



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA "LUIS RAZETTI"
CATEDRA DE OBSTETRICIA**

IDENTIFICACIÓN DE LAS CELULAS PROGENITORAS EN SANGRE FETAL Y DE ADULTOS

Trabajo de Ascenso
Para Profesor Asociado
Cátedra de Obstetricia
Escuela "Luis Razetti"
Universidad Central de Venezuela

Dra. Aixa Müller de Soyano

RESUMEN

Las células madres y progenitoras de sangre (CPSP) de adultos o de cordón han - adquirido una gran importancia desde finales del milenio como fuente de células para trasplantes autólogos y alogénicos en adultos, niños y en fetos in útero con ciertas deficiencias congénitas. Los objetivos de este estudio fueron identificar las células progenitoras en sangre prenatal in útero y sangre de cordón de recién nacidos a término. mediante estudios hematológicos y de inmunofenotipos (IF). Movilizar con quimioterapia y factores de crecimiento las CPSP de pts con malignidades y recolectarlas mediante aféresis. Identificar las CPSP por estudios de IF. Obtener un N° adecuado de ellas para injertarse en trasplantes autólogos. Estandarizar un procedimiento de congelación de dichas células. Identificar las células CD34+ en leucemias... **Materiales y métodos:** 278 muestras de sangre de fetos 17-32 semanas de gestación, de cordocentesis de neonatos a termino, sangre de adultos pre y postaféresis de CPSP, muestras de productos de aféresis de CPSP de pts con malignidades, de sangre y médula ósea de pts con leucemia. Se realizaron determinaciones de Hb, Hto, electroforesis de Hb a las sangres fetales. Las CPSP fueron movilizadas con ciclofosfamida y G-CSF ó GM-CSF, recolectadas en las máquinas de aféresis Las CPSP y otros tipos de células, fueron identificadas por citometría de flujo mediante un panel de anticuerpos monoclonales (ac mon.): CD34, CD19, CD22, CD24, CD20, CD10, CD7, CD5; CD2, CD4, CD8, CD3. Se utilizó marcaje doble para subclasificar las células progenitoras con CD34 PE/ CD33-FITC y CD34 PE / HLA-Dr- FITC. Los productos de aféresis fueron congelados con Hespan + albúmina+ DMSO a -80 °C y posteriormente se reinfundieron al paciente. **Resultados:** la sangre fetal prenatal mostró un ascenso en los valores de Hb y Hto desde la semana 17 a la 32 de gestación. El VCM mostró macrocitosis severa siendo entre las 17-20 semanas de 130 fl El análisis IF con ac. mon. de las células de sangre fetal prenatal desde la edad de 17 semanas de gestación hasta la semana 32, permitió identificar la expresión de marcadores para leucocitos con los ac. CD45 y HLA-Dr, del marcador CD34 que identifica células madres y progenitoras, el cual tuvo tendencia a disminuir a medida que aumentaba la edad gestacional, de los marcadores para los linfocitos T: CD2, CD7, CD4 y CD5, de los marcadores para linfocitos B: CD10, CD19, CD20, de los marcadores mieloides CD13, CD14 y CD33. Se detectaron en la muestra de sangre de cordón $0,86 \pm 0,33\%$ de células CD34, siendo las células CD34+ / CD33- las mas abundantes. La determinación de células CD34+ en muestras de sangre de pacientes postmovilización mostró valores promedios de $2,70 \pm 3,1\%$ y hubo marcaje para leucocitos, linfocitos B y T, linfocitos T,

monocitos y mielocitos. Se hizo recuento del N° de células recolectadas en 30 productos de aféresis, el cual fue de $2,32 \pm 1,62 \times 10^5$, siendo el volumen promedio de células de $1,25 \pm 0,8 \times 10^{10}$ y el vol. promedio total de células recolectadas por Kg de peso corporal en esos productos de aféresis fue de $1,75 \pm 1,25 \times 10^8$. El total de células CD34+ / Kg de p. del pte recolectadas en los 30 productos de aféresis fue de $2,25 \pm 2,57 \times 10^6$. Se detectaron células madres CD34+ en todos los tipos de leucemias estudiadas tanto en las agudas como en las crónicas; siendo el porcentaje de células CD34+ más alto en leucemias agudas sobre todo en las de estirpe linfoide. En **conclusión**, en este trabajo se identificaron con ac. mon. diferentes tipos de células que incluían madres y progenitoras identificadas con el ac. CD34+ en sangre de fetos de 17-32 semanas, sangre de neonatos a término, sangre pre y postmovilización, productos de aféresis de CPSP. El % cel. CD34+ tuvo tendencia a disminuir desde la semana 17-32, Se detectaron cel. CD34+ en sangre fetal de cordón $0,86 \pm 0,33\%$; en sangre postmovilización $2,70 \pm 3,1\%$. Las células CD34+/ Kg de p. recolectadas en este estudio fueron suficientes para injertarse en los receptores. Los hallazgos de células CD34+ en leucemias agudas-y crónicas nos llevan a concluir que una leucemia puede originarse en cualquier estadio de desarrollo de maduración celular.

INDICE

	Páginas
INTRODUCCIÓN	9
HEMATOPOYESIS EMBRIONARIA Y FETAL	9
HEMATOPOYESIS INTRAUTERINA HUMANA SEGÚN CRITERIOS MORFOLÓGICOS	12
Desarrollo de la hematopoyesis en el hígado fetal	12
Desarrollo de la hematopoyesis en la médula ósea fetal	12
Desarrollo de la hematopoyesis en el bazo fetal	13
IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS MADRES Y PROGENITORAS	13
Formación de colonias eritrocíticas, granulocíticas, megacariocíticas y mixtas	14
Identificación de progenitores hematopoyéticos con cultivos en agar	18
EVALUACIÓN DE CÉLULAS MADRES MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	20
Fuentes de células progenitoras	26
Células CD34+ en sangre y médula ósea	27
Movilización de células madres y progenitoras CD34+	27
Movilización por quimioterapia y factores de crecimiento	28
Mecanismos celulares de movilización de células progenitoras	28
Importancia de las células progenitoras para los trasplantes de sangre periférica	29
OBJETIVOS	31
MATERIALES	32
MÉTODOS	33
Obtención de la sangre fetal prenatal	33
Obtención de la sangre de cordón umbilical	36
Recolección de células progenitoras de sangre por aféresis	36
Procesamiento de las muestras de sangre fetal prenatal	40
Estudio inmunofenotípico de las sangres fetales, de adultos y de los productos de Aféresis	40
Análisis de las muestras por citometria de flujo	40
Reinfusión del producto de aféresis	43

RESULTADOS	45
DISCUSIÓN	84
BIBLIOGRAFIA	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Célula hematopoyética madre CD34+ y células progenitoras en la médula ósea	10
Figura N° 2: Linajes hematopoyéticos	11
Figura N° 3: Esquema de las interacciones entre el desarrollo hematopoyético y algunos factores de crecimiento	17
Figura N° 4: Citoquinas digiriéndose hacia receptores de la célula hematopoyética	18
Figura N° 5: Identificación de progenitores hematopoyéticos con cultivo de Agar	19
Figura N° 6: Célula hematopoyética madre CD34+ y célula progenitora	20
Figura N° 7: Antígeno CD34	23
Figura N° 8: Células progenitoras hematopoyéticas	24
Figura N° 9: Marcaje inmunofenotípico con anticuerpos monoclonales de las células madres hematopoyéticas	25
Figura N° 10: Maduración de Linfocitos B	25
Figura N° 11: Pacientes realizándosele aféresis de células progenitoras con la máquina CD3000 de Baxter	38
Figura N° 12: Procesamiento del producto de Féresis de las progenitoras hematopoyéticas	39
Figura N° 13: Expresión de marcadores de Leucocitos en células de sangre prenatal de 17 a 20 semanas de gestación.	46
Figura N° 14: Expresión de marcadores de Leucocitos en células de sangre prenatal de 21 a 25 semanas de gestación	46
Figura N° 15: Expresión de marcadores de Leucocitos en células de sangre prenatal de 26 a 32 semanas de gestación	47
Figura N° 16: Expresión de marcadores de Leucocitos en células de sangre prenatal de 17 a 32 semanas de gestación	47
Figura N° 17: Expresión de marcadores de Linfocitos T en células de sangre prenatal de 17 a 20 semanas de gestación	48
Figura N° 18: Expresión de marcadores de Linfocitos T en células de sangre prenatal de 21 a 25 semanas de gestación	48
Figura N° 19: Expresión de marcadores de Linfocitos T en células de sangre prenatal de 26 a 32 semanas de gestación	49

Figura N° 20: Expresión de marcadores de Linfocitos B en células de sangre fetal prenatal de 17 a 20 semanas de gestación	50
Figura N° 21: Expresión de marcadores de Linfocitos B en células de sangre fetal prenatal de 21 a 25 semanas de gestación	50
Figura N° 22: Expresión de marcadores de Linfocitos B en células de sangre prenatal de 26 a 32 semanas de gestación	51
Figura N° 23: Expresión de marcadores de Linfocitos B en células de sangre prenatal de 17 a 32 semanas de gestación	51
Figura N° 24: Expresión de marcadores Mieloides en células de sangre fetal prenatal entre 17-20 semanas de gestación	52
Figura N° 25: Expresión de marcadores Mieloides en células de sangre fetal prenatal entre 21-25 semanas de gestación	52
Figura N° 26: Expresión de marcadores Mieloides en células CD34+ de sangre fetal prenatal entre 26-32 semanas de gestación	53
Figura N° 27: Expresión de marcadores Mieloides en células CD34+ de sangre fetal prenatal entre 17-32 semanas de gestación	53
Figura N° 28: Análisis inmunofenotípico por citometría de flujo de células CD34+ en sangre (Post CTX + G-CSF)	59
Figura N° 29: Análisis inmunofenotípico de células CD34+ en sangre (Post CTX + G-CSF)	60
Figura N° 30: Análisis inmunofenotípico de células CD34+ en sangre (Post CTX + G-CSF)	60
Figura N° 31: Análisis inmunofenotípico de células CD34+ en sangre (Post CTX + G-CSF)	61
Figura N° 32: Análisis inmunofenotípico de células CD34+ en sangre (Post CTX + G-CSF)	62
Figura N° 33: Análisis inmunofenotípico de células CD34+ en el producto de Aféresis	65
Figura N° 34: Análisis inmunofenotípico de células CD34+ en el producto de Aféresis	65
Figura N° 35: Análisis inmunofenotípico de células CD34+ en el producto de Aféresis	66
Figura N° 36: Análisis inmunofenotípico de células CD34+ en el producto de Aféresis	66
Figura N° 37: Análisis inmunofenotípico de células CD34+ en el producto de Aféresis	67
Figura N° 38: Expresión de marcadores Mieloides en células de productos de Aféresis	69

