 6 pacientes pudieron recibir dichas células, ya que dos pacientes se negaron a que le hicieran el trasplante autólogo y dos pacientes fallecieron antes de recibir el trasplante.

Se realizó el estudio inmunofenotípico a un paciente con linfoma no Hodgkin 4 meses después de un trasplante autólogo de células progenitoras. El análisis inmunofenotípico dio un recuento de linfocitos totales marcados con anti-CD2 y CD7 normales pero una disminución marcada de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+.

El estudio inmunofenotípico de sangre de un paciente con leucemia linfocítica aguda mostró aumento de las células CD34+ y las células CD10+ y CD19+, lo cual nos indica que es una leucemia linfocítica pre-B mientras que el estudio inmunofenotípico de un paciente con leucemia mieloide aguda en remisión parcial mostró 6 % de células CD34+ y 84 % de células CD33+, característica de células mieloides.

REPORTES DE TRASPLANTES DE CÉLULAS MADRES EN DIFERENTES PATOLOGÍAS

1. Trasplante de células madres de cordón

En 2009, a los diez años del primer trasplante de células madre, E. Gluckman reportó que las ventajas del trasplante de células madres de cordón comparado con el de células madres de la médula ósea compatible no relacionado son:

1. Fácil obtención y disponibilidad inmediata
2. Disminución de GVHD y del riesgo de transmisión de virosis
3. Recuperación inmunológica a largo plazo
4. Sobrevida similar a largo plazo

El factor más importante para que el trasplante se injerte es el número de células madres transfundidas, siendo aceptable algún grado de incompatibilidad HLA.

Las limitaciones potenciales del trasplante de células de cordón reportadas son:

1. Insuficiente cantidad de células madres de cordón para tratar niños y adultos
2. Tiempo de injertarse
3. Potencial para transferir células madres hematopoyéticas de cordón genéticamente anormales.

Debido a que la eficiencia de las células madres de cordón para trasplante es a veces limitada por el bajo número de células recolectadas, se están realizando estudios de expansión *ex vivo* de tales células, lo cual será potencialmente valioso ya que de esta manera se aumentará la posibilidad de injerto y disminuirá el riesgo de morbilidad. La dosis requerida de células madres establecida para que un injerto pueda “pegar” es de $2-3 \times 10^7$ x kg (53-55,57).

Es importante señalar que las organizaciones que establecen estándares y acreditación de los Bancos de Cordón son los siguientes: Netcord, FACT (*Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy*), JACIE, ASBMT (*American Society for Bone Marrow Transplantation*), EBMT (*European Bone Marrow Transplantation*) e ISCT (*International Society for Cellular Therapy*).

Las reservas de sangre de cordón umbilical almacenadas por las organizaciones enumerados

CÉLULAS MADRES HEMATOPOYÉTICAS FETALES

anteriormente fueron para el 2011 (58-60) las siguientes:

	Netcord	Registro mundial de donantes	Bancos de sangre de cordón privados
Unidades de cel. madres de cordón almacenadas	226 729	454 145	> 1 000 000?
Trasplantes realizados (menos del 5 %)	10 065	-	99 en EE.UU

Las unidades usadas en trasplante de sangre de cordón fueron 4 278 en niños y 4 666 en adultos.

2. Trasplante de células madres hematopoyéticas en Beta Talasemia Mayor

Las beta talasemias constituyen un grupo de enfermedades hereditarias caracterizadas por disminución o ausencia de la síntesis de la cadenas beta de la hemoglobina que resultan en fenotipos variables que oscilan clínicamente desde anemia severa hasta cuadros asintomáticos. Tres formas principales de talasemia han sido descritas: talasemia mayor, talasemia intermedia y talasemia menor. Los individuos con talasemia mayor presentan anemia severa hipocrómica microcítica con presencia de dianocitosis, la cual aparece en los primeros dos años de vida, asociada con retardo de crecimiento y anomalías esqueléticas. Los niños afectados requieren transfusiones de sangre regularmente a lo largo de su vida lo cual conduce al establecimiento de una sobrecarga de hierro (61). En Venezuela en una muestra de 2 338 pacientes con anemia hemolítica congénita estudiados por Müller y col. en el Instituto de Oncología y Hematología del MPPS-UCV se encontraron 432 pacientes con diferentes tipos de talasemia, constituyendo la mayoría de ellos taras talasémicas que no requieren trasplantes de células madres.