Figura N° 39:	Expresión de marcadores de Linfocitos B en células de productos de Aféresis	70
Figura N° 40:	Expresión de marcadores de Linfocitos T en células de productos de Aféresis	70
Figura N° 41:	Células madres hematopoyéticas CD34+ obtenidas por Aféresis	72
Figura N° 42:	Células madres hematopoyéticas CD34+ obtenidas por Aféresis	73
Figura N° 43:	Células madres hematopoyéticas CD34+ obtenidas por Aféresis	73
Figura N° 44:	Estudio inmunofenotípico de Leucemia Linfoide Aguda	82
Figura N° 45:	Estudio inmunofenotípico de Leucemia Mieloide Aguda	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° I:	Fuentes y diana de los factores de crecimiento humano	15
Tabla N° II-a:	Anticuerpos monoclonales utilizados en la inmunotipificación de las células hematopoyéticas	21
Tabla N° II-b:	Anticuerpos monoclonales utilizados en la inmunotipificación de las células hematopoyéticas	22
Tabla N° III:	Materiales. Diagnósticos prenatales	33
Tabla N° IV:	Materiales. Origen de las muestras de sangre prenatal	35
Tabla N° V:	Parámetros de las máquinas de Aferesis Baxter CS-3000 y MCS-Plus Haemonetic	38
Tabla N° VI:	Método: Anticuerpos mononucleares para clasificar las células progenitoras por Citometría de Flujo	40
Tabla N° VII:	Panel de anticuerpos mononucleares para clasificar Leucemias	42
Tabla N° VIII:	Valores hematológicos en sangre fetal prenatal	45
Tabla N° IX:	Valores hematológicos en sangre de cordón	54
Tabla N° X:	Estudio inmunofenotípico de 10 muestras de sangre de cordón	55
Tabla N° XI:	Evaluación por citometría de flujo de subpoblaciones de CD34+ en sangre de cordón de recién nacidos	55
Tabla N° XII:	Hematologías de 8 pacientes con malignidades pre movilización	56
Tabla N° XIII:	Hematologías de pacientes post movilización	57
Tabla N° XIV:	Estudio inmunofenotípico en 10 muestras de sangre de pacientes postmovilización	58
Tabla N° XV:	Porcentaje de células CD34+ en sangre postmovilización con G-CSF (LMA)	62
Tabla N° XVI a la XIX:	Valores hematológicos en los productos de Aféresis	63

Tabla N° XX:	Valores hematológicos de los productos de Aféresis	64
Tabla N° XXI:	Valores hematológicos pre y post recolección de células progenitoras en 6 donantes movilizados con G-CSF	64
Tabla N° XXII:	Porcentaje de células CD34+ en sangre postmovilización y en los productos de Aféresis	68
Tabla N° XXIII:	Análisis inmunofenotípico de los productores de Aféresis	71
Tabla N° XXIV:	N° de células recolectadas en los productos de Aféresis	74
Tabla N° XXV:	Volumen de células recolectadas en los productos de Aféresis	75
Tabla N° XXVI:	Volumen de células recolectadas por Kgs. en los productos de Aféresis	76
Tabla N° XXVII:	Total de células CD34+/Kg recolectadas en los productos de Aféresis	77
Tabla N° XXVIII:	Numero de células mononucleares y CD34+/Kg. en los productos de Aféresis	78
Tabla N° XXIX:	Porcentaje de células CD34+ en sangre de pacientes y en sus productos	78
Tabla N° XXX:	Resultados de las cosechas de células progenitora de acuerdo al tipo de factor estimulante utilizado en 8 pacientes	79
Tabla N° XXXI:	Total de células mononucleares y CD34+ autólogas reinfundidas a cada paciente	79
Tabla N° XXXII:	Estudios inmunofenotípico de sangre de 1 paciente 4 meses post trasplante alogénico	80
Tabla N° XXXIII:	CD34+ en las Leucemias Linfoides Agudas y Crónicas	81
Tabla N° XXXIV:	CD34+ en las Leucemias Mieloides Agudas y Crónicas	83

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 un amplio potencial de proliferación, de autorenovación (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 nombre de *stem cell* o *célula madre* para las células pluripotenciales indiferenciadas, 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 autorenovación 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) (Fig. N^{os} 1 y 2).

FIGURA N° 1
CELULA HEMATOPOYÉTICA MADRE CD34+
Y CÉLULAS PROGENITORAS EN LA MÉDULA ÓSEA

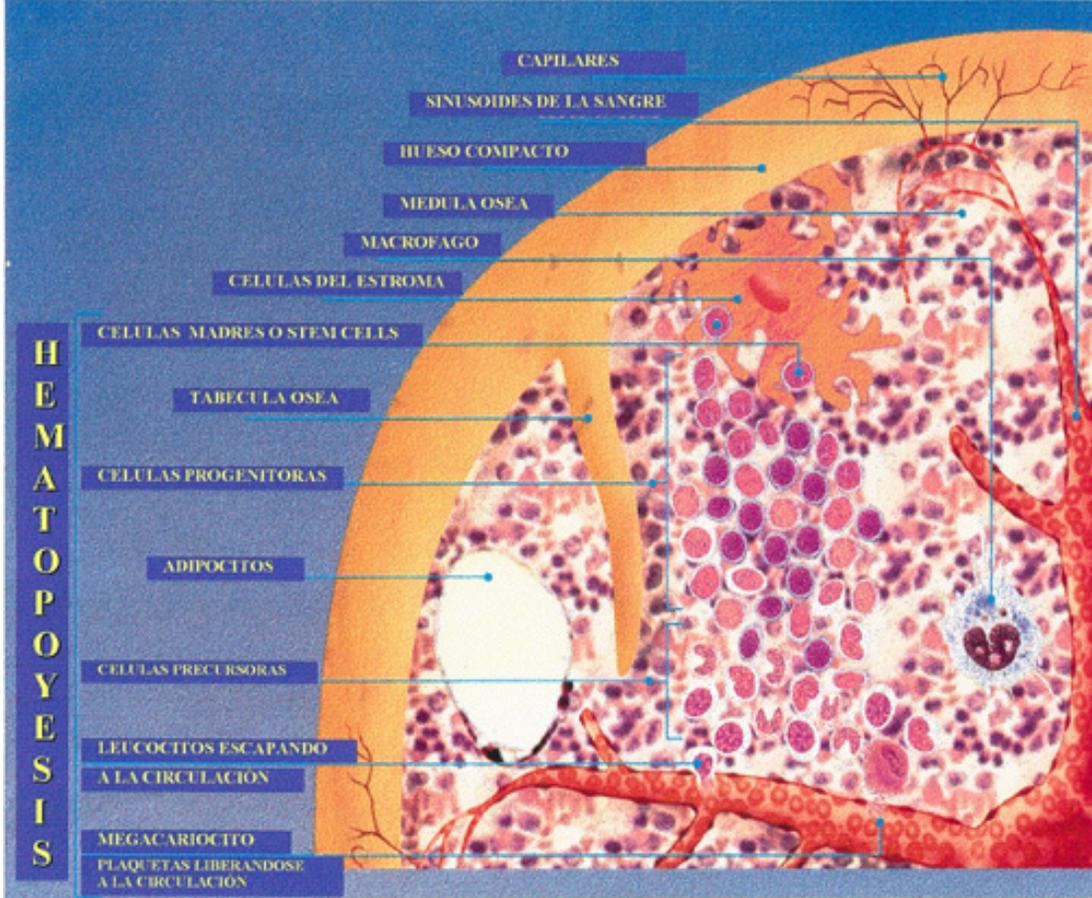
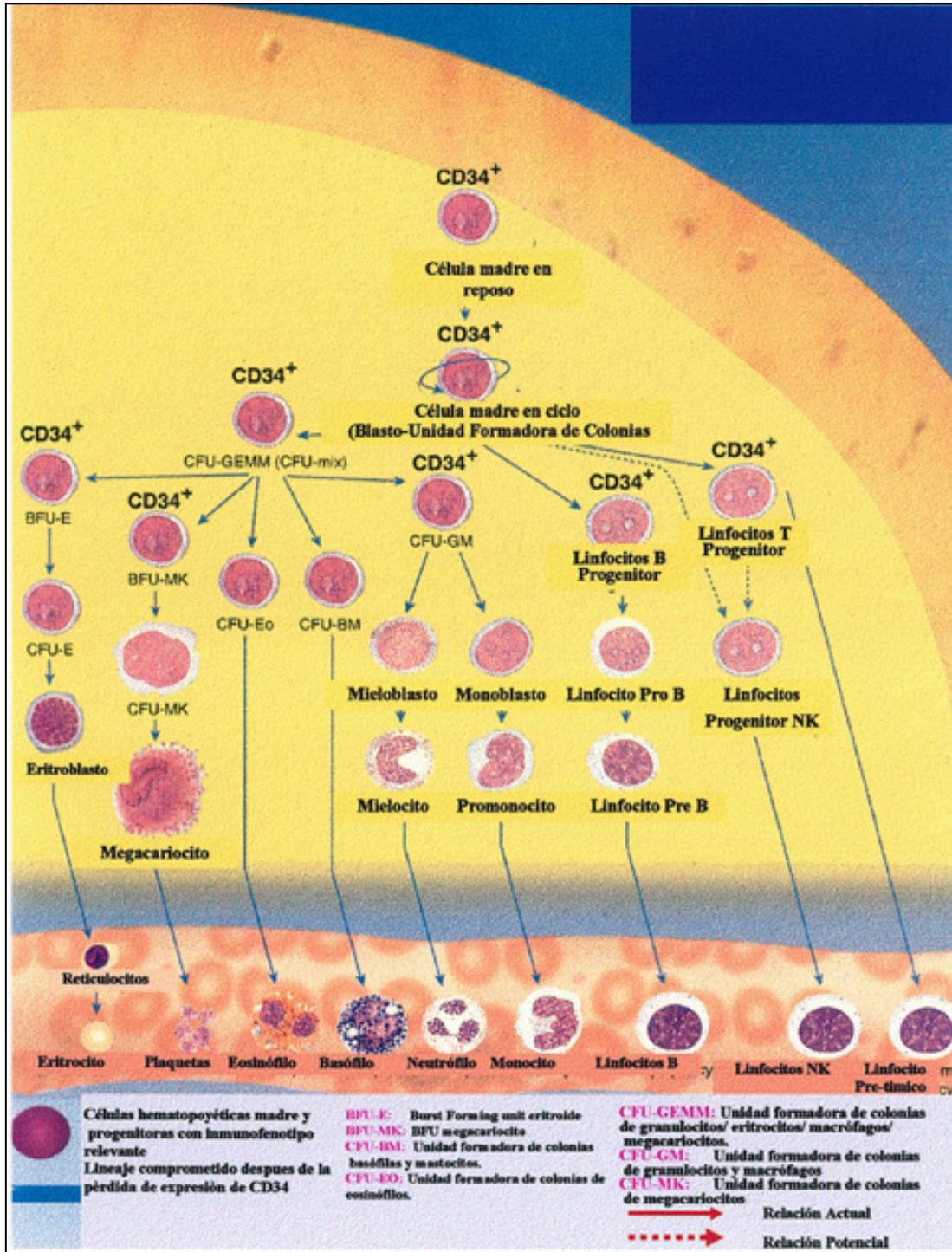