Los primeros trasplantes realizados en pacientes con talasemia mayor se realizaron en 1981 en Seattle, WA, EE.UU (62,63) y en Pesaro, Italia (64). Casi 30 años han transcurrido desde el primer trasplante exitoso de células madres en talasemia y el primer paciente es actualmente un adulto joven con una vida completamente normal; desde esa época se han realizado mas de 3 000 trasplantes a nivel mundial (64). La sobrevida libre de talasemia en trasplantes

de células madres realizado en 900 pacientes HLA idénticos de 1 a 35 años de edad fue de 73 % entre los años 1981 y 2011 (64). En relación al trasplante alogénico de células madres hematopoyéticas en talasemia, Angelucci (65) reporta una sobrevida global postrasplante de 67 %-90 % y una sobrevida libre de talasemia de más del 80 %. En esta casuística el trasplante con médula ósea de hermanos fue el estándar; con sangre de cordón umbilical de hermanos la reacción injerto contra huésped está disminuida, mientras que el trasplante de células madres de donantes compatibles no relacionados da buen resultado pero tiene la limitante de la dificultad para conseguir el donante y que el trasplante de donantes relacionados no compatibles es prometedor pero subóptimo (65).

3. Trasplante de células madres en drepanocitosis

La drepanocitosis se produce por una sustitución del aminoácido valina por ácido glutámico en la cadena beta de la hemoglobina, lo cual conduce a disminución de la sobrevida del eritrocito. Si el individuo es homocigoto se producen crisis de anemia hemolítica intensa con valores de hemoglobina que oscilan entre 6 y 7 g /dL con reticulocitosis entre 6 % y 11,5 %, presencia de células falciformes y aumento de la bilirrubina indirecta; los pacientes requieren hospitalización y transfusión de concentrado globular. Si el individuo es heterocigoto el resultado es un paciente con tara drepanocítica, por lo general asintomático. Son los drepanocíticos homocigotos los que pueden requerir trasplantes de células madres hematopoyéticas (66).

En Venezuela en un estudio de 1 511 pacientes con drepanocitosis estudiados por Müller y col. en el Instituto de Oncología y Hematología del MPPS-UCV se encontró que la mayoría de ellos eran heterocigotos

y en consecuencia no ameritan trasplantes de células madres (67).

Diferentes centros de trasplantes han mostrado buenos resultados en niños drepanocíticos homocigotos usando tratamientos mieloablativos pretrasplante de células madres hematopoyéticas con una sobrevivida global de 93 % a 97 % y sobrevivida libre de eventos 82 % a 86 %. Con el mejor conocimiento del curso evolutivo de la drepanocitosis ha habido un aumento del interés en hacer que los trasplantes de células madres hematopoyéticas sea una intervención viable en pacientes adultos pero ha quedado demostrado que los adultos con drepanocitosis intensa no son candidatos por el alto riesgo asociado al tratamiento mieloablativo. Reciente, regímenes de acondicionamiento menos intensos han sido usados en adultos con buen resultado pero en pocos pacientes. La principal limitante de los trasplantes de células madres hematopoyéticas en adultos y niños con drepanocitosis ha sido la carencia de donantes compatibles relacionados (68). El trasplante de células madres ha sido también utilizado en niños drepanocíticos con necrosis aséptica de la cabeza del fémur (69).

Con respecto a los trasplantes de células madres en pacientes con patología cardiológica el concepto de regeneración de las células miocárdicas es aceptado actualmente pero el mecanismo exacto y la extensión de la regeneración es ampliamente debatido. Se han postulado varias poblaciones de células como candidatas para la regeneración cardíaca pero algunos estudios cuestionan si esas poblaciones celulares cardíacas o extra cardíacas pueden diferenciarse en cardiomiocitos. A pesar de estos desafíos el campo ha venido desarrollándose de ensayos en animales de experimentación a ensayos clínicos en humanos usando diferentes tipos de células para el tratamiento de enfermedades cardíacas (70). Un metaanálisis complejo de protocolos clínicos de 1 000 pacientes con infarto del miocardio y también con insuficiencia circulatoria tratados con células madres no demostró resultados satisfactorios (71).