FIGURA N° 2
LINAJE HEMATOPOYÉTICOS



HEMATOPOYESIS INTRAUTERINA HUMANA SEGÚN CRITERIOS MORFOLÓGICOS

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 las semanas 8 a 19 las células hematopoyéticas se localizan en 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 menor cantidad en el hígado (1% de las células sanguíneas) desde la semana 7 a la 13. El timo no posee linfocitos hasta la semana 7. El porcentaje de células madres (hemocitoblasto o *stem cell*) es alto y hasta de 10% de las células sanguíneas en el hígado del embrión en las semanas 5ª a 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 a las 8 semanas de desarrollo. La célula predominante en el periodo de 8-9 semanas fue de el eritroblasto primitivo. La producción del eritroblasto definitivo aumenta grandemente 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 de los huesos largos. Los macrófagos son más numerosos 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 a 20-30% en embriones de mayor edad. Los megacariocitos están

presentes desde la semana 8. Las células inmaduras que probablemente representan las células madres o *stem cells* y las células progenitoras varían de 15 % en la semana 12-13 a 1-4 % en la semana 21-23 (2).

Hematopoyesis en el bazo fetal

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

Calhoun y col. usaron varios 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 sólo 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 (4).

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 o *stem cell* y las células progenitoras circulan en abundancia en la sangre fetal.

IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS MADRES Y PROGENITORAS

La irradiación letal de ratones deprime la hematopoyesis y causa una pancitopenia (todas las líneas celulares disminuyen en número) 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).

Formación de colonias eritrocíticas, granulocíticas, megacariocíticas y mixtas

Till y Mac Culloch proporcionaron evidencia de que un solo precursor hematopoyético (esto es una célula que da origen a más de una línea celular sanguínea) podían ser identificada *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, puede ser visualizado 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 Mac Culloch 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 splenic forming unit* en la terminología inglesa). A pesar de que en el ensayo original no se observaron 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 aún más primitiva que sería un precursor común tanto de la serie linfoide como de la serie mieloide (6,7).

Pluznik y Sachs, y Bradley y Metcalf en 1966 reportaron que las células hematopoyéticas múridas podían ser cultivadas *in vitro* y que la adición de líquidos solubles de origen múrido (orina, o extracto de útero de embarazadas) favorecía la formación de colonias *in vitro*. Este líquido tisular biológicamente activo fue llamado actividad estimulante de colonias (CSA). 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 (8, 9) (Fig. N° 2 y Tabla N° I).

TABLA N° I
FUENTES Y DIANA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO HUMANO

FACTOR DE CRECIMIENTO	FUENTE CELULAR	CELULA DIANA PROGENITORA	CELULA DIANA MADURA
G-CSF	Monocitos, Fibroblastos, Células endoteliales	UFC-Granulocitos	Granulocitos
Interleuquina-3	Linfocitos	UFC-Blastos UFC-Megacariocitos UFC-Basófilos UFB-Eosinófilos	Eosinófilos Monocitos
GM-CSF	Linfocitos T, Monocitos Fibroblastos Células endoteliales	UFC-Blastos, UFC-GEMM, UFC-GM UFC-G UFC-M UFC-Eosinófilos UFC-Megacariocitos UFC Eritroide	Granulocitos Eosinófilos Monocitos
M-CSF	Monocitos Fibroblastos Células endoteliales	UFC-Monocitos	Monocitos
Eritropoyetina	Células peritubulares del riñón Células Kupffer	UKC-Eo UFB-Eo tardía UFC-Megacariocitos	Ninguno

Abreviaciones Tabla N° I

GM-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos
UFC:	Unidad formadora de colonias
UFC-GEMM:	Unidad formadora de colonias germinales
UFB-eos:	Unidad formadora de brotes de eosinófilos
GM-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
UFC-GM:	Unidad formadora de colonias de granulocitos y macrófagos
UFC-G:	Unidad formadora de colonias de granulocitos
UFC-M:	Unidad formadora de colonias de macrófagos
UFC-E:	Unidad formadora de colonias de eosinófilos

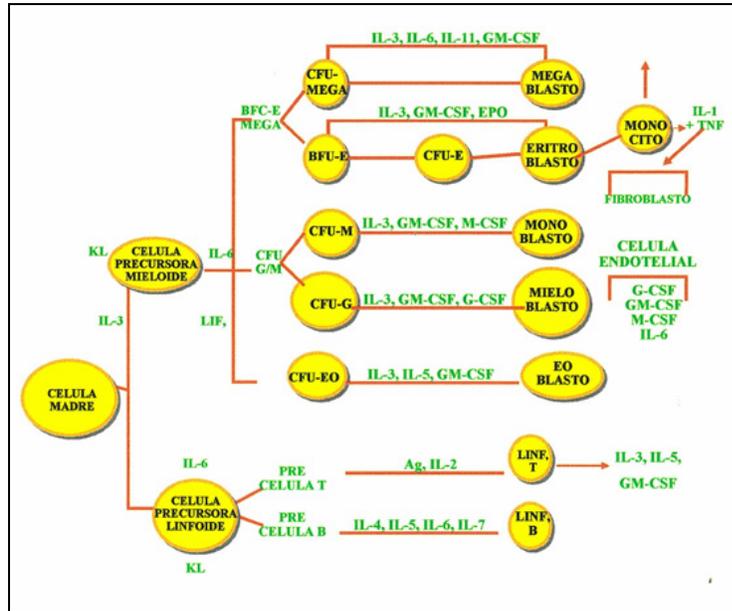
Más tarde usando suero de ratones anémicos como fuente de factor estimulante de colonias de eritrocitos Axelrad y col. demostraron que también podían obtenerse colonias de

eritrocitos *in vitro* y denominaron a la célula precursora más primitiva de eritrocitos, unidad inicial formadora de eritrocitos (*burst-forming unit-erythroid*, en la terminología inglesa) (BFU-E) (10) (Fig. N° 2 - Tabla N° I).

Células progenitoras pluripotentes fueron también identificadas y llamadas unidades formadoras de colonias mixtas. Estos ensayos realizados en ratones fueron rápidamente adaptados en modelos humanos para detectar la presencia de células hematopoyéticas progenitoras (11).

Un nuevo impulso en este campo surge de los estudios de Metcalf y Moore, quienes lograron cultivar diversos tipos de células hematopoyéticas *in vitro*, utilizando para ello un medio semisólido (agar, agarosa, o metilcelulosa) y un medio de cultivo de sustancias inductoras o citoquinas. Muchas de estas citoquinas han sido identificadas como factores estimulantes de colonias; entre ellas se puede mencionar particularmente la eritropoyetina (EPO), un factor estimulante de colonias de eritrocitos, la trombopoyetina, un factor estimulante de colonias de megacariocitos, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), la timopoyetina y la interleuquina 3 (IL-3) (12) (Fig. N° 3 y N° 4).

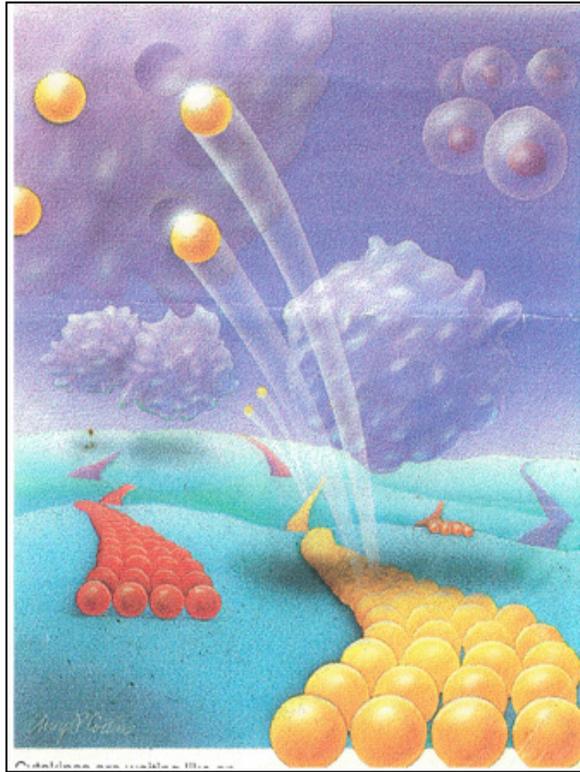
FIGURA 3
ESQUEMA DE LAS INTERACCIONES ENTRE EL DESARROLLO
HEMATOPOYÉTICO Y ALGUNOS FACTORES DE CRECIMIENTO



Abreviaciones de la Figura N° 3

- UFB-E-Mega: unidad formadora de brotes de eosinófilos y megacariocitos
- UFB-E: unidad formadora de brotes de eosinófilos
- UFB-Mega: unidad formadora de brotes de eosinófilos y megacariocitos
- GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
- G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos
- UFC-eo: unidad formadora de colonias de granulocitos y eosinófilos
- UFC-G: unidad formadora de colonias de granulocitos
- UFC-M: unidad formadora de colonias de monocitos
- UFC-E: unidad formadora de colonias de eosinófilos
- UFC-Mega: unidad formadora de colonias de megacariocitos
- IL: interleuquinas

FIGURA N° 4
CITOQUINAS DIRIGIENDOSE HACIA RECEPTORES DE LA CÉLULA
HEMATOPOYÉTICA

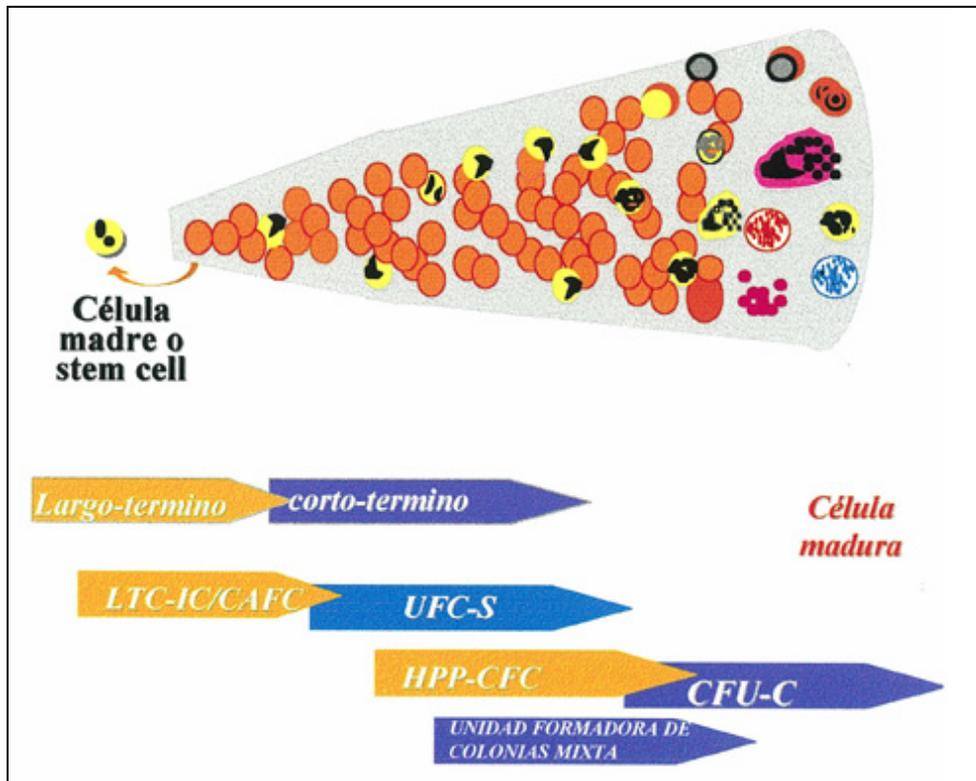


Identificación de progenitores hematopoyéticos en cultivos de agar

Si se siembran células madres (*stem cells*) en cultivos de agar de doble capa con múltiples citoquinas, se puede identificar progenitores hematopoyéticos que son altamente proliferativos, esto es, células formadoras de colonias altamente proliferativas o HPP-CFC (*high proliferative potential-forming cells*) que producen colonias, visibles a simple vista, que contienen más de 50.000 células. La mayoría de las colonias que provienen de unidades formadoras de colonias en cultivos contienen menos de 50.000 células y son microscópicas (Fig. N° 5). Cultivos *in vitro* de células madres hematopoyéticas con una monocapa de médula ósea o células no hematopoyéticas del estroma tisular del hígado fetal (macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y preadiposas) resultan en hematopoyesis sostenida por varios meses (13,14). Las células 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) (Fig. N° 5).

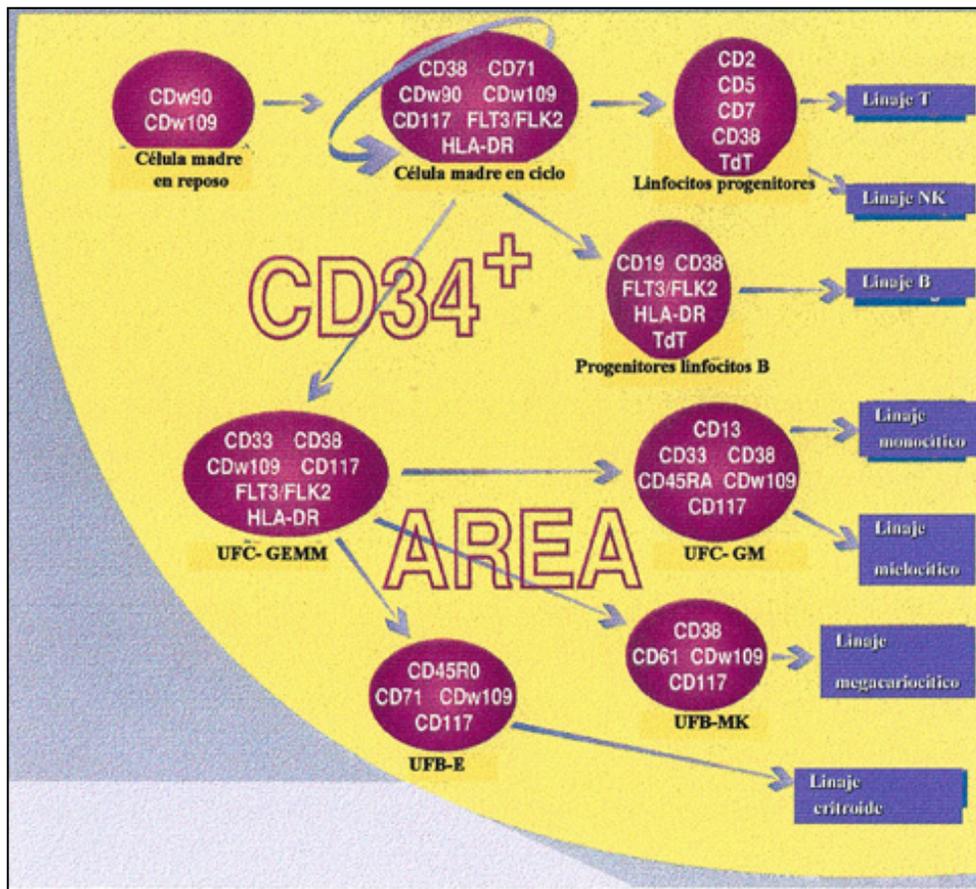
FIGURA N° 5
IDENTIFICACIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS
CON CULTIVO DE AGAR



EVALUACIÓN DE CELULAS MADRES MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Para caracterizar mejor las células madres progenitoras y obtener resultados más rápidos, en horas, en vez de semanas con los cultivos en placa, se han generado anticuerpos monoclonales capaces de reconocer antígenos de superficie de las células hematopoyéticas. Con el uso de los anticuerpos monoclonales y la citometría de flujo se puede identificar el fenotipo de la célula madre, de manera tal que actualmente pueden reconocerse y aislarse células hematopoyéticas madres y progenitoras (Fig. N° 6).

FIGURA N° 6
CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS MADRE CD34+
Y CÉLULAS PROGENITORAS



Desafortunadamente no ha sido descubierto un antígeno único por el cual se reconozca exclusivamente la 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 se ha diseñado una clasificación internacional para uniformizar 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 complejo de diferenciación denominado CD (17, 18) (Tablas II a y II b)

TABLA II a
ANTICUERPOS MONOCLONALES UTILIZADOS EN LA
INMUNOTIPIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS

Cluster de diferenciación	Especificidad dentro del linaje hematopoyético
CD 1a	Timo, célula progenitora
CD 2	Células T y NK, Subpoblaciones
CD 3	Células T
CD 4	Subpoblación, células T, monocitos
CD 5	Células T y subpoblación células B
CD 6	Células T
CD 7	La mayoría células T, células NK, plaquetas
CD 8	Subpoblaciones T y NK
CD 9	Células pre-B, monocitos, plaquetas
CD 10	Células pre B, PMN's
CD 11 A	Leucocitos
CD 11 B	Monocitos, mielocitos, NK, subpoblaciones T
CD 11 C	Monocitos, mielocitos, NK, subpoblaciones T
CD 13	Monocitos, PMN's
CD 14	Monocitos
CD 15	PMN's (subpoblaciones de células T activadas)
CD 16	NK, PMN's, subpoblaciones de T
CD 18	Leucocitos
CD 19	Células B
CD 20	Células B
CD 21	Células B
CD 22	Células B, Células Peludas
CD 23	Células B
CD 24	Células B. PMN's
CD 25	Subpoblaciones de T y B, linfocitos T activados

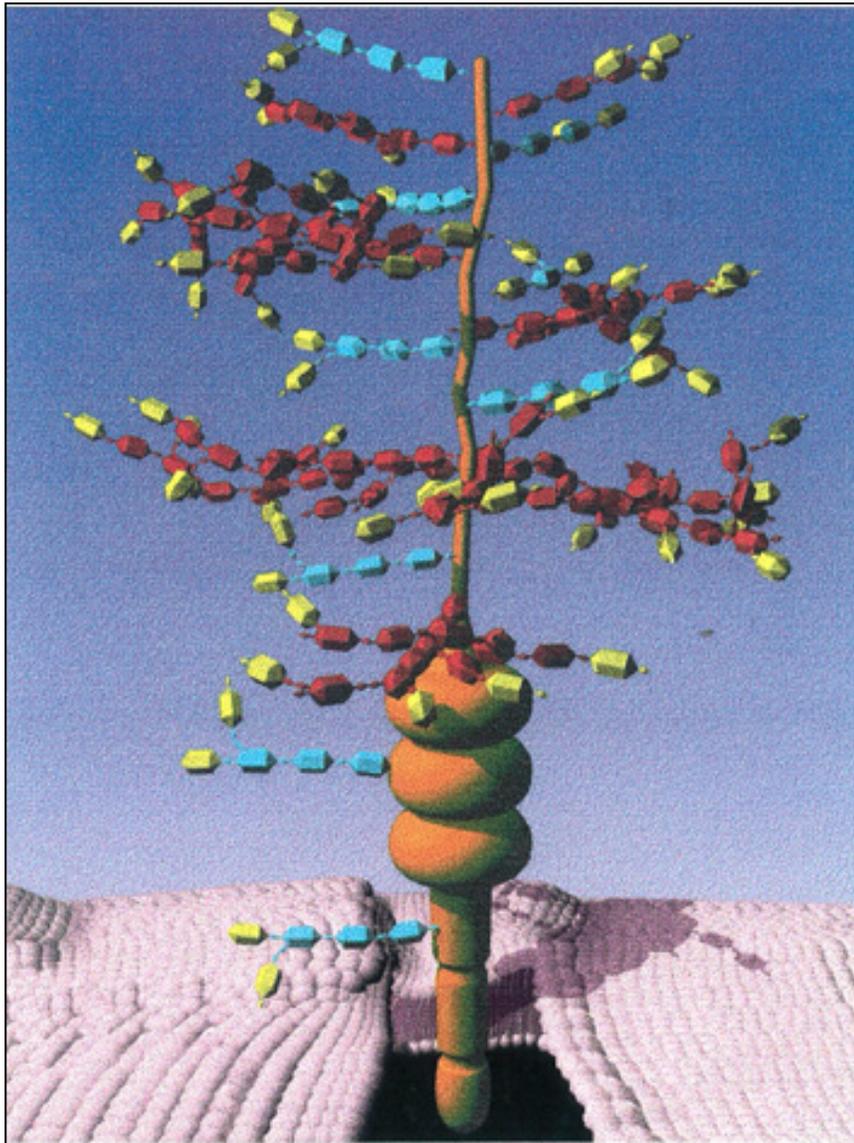
NK: natural killer

TABLA II b
ANTICUERPOS MONOCLONALES UTILIZADOS EN LA
INMUNOTIPIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS

Cluster de diferenciación	Especificidad dentro del linaje hematopoyético
CD 26	Subpoblaciones T
CD 29 A	Leucocitos, plaquetas
CD 30	Células B activadas, células T
CD 32	Monocitos, PMN's, Células B, Plaquetas
CD 33	Monocitos, (PMN's)
CD 34	Células progenitoras
CD 35	Células B, monocitos, PMN's, eritrocitos
CD 37	Células B
CD 38	NK, Subpoblaciones B, T, Células plasmáticas
CD 40	Células B
CD 41 A	Plaquetas
CD 42 A	Plaquetas
CD 43	Células T, PMN's
CD 44	Leucocitos
CD 45	Todos los leucocitos
CD 45 RA	La mayoría Células T, B, células NK
CD 45 R O	Células T activadas memorias
CD 54	Células B & T activadas, macrófagos
CD 56	Células NK, Subpoblaciones T
CD 57	Células NK, Subpoblaciones T
CD 69	Linfocitos activados
CD 71	Células en proliferación
CD w 78	Células B diferenciadas

Uno de los anticuerpos más usados para reconocer las células madres es el dirigido contra la proteína sialomucina (CD34). El CD34 fue identificado por un anticuerpo monoclonal producido contra la línea de eritroleucemia KG-1^a y ha sido usado ampliamente en la selección positiva de células madres y progenitoras hematopoyéticas (19) (Fig. N° 7).