4. Trasplante de células madres en enfermedades neurológicas

La enfermedad de Parkinson, la de Huntington, la de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis múltiple, los accidentes cerebrovasculares y algunos trastornos de la médula espinal son causadas por pérdida de neuronas o células gliales (72). La terapia de reemplazo celular y la transferencia

de genes constituye la base para el desarrollo de nuevas estrategias potencialmente poderosas para el tratamiento de diversas enfermedades neurológicas. En últimos años neuronas y células gliales han sido exitosamente generadas de células madres embrionales o mesenquimales, que se han tratado de trasplantar experimentalmente. El mecanismo por el cual el trasplante de células madres conduce a un aumento de la recuperación funcional y reorganización estructural del tejido nervioso debe ser mejor entendido (72,73).

5. Trasplante de células madres en enfermedades de almacenamiento lisosomal

Existen más de 70 enfermedades de almacenamiento lisosomal tales como la esfingolipidosis (enfermedad de Gaucher y enfermedad de Niemann-Pick), la gangliosidosis, las leucodistrofias, las mucopolisacaridosis (síndrome de Hunters y Enfermedad de Hurler), la mucopolisacaridosis y el almacenamiento de glicógeno Tipo II (enfermedad de Pompe). Se han realizado trasplantes de células madres alogénicas en estas patologías, pero es aplicable solo a un selecto grupo de pacientes (74). El progreso en la investigación de células madres básica y preclínica soportarán la esperanza del desarrollo de terapias de células madres para enfermedades neurológicas y de almacenamiento.

USOS CLÍNICOS DE LAS CÉLULAS MADRES

- Leucemia mieloide aguda
- Leucemia mieloide crónica
- Síndromes mielodisplásicos
- Leucemias linfoides agudas y crónicas
- Linfomas
- Anemia aplásica
- Anemia de Fanconi
- Drepanocitosis
- Talasemia
- Anemia de Blackfan-Diamond
- Inmunodeficiencia combinada grave ligada al cromosoma X

REFERENCIAS

1. Orlic D, Bodine DM. GAT defines a pluripotential hematopoietic stem cell (PHSC): Will the real PHSC please stand up! *Blood* 1994; 84: 3991.
2. Yoder Mervin C. Embryonic Hematopoiesis. En: Christensen RD, editor. Hematologic problems of the neonate. W.B. Saunders Co; 2000.p.3-19.
3. Kelemen E, Calvo W, Fleidner TM. Atlas of Human Hemopoietic Development. Nueva York: Springer-Verlag, 1979.
4. Calhoun D, Li Y, Braylan R, et al. Assessment of the contribution of the spleen to granulocytopoiesis and erythropoiesis of the mid-gestation human fetus. *Early Hum Dev.* 1996;46:217.
5. Jacobson L, Simmons E, et al. Further studies on recovery from radiation injury. *J Lab Clin Med.* 1951;37:683.
6. Till J, McCulloch E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 1961;14:213.
7. Becker A, McCulloch E, Till J. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature.* 1963;197:452.
8. Pluznik D, Sachs L. The cloning of normal mast cells in tissue culture. *J Cell Comp Physiol.* 1966;44:287.
9. Bradley T, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 1966;44:287.
10. Axelrad A, McLeod D, Shreeve M, et al. Properties of cells that produce erythrocyte colonies in vitro. Washington, D.C.: National Institutes of Health, 1974.
11. Spangrude G. Biological and clinical aspects of hematopoietic stem cell. *Ann Rev Med.* 1994;45:93.
12. Müller A. Células progenitoras hematopoyéticas. Definiciones, aspectos históricos y fundamentos del tratamiento con *stem cells* periféricos. En: Tópicos en Medicina Transfusional. Serie VI de la Sociedad Venezolana de Hematología, 1996.
13. Dexter T, Allen T, Lajtha L. Conditions controlling the proliferation of haematopoietic stem cell in vitro. *J Cell Physiol.* 1976;91:335.
14. Bilko NM, Votyakova IA, Vasylovska SV, Bilko DI. Characterization of the interactions between stromal and haematopoietic progenitor cells in expansion cell culture models. *Cell Biol Int.* 2005;29(1):83-86.
15. Verfaillie C, Miller J. A novel single cell proliferation assay shows that long term culture initiating cell (LTC-IC) maintenance over time results from the extensive proliferation of a small fraction of LTC-IC. *Blood.* 1995;86:2137-2145.
16. Leemhuis T, Yoder MC, Grigsby S, et al. Isolation of primitive human bone marrow hematopoietic progenitor cells using Hoechst 33 342 and rhodamine 123. *Exp Hematol.* 1996;24:1215.
17. Barclay A, Birkeland M, Brown M, et al. The leucocyte Antigen. Facts Book. Londres: Academic Press; 1993.
18. Civin C I, Strauss I C, Brovall C, et al. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against K-G 1^a cells. *J Immunol.* 1984;133:157.
19. Terstappen LW, Huang S, Picker LJ. Flow cytometric assessment of human T-cell differentiation in thymus and bone marrow. *Blood.* 1992;79:666-677.
20. Bender JG, Unverzagt KL, Walker DE, Lee W, Van Epps DE, Smith DH, et al. Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. *Blood.* 1991;77:2591-2596.
21. Krause D, Facker M, Civin CI, May WS. CD34: Structure, biology, and clinical utility. *Blood.* 1996;87:1089-1096.
22. Dauber K, Becker D, Odendahl M, Seifried E, Bonig H, Tonn T. Enumeration of viable CD34(+) cells by flow cytometry in blood, bone marrow and cord blood results of a study of the novel BDTM stem cell enumeration kit. *Cytotherapy.* 2011;13:449-458.
23. Taviani M, Coulombel L, Luton D, San Clemente H, Dieterlen-Lievre F. Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood.* 1996;87:67-72.
24. Huyhn A, Dommergues M, Izac B, Croisille L, Katz A, Vainchenker W, et al. Characterization of hematopoietic progenitor from human yolk sacs and embryos. *Blood.* 1995;86:4474-4485.
25. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. Normal erythroid development. *Blood.* 1987;69:255-263.
26. Bender JG, Unverzagt K. Flow cytometric analysis of peripheral blood stem cells. *J Hematother.* 1993;2:421-430.
27. Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID. Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. *J Exp*