FIGURA N° 7
ANTIGENO CD34



La citometría de flujo multiparamétrica provee una rápida caracterización de preparaciones de células progenitoras y complementa los cultivos de unidades formadoras de colonias. El objetivo del análisis multiparamétrico es identificar y subdividir la población de células CD34+ y proveer un recuento diferencial que pueda ser obtenido en varias horas y no en varias semanas, como es el caso de los cultivos de las células madres y progenitoras. Los antígenos de superficie que subdividen la población de células CD34+ en varias líneas hematopoyéticas aparecen en las Figuras N^{os} 6, 8 y 9. Se han utilizado diversos anticuerpos

monoclonales para detectar los antígenos de las diferentes series hematopoyéticas y definir las subpoblaciones de CD34+ ya comprometidas hacia una línea celular. Se han utilizado anticuerpos anti-CD 19 y anti-CD 10 que reconocen los antígenos presentes en linfocitos pre-B y por lo tanto pueden reconocer las células progenitoras ya comprometidas a diferenciarse a linfocitos pre-B cuando las células se incuban simultáneamente con anticuerpos anti-CD34 y anti-CD 19 o anti-CD20, ya que de esta forma se identifica coexpresión del antígeno CD34 y el CD19 o CD20 (Fig. N° 10).

FIGURA N° 8
CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS

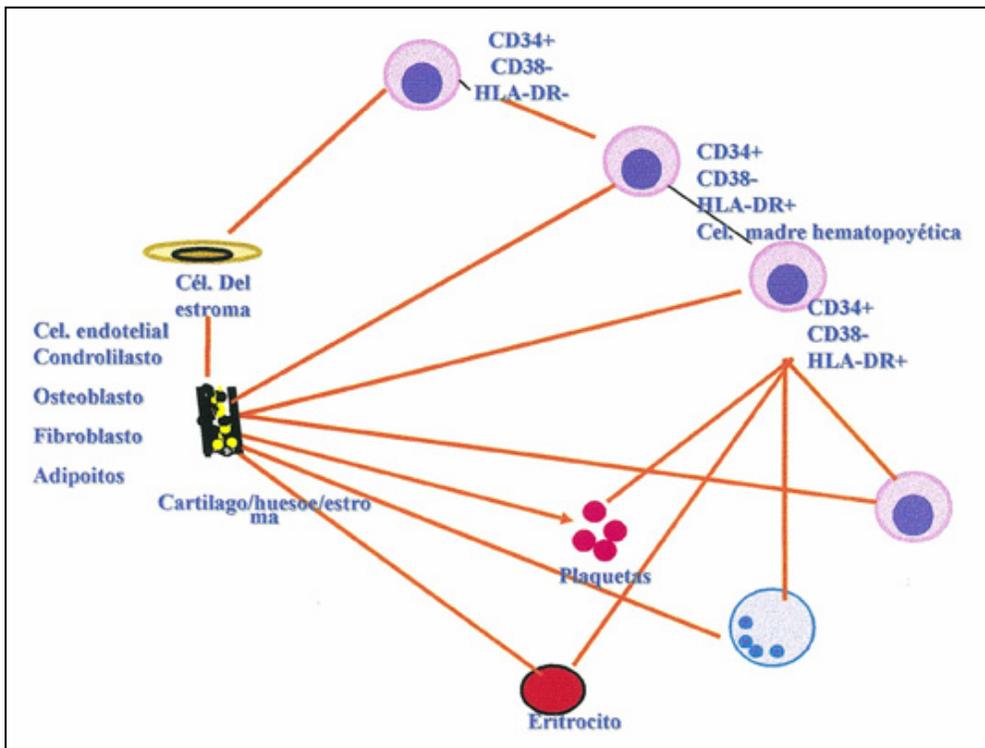


FIGURA No 9
MARCAJE INMUNOFENOTÍPICO CON ANTICUERPOS MONOCLONALES
DE LAS CÉLULAS MADRES HEMATOPOYÉTICAS

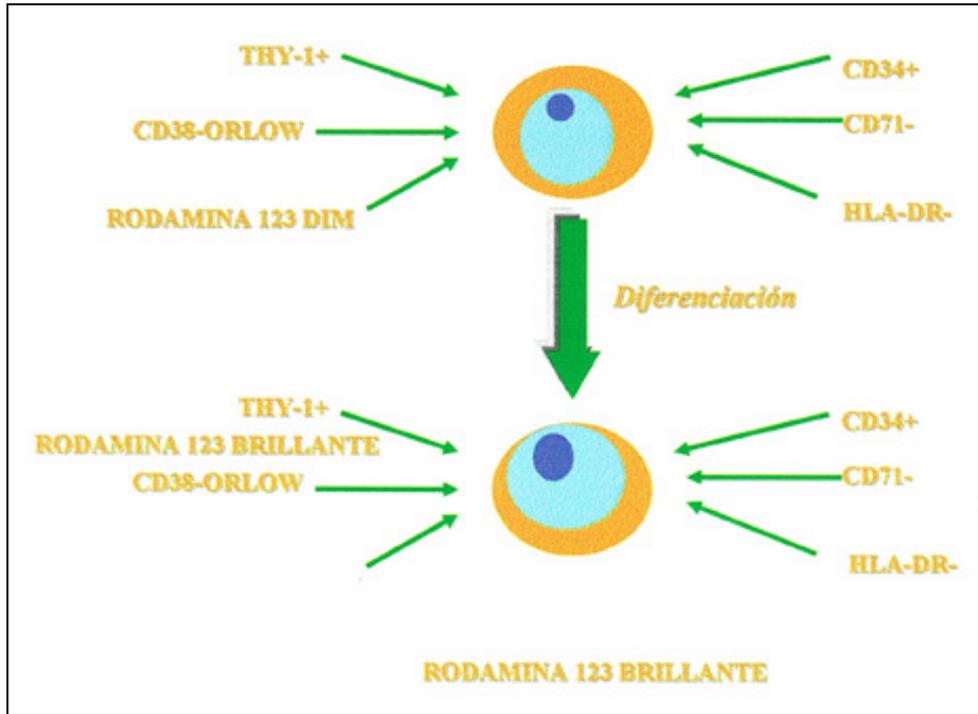
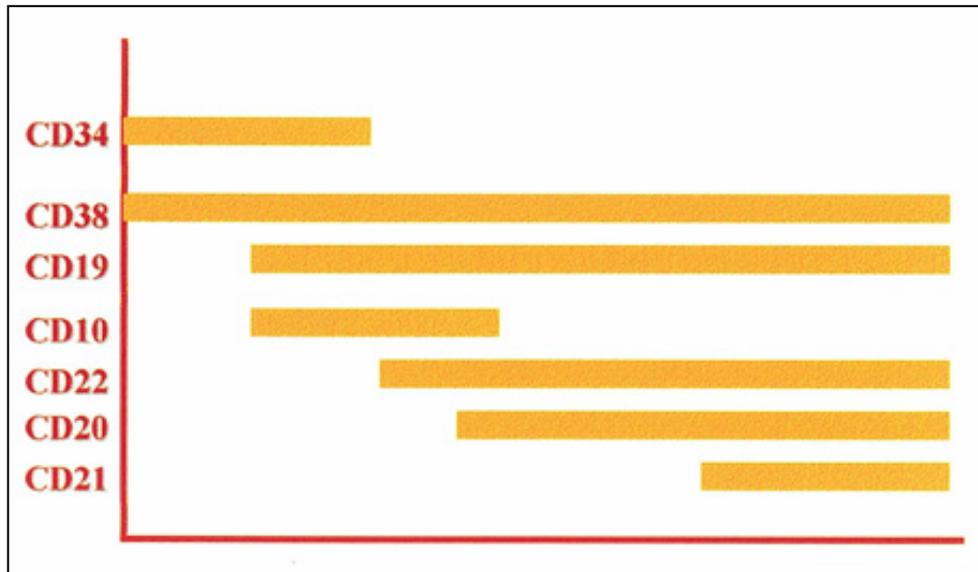


FIGURA N° 10
MADURACIÓN LINFOCITOS B



Representación esquemática de la expresión secuencial de los antígenos de la superficie celular durante la maduración del linfocito B

De igual manera se han utilizado anticuerpos anti-CD7 que reconocen antígenos presentes en linfocitos pre-T y por lo tanto identifica células progenitoras ya comprometidas a diferenciarse en linfocitos pre-T cuando las células se incuban simultáneamente con ambos anticuerpos (Fig. N° 6). El anticuerpo anti-CD45RA reconoce un antígeno presente en células mieloides y por lo tanto reconoce las células progenitoras ya comprometidas hacia la línea mieloides, y anti-CD45RO reconoce un antígeno presente en células eritroides y por lo tanto categoriza células progenitoras comprometidas a diferenciarse a progenitores eritroides (20) (Fig. N° 6).

El antígeno CD33 es uno de los que aparece más tempranamente en la superficie de las células progenitoras que diferencia el linaje mielóide (21, 22). La expresión de CD13 sobre las células CD34+ parece ser más específica de la serie mielóide, ya que no es expresada por los progenitores eritroides (23, 24) (Fig. N° 6).

Los antígenos CD19 y CD10 aparecen sobre la superficie celular tempranamente en las células de linaje linfóide B. Mientras que el antígeno CD 19 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 (Fig. N° 10).