- Med. 1989;169:1721-1731.
28. Gorin NC, Lopez M, Laporte JP, Quittet P, Lesage S, Lemoine F, et al. Preparation and successful engraftment of purified CD34+ bone marrow progenitor cells in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 1995;85:1647-1654.
 29. Carvalho JM, Souza MK, Buccheri V, Rubens CV, Kerbauy J, Oliveira JS. CD34-positive cells and their subpopulations characterized by flow cytometry analyses on the bone marrow of healthy allogeneic donors. *Sao Paulo Med J*. 2009;127:12-18.
 30. Larosa F, Deconinck E, Helias P, Fontan J, Heczko M, Brion A, et al. Successful mobilization and engraftment of PBSCs derived from donor cord blood cells after a previous allogeneic RIC single unrelated cord blood transplantation. *Blood*. 2011;118:476-478.
 31. Tirelli V, Ghinassi B, Migliaccio AR, Whitsett C, Masiello F, Sanchez M, et al. Phenotypic definition of the progenitor cells with erythroid differentiation potential present in human adult blood. *Stem Cells*. 2011;602483. Epub 2011 Sep 26.
 32. Dong HY, Wilkes S, Yang H. CD71 is selectively and ubiquitously expressed at high levels in erythroid precursors of all maturation stages: A comparative immunochemical study with glycophorin A and hemoglobin A. *Am J Surg Pathol*. 2011;35(5):723-732.
 33. Libundgut K, von Rohr A, Brulhart K, Hirt A, Ischi E, Jeanneret C, et al. The number of circulating CD34+ blood cells predict colony forming capacity of leukapheresis products in children. *Bone Marrow Transplant*. 1995;15:25-31.
 34. Shpall EJ, Jones RB, Bearman SI, Purdy MH, Franklin WA, Heimfeld S, Berenson RJ. Transplantation of CD34+ hematopoietic progenitor cell. *J Hematother*. 1994;3:145-147.
 35. Lane T. Mobilization of hematopoietic progenitor cells. En: Brecher ME, Lasky LC, Sacher RA, Issit A, editores. *Hematopoietic Progenitor Cells Processing, Standards and Practice*. Bethesda, MD. American Association of Blood Banks, 1995.p.59-108.
 36. Richman CM, Weiner RS, Yankee RA. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood*. 1976;47:1031-1039.
 37. Pettengell R, Testa NG, Swindell R, Crowther D, Dexter TM. Transplantation potential of haematopoietic cells released into the circulation during routine chemotherapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1993;82:2239-2248.
 38. Socinski MA, Canistra Sa, Elias A, Antman KH, Schinipper L, Griffin JD. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haematopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet*. 1988;1:1194-1198.
 39. Gianni AM, Siena S, Bregni M, Tarella C, Sciorelli GA, Bonadonna G. Very rapid and complete haematopoietic reconstitution following myeloablative treatments: The role of circulating stem cells harvested after high dose cyclophosphamide and GM-CSF. En: Kicke KA, Spitzer G, Jangannath S, Evinger-Hodges MJ, editores. *Autologous bone marrow transplantation*. 4ª edición. Austin. University Texas Press; 1989.p.723-731.
 40. Lieschke GJ, Burgess AW. Granulocyte colony stimulating factor and granulocyte macrophage colony stimulating factor. *N Engl J Med*. 1992;327:28-35.
 41. Devine SM, Vij R, Rettig M, Todt L, McGlauchlen K, Fisher N, et al. Rapid mobilization of functional donor hematopoietic cells without G-CSF using AMD3100, an antagonist of the CXCR4/SDF-1 interaction. *Blood*. 2008;112(4):990-998.
 42. Bijou F, Ivanovic Z, Boiron JM, Nicolini F. Hematopoietic stem cells mobilization: State of the art in 2011 and perspectives. *Transfus Clin Biol*. 2011;18:503-515.
 43. Pettengell R, Luft T, de Wynter E, Coutinho L, Young R, Fitzsimmons S, et al. Effects of interleukine-6 on mobilization of primitive haemopoietic cells into the circulation. *Br J Haematol*. 1995;89:237-242.
 44. Lioure B, Béné MC, Pigneux A, Huynh A, Chevallier P, Fegueux N, et al. Early matched sibling hematopoietic-cell transplantation for adult AML in first remission using an age-adapted strategy: Long-term results of a prospective GOELAMS study. *Blood*. 2012;119:2943-2948.
 45. Kang Y, Chao NJ, Aversa F. Unmanipulated or CD34 selected haplotype mismatched transplants. *Curr Opin Hematol*. 2008;15:561-567.
 46. Ruiz-Argüelles GJ, Gómez-Rangel D, Ruiz-Delgado GJ, Ruiz-Argüelles A, Pérez-Romano B, Rivadeneyra L. Results of an autologous noncryopreserved, unmanipulated peripheral blood hematopoietic stem cell transplant program: A single-institution, 10-year experience. *Acta Haematol*. 2003;110:179-183.
 47. Pierelli L, Perseghin P, Marchetti M, Accorsi P, Fanin R, Messina C, et al. Best practice for peripheral blood progenitor cell mobilization and collection in adults and children: Results of a Società Italiana Di Emaferesi e Manipolazione Cellulare (SIDEM) and Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO) consensus process. *Transfusion*. 2012;52:893-905.
 48. Gabutti V, Foa R, Anglietta M. Behavior of human haematopoietic stem cells in cord blood. *Haematologica*. 1975;4:60-65.
 49. Chandra T, Afreen S, Kumar A, Singh U Gupta