Los progenitores de linfocitos T pueden ser identificados por expresión de CD7 o CD2 en células CD34+ (25) (Fig. N° 6)

Fuentes de células progenitoras

Hasta hace unos pocos años las células madres y progenitoras para realizar trasplantes, se obtenían exclusivamente mediante punción de la cresta iliaca del donante de la médula ósea bajo anestesia general, y se realizaban múltiples aspiraciones de la médula ósea. Desde que se descubrió que las células madres y progenitoras existen también en sangre adulta y en sangre de cordón, estas fuentes han sido utilizadas cada vez más para su obtención y trasplante en un receptor alogénico (individuo genéticamente distinto), en un receptor singénico (un gemelo idéntico) o para autotrasplante (12).

Células CD34+ en sangre y médula ósea

En condiciones normales el porcentaje de células madres y progenitoras CD34+ en médula ósea es de 1 a 3 % y en sangre aproximadamente 0,1% o 1/10 de la cantidad en médula ósea (26). Las células que tienen el antígeno CD34 son capaces de dar origen a todos los tipos de células hemáticas in vitro y la mayoría de los investigadores ha encontrado que el número de células CD34+ en sangre o médula ósea se correlaciona con el de las unidades formadoras de colonias (27). Aún más importante es que las células CD34+ altamente purificadas derivadas de médula ósea o de sangre son capaces de injertarse completamente en una vez infundidas en el receptor (28, 29).

Movilización de células madres y progenitoras CD34+

Movilización por quimioterapia

Las células madres y progenitoras pueden ser movilizadas desde la medula ósea a la sangre periférica durante la fase de rebote leucocitario después de la quimioterapia mielosupresiva. La movilización también se obtiene después de la administración de factores estimulantes de colonias. Varios regímenes de quimioterapia mielosupresiva son capaces de movilizar las células madres y progenitoras hematopoyéticas hacia la sangre, tales como ciclofosfamida a dosis de 4-7 g / m² o combinaciones de drogas (adriamicina, carboplatino, taxol, etopósido, ifosfamida, daunorubicina, ara-C, 6-tioguanina, y otros) (30).

Todos los regímenes de quimioterapia inducen una mielosupresión transitoria y profunda, y se produce una leucopenia severa, que puede llegar a 100 leucocitos / μ l a los 7-14 días postquimioterapia, dependiendo del tipo y dosis de quimioterapia. Esto es típicamente seguido por un rebote con 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, comparado con los valores pretrasplante y los valores aumentados persisten por varios días (31).

Mobilización por quimioterapia y factores de crecimiento

Socinski y col. fueron los primeros en demostrar que la administración de factores de crecimiento hematopoyético (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, GM-CSF) aumentan la circulación de progenitores hematopoyéticos y si se administra después de terapia mielosupresiva, la cantidad de las unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos (CFU-GM) circulante se incrementa aún más (32).

La combinación de quimioterapia mielosupresiva seguida de la administración de factores de crecimiento hematopoyético resulta en un aumento de 73 veces de las unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos (33).

Otras citoquinas, individuales o combinadas, pueden ser usadas para movilizar células progenitoras sanguíneas, tales como la interleuquina-3 (IL-3) y la interleuquina-6 (IL-6), o combinadas con GM-CSF (34).

Mecanismos celulares de movilización de células progenitoras

Las células progenitoras hematopoyéticas de la sangre pueden ser movilizadas por liberación de los progenitores preformados de sus nichos dentro de la médula ósea, por proliferación de células madres o progenitoras dentro de la médula y egreso temprano a la circulación, disminuyendo el egreso de los progenitores ya circulantes, o una combinación de estos mecanismos. Las células progenitoras se encuentran unidas a las células del estroma de la médula ósea y la matriz a través de una variedad de moléculas que incluyen colágeno, fibronectina, hemonectina, trombospodina, moléculas de adhesión ICAM-1 (intercellular adhesión molecular 1), VCAM-1 (vascular adhesion molecule 1) y otros miembros de la familia de las moléculas de proteoglicanos.

Las células CD34⁺ se unen a la fibrinonectina vía las integrinas B1, VLA-4, VLA-5. La VLA-4 también se une a las moléculas de adhesión VCAM-1 y LFA-1 sobre las células CD34⁺ mediante la unión a ICAM-1 y el CD44 se une con el ácido hialurónico en el estroma.

El mecanismo intrínseco mediante el cual cambios en las moléculas de adhesión resultan en la movilización de las células progenitoras no está claro. Si la movilización se debe exclusivamente a liberación de los progenitores de la médula ósea, la concentración de éstos debería disminuir proporcionalmente; sin embargo, las evidencias son controversiales. Se supone que la movilización es dependiente del tiempo, de modo que los mecanismos de liberación de las células CD34+, inducidos por la quimioterapia o citoquinas, deben diferir en el transcurso del tiempo (35).

Varias evidencias sugieren que la movilización es multifactorial; lo más obvio es que la quimioterapia y los factores de crecimiento actúan sinérgicamente. El hallazgo de que la interleuquina-8, los esteroides, y el ejercicio inducen rápida, pero transitoria elevación de las células progenitoras indica fuertemente que los mecanismos de movilización también difieren entre las diferentes drogas usadas para la movilización. Esta sugerencia es soportada por el hallazgo de que los factores estimulantes de colonias, G-CSF y GM-CSF, movilizan poblaciones de células CD34+ con diferentes perfiles fenotípicos. En contraste, los hallazgos de que la mielosupresión inducida por la quimioterapia resulta en concentraciones endógenas de G-CSF, similares a aquellos obtenidos después de dosis farmacológicas, sugiere una vía común para la movilización. Otros factores que afectan la movilización pueden incluir el estado proliferativo de la médula ósea del paciente, su edad o la enfermedad de base de la médula ósea (25,36).

Importancia de las células progenitoras para los trasplantes de sangre periférica

En la década de los 70 se describió que las células progenitoras con potencial para injertarse están presentes, como ya se mencionó, no sólo en la médula ósea sino también en la sangre periférica. En vista de ello, se planteó la realización de transfusiones de células progenitoras provenientes exclusivamente de la sangre como una alternativa al trasplante de la médula ósea (37). El principio que motivó el desarrollo de esta técnica se basó en la capacidad que tienen las células progenitoras sanguíneas, primordialmente las células con el fenotipo CD34+, en restaurar la hematopoyesis normal. La médula ósea es el órgano hematopoyético por excelencia y por ende la fuente principal de células progenitoras. Sin embargo, el trasplante de médula ósea ha presentado ciertos problemas tales como:

1. Que es difícil obtener la médula ósea y el rendimiento es pobre, ya que se requiere practicar múltiples aspirados de médula ósea bajo anestesia general, tanto al donante como es el caso de los trasplantes alogénicos como al paciente con enfermedad maligna como es el caso de los trasplantes autólogos.
2. En muchos casos los pacientes con leucemias o tumores sólidos se encuentran en malas condiciones generales debido a la quimioterapia y radioterapia previa recibida como tratamiento, de hecho, si los huesos ilíacos han sido irradiados, no son una buena fuente de células progenitoras.

Gabutti y col. en 1975 demostraron que la sangre de recién nacidos contenía abundantes células formadoras de colonias hematopoyéticas (38). Posteriormente se demostró que la sangre de cordón umbilical tiene una alta proporción de células progenitoras con alto potencial proliferativo comparable al de la médula ósea y en mayor cantidad que la sangre periférica del adulto (12).

En el 2002, Esmail Z. publica una revisión de los trasplantes de células madres y progenitoras en animales y humanos realizados a nivel mundial. En esos casos se transfundieron células progenitoras por cordocentesis prenatalmente in útero a fetos animales o humanos con inmunodeficiencias combinadas severas utilizando monitoreos ecocardiográficos durante el procedimiento de transfusión de las células madres y progenitoras de sangre periférica (39).

Debido a la importancia desde el punto de vista terapéutico de las células madres y progenitoras provenientes de sangre de adultos o de cordón en los trasplantes de células madres y progenitoras de sangre periférica para pacientes con enfermedades malignas durante el período de mielosupresión severa postquimioterapia y la importancia que tendrán dichos trasplantes en fetos in útero con ciertas deficiencias congénitas comenzamos el estudio de la identificación de las células progenitoras en sangre de adultos, y en sangre fetal desde el año 1996.

OBJETIVOS

1. Identificar y cuantificar mediante estudios hematológicos y de inmunofenotipos con anticuerpos monoclonales la presencia de células hematopoyéticas y células madres y progenitoras CD34+ en sangre fetal prenatal in útero y sangre de cordón de recién nacidos a término.
2. Movilizar con quimioterapia y factores de crecimiento las células madres y progenitoras de la médula ósea de pacientes con enfermedades malignas hacia su sangre periférica.
3. Recolectar mediante procedimiento de aféresis las células madres y progenitoras de pacientes con enfermedades malignas previamente movilizadas con quimioterapia y factores estimulantes de colonias de granulocitos y macrófagos o granulocitos.
4. Identificar mediante estudios inmunofenotípicos con anticuerpos monoclonales las células madres obtenidas por aféresis.
5. Obtener con los procedimientos de aféresis un número de células madres y progenitoras adecuado para injertarse en trasplantes autólogos.
6. Estandarizar un procedimiento sencillo para congelar las células progenitoras hematopoyéticas, que sea fácilmente reproducible por diferentes Bancos de Sangre, y que al descongelarlas permita recuperar un número adecuado de ellas, y que puedan reestablecer la hematopoyesis en el paciente con mielosupresión severa.
7. Identificar y cuantificar las células CD34+ por estudio inmunofenotípico con anticuerpos monoclonales en pacientes con leucemias.

MATERIALES

Se procesaron 278 muestras de sangre para determinación de células progenitoras.

- A. Veintitrés muestras de sangre fetal prenatal obtenida del cordón umbilical de gestaciones de 17 a 32 semanas, de pacientes de la Unidad de Perinatología del Hospital Universitario de Caracas, Cátedra de Obstetricia de la Escuela de Medicina "Luis Razzetti", Universidad Central de Venezuela. Se procesaron 6 muestras de sangre prenatal de embarazos entre 17-20 semanas de gestación, 10 muestras de 21-25 semanas de gestación, 5 muestras de 26-29 semanas de gestación y 2 muestras de 32 semanas de gestación.
- B. Veinticinco (25) muestras de sangre de cordón umbilical de recién nacidos de gestaciones de 37 a 41 semanas. Las pacientes fueron atendidas en el Servicio de Obstetricia del Hospital Universitario de Caracas.
- C. 8 muestras de sangre periférica de pacientes con malignidades premovilización.
- D. 25 muestras de sangre periférica de 12 pacientes con malignidades postmovilización con ciclofosfamida (CTX) y GM-CSF o G-CSF
- E. 39 muestras de productos de las cosechas de aféresis de 12 pacientes con malignidades previamente movilizados con ciclofosfamida y factores de crecimiento.
 - 3 pacientes con diagnóstico de 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 hematológica e inmunofenotípica
 - 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 trasplante alogénico de sangre periférica de su hermana HLA compatible.

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

METODOS

Obtención de la sangre fetal prenatal

Se obtuvieron 23 muestras de sangre fetal prenatal del cordón umbilical por cordocentesis o por punción de las venas intrahepáticas guiadas 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.

Las indicaciones para la toma de sangre fetal prenatal de las pacientes (Tabla N° III) fueron sospecha de malformaciones congénitas porque la paciente presentaba antecedentes de diagnósticos de embarazos anteriores con malformaciones fetales o estudios de ecosonografía fetal anormal o elevaciones de la alfa-fetoproteína y acetil colinesterasa en suero, en el líquido amniótico o en ambos o la paciente era primigestas añosa o presentaba un embarazo con incompatibilidad Rh sensibilizados.

TABLA N° III
MATERIALES DIAGNÓSTICOS PRENATALES

Pts	Edad Materna	Edad gestacional	Gesta-Para	Diagnóstico
AG	33	29	III-II	Rh negativo
YV	35	23	0-0	Primigesta añosa
IR	24	18	III-III	Rubeola
IS	24	21	III-0	Rh negativo
AP	20	23	III-I	Rubeola
MG	18	19	I-0	Ventriculomegalia
IG	18	28	0-0	Malf. Múltiples
DM	37	21	IV-III	Tumor abd. Fetal
MM	24	17	II-I	Prosencefalia
LP	20	20	III-II	Rubeola
CE	38	24	V-I	Alfafetoproteína elevada
SH	22	32	0-0	Ventriculomielo-meningocele
JA	25	24	II-0	Hidronefrosis
MG	37	27	II-I	Malf. Renales múltiple
MP	19	21	I-0	Rubeola
MR	24	29	II-I	Malf. Intestino
AM	23	28	0-0	Rubeola
JA	20	20	III-II	Malf. Múltiples
MA	18	28	0-0	Malf. múltiples
LG	23	33	III-IV	Displasia esquelética
JK	26	20	VI-IV	Malf- Cong
IS	24	21	III-III	Rubeola
APA	24	23	III-0	Rh negativo

Hubo una paciente a la cual se le tomó muestra de sangre fetal prenatal porque presentó elevación tanto de la alfa-fetoproteína sérica como de la alfa-fetoproteína del líquido amniótico, lo cual es sospechoso de malformaciones congénitas del sistema nervioso central como son los defectos abiertos del tubo neural fetal.

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

A cuatro pacientes se le practicó el estudio para toma de muestra para estudios virológicos, por que habían presentado rubéola durante la gestación, lo cual puede causar malformaciones congénitas fetales.

A tres pacientes se les practicó cordocentesis por presentar grupo materno Rh negativo con elevación del título de anticuerpos anti-D en su suero, es decir eran embarazos con incompatibilidad Rh sensibilizados. 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 se determina el número de mls de concentrado globular Rh negativo que el feto requiere y se procede a la transfusión fetal a través del cordón umbilical. En estos casos la paciente es monitorizada con ecosonograma fetal permanentemente durante todo el procedimiento, lo cual permite visualizar la aguja y el sitio donde se está realizando la punción ya sea venas intrahepáticas fetales o cordocentesis.

A una paciente se le realizó la cordocentesis para extracción de sangre fetal porque el feto presentaba al estudio de ecocardiografía prenatal un defecto del tamaño de los ventrículos cardíacos denominado ventriculomegalia.

Así mismo se estudiaron dos pacientes porque sus fetos presentaron al estudio de ecosonograma fetal defectos del sistema nervioso central que abarcaban tanto defectos del encéfalo como del tubo neural denominados prosencefalia y ventriculomielomeningocele.

Hubo dos pacientes cuyos fetos por el estudio ecosonográfico presentaban malformaciones

renales tipo hidronefrosis y malformaciones renales múltiples.

Dos pacientes presentaron los fetos con malformaciones congénitas por ecosonografía fetal, uno de los fetos con tumor abdominal y otro feto presentó malformaciones del intestino.

Cuatro fetos presentaron malformaciones múltiples y uno displasia esquelética por ecosonograma fetal.

Las muestras de sangre fetal prenatal fueron obtenidas por punción de las venas intrahepáticas fetales en 6 pacientes, en 16 pacientes por cordocentesis y en una paciente por cardiocentesis. Se realizó esta punción por cardiocentesis por error, sin embargo, la madre fue dejada en observación en el Servicio de Obstetricia del HUC y se le realizaron estudios ecosonográficos fetales y no hubo complicaciones ni fetales ni maternas. La cardiocentesis ha sido reportada con antelación. (Tablas N° IV)

TABLA IV
MATERIALES. ORIGEN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE PRENATAL

Pts	Edad gestacional	Diagnósticos	Origen de la muestra
AG	29	Rh negativo	Cardíaca fetal
YV	23	Primigesta añosa	Cordón umbilical
IR	18	Rubeola	Cordón umbilical
IS	21	Rh negativo	Cordón umbilical
AP	23	Rubeola	Vena intrahepática
MG	19	Ventriculomegalia	Vena intrahepática
IG	28	Malf. Múltiples	Vena intrahepática
DM	21	Tumor adb. Fetal	Vena intrahepática
MN	17	Presencefalia	Cordón umbilical
LP	20	Rubeola	Cordón umbilical
CE	24	Alfafetoproteína elevada	Cordón umbilical
SH	32	Ventriculomielomeningocele	Cordón umbilical
JA	24	Hidronefrosis	Cordón umbilical
MG	27	Malf. Renales múltiples	Vena intrahepática
MP	21	Rubeola	Vena intrahepática
MR	29	Malf. Intestino	Cordón umbilical
AM	28	Malf. Múltiples	Cordón umbilical
MR	20	Malf. Múltiples	Cordón umbilical
MA	28	Malf. Múltiples	Cordón umbilical
LG	33	Displasia esquelética	Cordocentesis
JK	20	Malf. Congenitas	Cordocentesis
IS	21	Rubeola	Cordocentesis
APA	23	Rh negativo	Cordocentesis

Es de hacer notar que durante el proceso de obtención de sangre fetal prenatal los obstetras que realizaban las punciones estandarizaron el método de obtención de sangre prenatal. Inicialmente se trabajó con punciones de vías intrahepáticas fetales bajo monitoreo permanente con ecosonografía fetal, pero posteriormente se cambió al método de cordocentesis, por ser este más fácil para obtener la muestra de sangre fetal.

Durante el proceso de estandarización se llegó la conclusión que es muy difícil de obtener dicha muestra de sangre fetal cuando la madre es obesa o hay problemas con la ubicación de la placenta tipo placenta anterior. Esta obtención puede poner en peligro la vida fetal, por lo cual no se realizaron. En ningún caso hubo complicaciones de la vida materna o fetal o partos prematuros o abortos o sangramientos vaginales o fetales que pudiesen ser detectados por clínica o ecosonografía fetal.

Obtención de la sangre de cordón umbilical

Las muestras de sangre de cordón fueron obtenidas en Sala de Partos del Servicio de Obstetricia del Hospital Universitario de Caracas

Todas las muestras pertenecieron a recién nacidos a término cuyas edades gestacionales oscilaron entre 38 y 41 semanas de gestación.

Las muestras fueron tomadas luego del parto y de retirar al recién nacido del área de trabajo, con el cordón aún prensado y la placenta *in situ*. Se aspiraron entre 10 ml de sangre por punción de los vasos umbilicales del lado materno del cordón. Esto fue realizado utilizando una inyectora estéril con aguja calibre N° 18 y vertidas en tubo de ensayo con CPD (Solución de citrato-fosfato-dextrosa) en proporción 1 a 5, como anticoagulante.

Recolección de células progenitoras de sangre por aféresis

1. Se realizaron recolecciones de células progenitoras de sangre periférica a 12 pacientes con enfermedades malignas en la máquina de aféresis de Baxter-Fenwal CS3000 y a una paciente con leucemia mieloide aguda M4 en remisión completa en la máquina de aféresis de la Haemonetics MCS Plus del Banco de Sangre de la Clínica El Ávila

2. A todos los pacientes excepto dos de ellos se les colocó un catéter rígido de hemodiálisis 126 A x 1,5 ml o un cateter de Hickman en la vena la vena cava superior vía vena subclavia para facilitar el el acceso venoso al procedimiento de aféresis.
3. Se realizaron hematologías en el Contador Hematológico Coulter S Plus IV a los pacientes antes de comenzar el período de movilización de células progenitoras. Se planificó comenzar la movilización cuando el paciente se hubiese recuperado del período de mielosupresión ocasionado por el tratamiento con quimioterapia o radioterapia o ambas para su enfermedad maligna
4. Se utilizó en 5 pacientes con enfermedades malignas (carcinomas ductal infiltrante de mama y linfomas no Hodgkin) como agentes movilizadores de células madres y progenitoras ciclofosfamida 4g/mt² / IV en 500 cc de solución salina a pasar en 1 hora y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) a la dosis de 8 µg / m² B.I.D. /sube. previa hidratación y administración de antieméticos.
5. Se utilizó en 7 pacientes con enfermedades malignas (linfomas no Hodgkin, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple) como agentes movilizadores de células madres y progenitoras ciclofosfamida y el factor estimulante de colonias de granulocitos G-CSF a las mismas dosis. En todos los casos se comenzó la administración de los factores estimulantes de colonias de granulocitos o granulocitos y macrófagos a las 48 horas de haber terminado la infusión de ciclofosfamida (30).
6. Se le realizaron hematologías y recuentos de células CD34+ por citometría de flujo con anticuerpos monoclonales a cada muestra de sangre periférica de los pacientes postmovilización de células progenitoras
7. Se comenzó la primera recolección postmovilización cuando el paciente tuvo aproximadamente 2000 a 5000 leucocitos por µl y el recuento de células CD34+ comenzó a aparecer y ascendió en sangre periférica. Es de hacer notar que solo los primeros 3 pacientes se les comenzó la recolección cuando el conteo era menor de 2000 / ul, de acuerdo a la literatura internacional para 1996 (30).
8. Se hizo la recolección de los productos en las máquinas de aféresis CS 3000 de la Baxter y MCS Plus de la Haemonetic, de acuerdo a indicaciones de los fabricantes de dichas máquinas de aféresis. (Tabla N° V, Fig. N° 11). La recolección se realiza con un procedimiento de leucoféresis modificado mediante el cual la sangre movilizada

del paciente es retirada, es anticoagulada con solución de ACD A (11-13: 1) y bombeada a una cámara de centrifugación. Aquí los elementos de la sangre son separados de acuerdo al tamaño celular y a la densidad, formándose bandas o capas dentro de la cámara. La capa rica en leucocitos es cosechada dentro de un vaso de colección y los otros elementos de la sangre del paciente son devueltos al paciente.