- A. Does umbilical cord blood-derived CD34+ cell concentration depend on the weight and sex of a full-term infant? *J Pediatr Hematol Oncol.* 2012;34(3):184-187.
50. Tavassoli M. Embryonic and fetal hemopoiesis: An overview. *Blood Cells.* 1991;17:269-281.
51. Neokleous N, Sideri A, Peste-Tsilimidou. Double cord blood transplantation co-operation or competition? *Hematol Rep.* 2011;13:3-4.
52. Fernandes JF, Rocha V, Labopin M, Neven B, Moshous D, Gennery AR, et al. Transplanting patients with severe combined immune deficiencies (SCID): Mismatched related stem cells or unrelated cord blood? *Blood.* 2012;119(12):2949-2955.
53. Gluckman E. Milestones in umbilical cord blood transplantation. *Blood Rev.* 2011;25:255-259.
54. Gluckman E, Ruggeri A, Volt F, Cunha R, Boudjedir K, Rocha V. Milestones in umbilical cord blood transplantation. *Br J Haematol.* 2011;154:441-447.
55. Wagner JE, Gluckman E. Umbilical cord blood transplantation: The first 20 years. *Semin Hematol.* 2010;47:3-12.
56. Bron D, De Bruyn C, Balasse H, Ley P, De Hemptinne D, von Lennep E, et al. Cord blood: From bench to bedside. *Bull Cancer.* 2008;95(3):314-319.
57. Ko KH, Nordon R, O'Brien TA, Symonds G, Dolnikov A. Ex vivo expansion of haematopoietic stem cells to improve engraftment in stem cell transplantation. *Methods Mol Biol.* 2011;761:249-260.
58. Arrojo IP, Lamas M del C, Verdugo LP, Alfaro PR, Pena RR, Gordo FS, et al. Trends in cord blood banking. *Blood Transfusion.* 2012;10(1):95-100.
59. Kögler G, Somville T, Göbel U, Hakenberg P, Knipper A, Fischer J, et al. Haematopoietic transplant potential of unrelated and related cord blood: The first six years of EUROCORD/NETCORD Bank Germany. *Klin Pädiatr.* 1999;211(4):224-232.
60. Raffoux C. Collaboration between hematopoietic stem cell donor registry and cord blood Banks. *Transplant Proc.* 2010;42:3258-3259.
61. Cunningham MJ, Weiss MJ, Neufeld EJ. Thalassemia. En: Young NS, Gerson SL, High KA, editores. *Clinical Hematology.* Filadelfia: Mosby Elsevier; 2006.p.281-292.
62. Thomas ED. Therapy of thalassemia major -- the case for marrow transplantation. *Prog Clin Biol Res.* 1989;309:187-191.
63. Thomas ED, Lucarelli G. Marrow transplantation for thalassemia major. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1988;23(5B):303-306.
64. Angelucci E, Baronciani D. Allogeneic stem cell transplantation for thalassemia major. *Haematologica.* 2008;93:1780-1784.
65. Angelucci E. Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia. *Hematol Am Soc Educ Program.* 2010:456-462.
66. Hsu L, Rodgers G. P. Sickle Cell Disease. En: Young NS, Gerson SL, High KA, editores. *Clinical Hematology.* Filadelfia: Mosby Elsevier; 2006.p.259-280.
67. González E, Tami I, Martínez J, Müller-Soyano A, Guevara J, Miliani E, et al. Etiología de las anemias estudiadas en un Centro de Referencia durante el período 79-80. *Sangre.* 1982;27:291.
68. Khoury R, Abboud MR. Stem-cell transplantation in children and adults with sickle cell disease: An update. *Expert Rev Hematol.* 2011;4:343-351.
69. Wali Y, Almaskari S. Avascular necrosis of the hip in sickle cell disease in Oman: Is it serious enough to warrant bone marrow transplantation? *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2011;11:127-128.
70. Dinsmore JH, Dib N. Stem cells and cardiac repair: A critical analysis. *J Cardiovasc Transl Res.* 2008;1:41-54.
71. Przybycień K, Kornacewicz Jach Z, Machaliński B. Stem cells in cardiological clinical trials. *Kardiol Pol.* 2011;69:601-609.
72. Kim SU, de Vellis J. Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: A review. *Br J Neurosci Res.* 2009;87:2183-2200.
73. Gogel S, Gubernator M, Minger SL. Progress and prospects: Stem cells and neurological diseases. *Gene Ther.* 2011;18:1-6.