TABLA N° V
PARÁMETROS DE LAS MAQUINAS DE AFERESIS
Baxter CS-3000 Y MCS-Plus Haemonetic

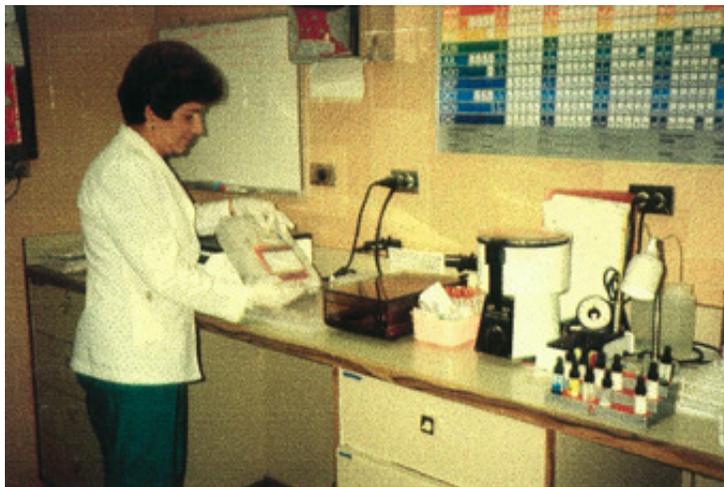
BAXTER	HAEMONETIC
• Volumen de punto final: 15000 ml	• Volumen de punto Final: 9.950 ml
• Tiempo de corrida: 5 hs	• Tiempo de corrida: 3 hs
• Kit de aféresis: sistema cerrado	• Kit de aféresis: sistema abierto
• Flujo: Continuo	• Flujo: Discontinuo 16 ciclos

FIGURA 11
PACIENTES REALIZÁNDOSELE AFÉRIS DE CÉLULAS PROGENITORAS CON LA MÁQUINA CS3000 DE BAXTER



9. A cada paciente se le procesaron en la máquina de aféresis CS3000 15 litros de sangre durante 5 horas excepto la paciente con leucemia mieloide aguda. En esta paciente se utilizó la máquina de aféresis de la Haemonetics y se le procesaron 9950 ml de sangre en 3 horas.
10. Los productos de la cosecha de células progenitoras obtenidos en las máquinas de aféresis se centrifugaron para extraer plasma sobrenadante.
11. A continuación, se preparó la solución para criopreservar los productos de la cosecha de las células progenitoras de sangre periférica obtenidos por aféresis de la siguiente manera: Se mezclaron 45 ml de Hespan (Hidroxietilstarch de los Laboratorios Fresenius) +14,4 ml de albúmina + 6,6 ml de DMSO (dimetilsulfoxido de los Laboratorios Sigma).
12. La solución para criopreservar que contiene el DMSO se añadió con inyectora volumen a volumen y muy lentamente al producto (que se encontraba en una bolsa especial de aféresis de la Baxter sumergida en hielo). A medida que se iban añadiendo las gotas de la mezcla criopreservadora se iba mezclando con el producto mediante movimientos manuales suaves a la bolsa. Se extrajo el aire de la bolsa de aféresis y se selló la bolsa al calor con el sellador automático y eléctrico Hematron. Se utilizó con el producto la mitad del volumen de la bolsa Baxter. En ningún caso se utilizó más de la mitad del volumen de la bolsa. Se obtuvieron concentraciones celulares dentro de las bolsas de congelación 3×10^7 / ml a 8×10^8 / ml. (Fig. N° 12)

FIGURA N° 12
PROCESAMIENTO DEL PRODUCTO DE AFÉRESIS DE LAS CÉLULAS
PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS



13. Se mezcló bien y tomó 1ml. del producto de aféresis para determinar CD34+, HLA-Dr y otros complejos de diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas en el citómetro de flujo con los anticuerpos monoclonales (Tabla N° VI) (30).
14. Se colocó la bolsa del producto de aféresis con su solución criopreservadora entre 2 láminas de metal (2 tapas de metal) con el objeto de formar unas capas de células sanguíneas muy delgadas dentro de la bolsa del producto para un mejor contacto de las células madres y progenitoras con la solución criopreservadora . Dicha bolsa con el producto de aféresis y la solución criopreservadora se guardó en el congelador del Banco de Sangre a - 80° C.
15. Se anotaron todos los parámetros de la máquina usados

**TABLA VI
METODO
ANTICUERPOS MONONUCLEARES PARA CLASIFICAR LAS CÉLULAS
PROGENITORAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO**

➤ Linfocitos T:	CD2, CD3, CD4, CD8
Linfocitos B:	CD19, CD10, CD20
Células progenitoras:	CD 34 (Clases: I, II, III)
Leucocitos:	CD45 y HLA-Dr
Subpoblaciones T:	Células Natural Killer
Monocitos y granulocitos:	CD11b

Procesamiento de las muestras de sangre fetal prenatal

A todas las muestras de sangre fetal prenatal se le determinó:

1. Valores de hemoglobina (Hb), hematocrito (Hto) y volumen corpuscular medio (VCM) en un Contador Hematológico Coulter S Plus IV. Además, se le realizó un frotis de sangre de dicha muestra y se coloreó con colorante de Wright.
2. Electroforesis de Hb en membrana de acetato de celulosa de la casa Helena: para ello se tomó una gota de sangre fetal, se aplicó con un aplicador Helena sobre la membrana de acetato de celulosa previamente mojada y secada en buffer Tris-HCl-EDTA-Borato pH 8. Simultáneamente se aplicaron controles de Hb Fetal, Hb AA, Hb AS, HB A2 y se corrieron con el mismo buffer en la cámara de electroforesis Beckman a 400 voltios (2,5 mamp.) y se colorearon con rojo Ponceau S por 10 min.

Se removió el exceso de colorante con ácido acético al 5% mediante 3 lavados de 2 minutos cada uno. Se colocó la membrana sobre una placa de vidrio. Se secó la membrana con papel de filtro. Se fijó y se clarificó la membrana de la siguiente forma:

- i) Con metanol absoluto durante 1 min.
- ii) Luego se colocó la membrana en una solución de 5ml de metanol absoluto y 5 ml de ácido acético glacial al 20% durante 50 seg.
- iii) Se secaron las membranas en el horno al seco a 80-100°C por 10-15 min (40).
- iv) Se sacaron del horno y se colocaron en sobres plásticos transparentes.

Estudio inmunofenotípico de las muestras de sangres fetales, de adultos y de los productos de aféresis preparación de las muestras

Se realizó hematología completa en el contador hematimétrico Coulter S Plus IV. Se ajustó el número de células a una concentración de 10000/ μ l en solución buffer fosfato de PBS y se tomó 50 μ l de suspensión celular para incubación con el anticuerpo monoclonal específico marcado durante 10 minutos, protegidos de la luz y a temperatura ambiente.

Se agregaron 2 ml de solución de lisis, la cual contiene cloruro de amonio, y a los 10 min. se centrifugaron los tubos durante 5 min. a 2500 rev. por min. y se decantó el sobrenadante. El botón celular se lavó con 2 ml de PBS y se centrifugó por 5 min. a 2500 rev. por min (41)

Análisis de las muestras por citometría de flujo

Se utilizó un citómetro de flujo Beckton & Dickinson para la cuantificación con anticuerpos monoclonales de las células madres y progenitoras CD34+ y de otras líneas hematopoyéticas tales como linfocitos B, linfocitos T, células mieloides. (Tabla N° VI, Tabla N° VII).

TABLA N° VII
PANEL DE ANTICUERPOS MONONUCLEARES
PARA CLASIFICAR LEUCEMIAS

❖ Leucemias linfoides B	❖ Leucemias Mieloides
❖ CD34	❖ CD34
❖ CD19	❖ CD13
❖ CD24	❖ CD33
❖ CD20	❖ CD15
❖ CD10	❖ CD11B
❖ Leucemias linfoides T	❖ CC14
❖ CD7	❖ CD41
❖ CD5	❖ CD42
❖ CD2	❖ CD61
❖ CD1	❖ CD36
❖ CD4	❖ CD71
❖ CD8	
❖ CD3	

La cuantificación de las células CD34+ se realizó en base a la siguiente técnica: la adquisición se hizo sobre una "ventana" de células nucleadas, observadas en un primer gráfico de puntos Forward Scatter (FSC- Height versus Side Scatter (SSC- Height); posteriormente un segundo gráfico de puntos de SSC- Height versus logaritmo de fluorescencia CD45 FITS, que marcó leucocitos y un tercer gráfico de puntos de SSC-Height versus logaritmo de fluorescencia CD34 PE (ficoeritrina), que marca células CD34+. Un cuarto gráfico de puntos CD34 PE vs logaritmo de fluorescencia CD45 FITS. Este último gráfico de puntos definió mejor la población de linfocitos y monocitos y consecuentemente permitió una mejor visualización de las células CD34+. En todos los casos se adquirieron suficientes eventos (10.000- 50.000) hasta obtener una población bien definida de células CD34+. Se identificaron como células progenitoras las que expresaban positividad para CD34+. Se procedió de la misma forma con el resto de los anticuerpos, pero cambiando el CD34 por CD19, CD20, CD10, CD2, CD7, CD4, CD8, HLA-Dr, CD45.

En las muestras de sangre de cordón de los recién nacidos se utilizaron también anticuerpos monoclonales con doble marcaje que permitieron subclasificar las células progenitoras CD34+/ CD33-, CD34+/ HLA-Dr+ y CD34+/HLADr-.

Se identificaron como células de estirpe linfoides B, las que expresaban positividad para CD19, CD20, CD10, y que habían marcado con los anticuerpos anti- HLA-Dr, anti-CD45, que se dirigen a los antígenos leucocitarios

Se identificaron como células linfoides B, las que expresaban positividad para CD2, CD7, CD4, CD8 y habían marcado con los anticuerpos anti-HLA-Dr, anti- CD45 contra antígenos leucocitarios.

Se identificaron como células mieloides, las que expresaban positividad para CD33, CD13, CD14 y habían marcado con los anticuerpos anti-HLA-Dr, anti-CD45. Los datos se reportaron en porcentaje Esta técnica en general requiere la realización de un buen lisado de las muestras. En aquellos casos en los que no se logró eliminar totalmente los hematíes se repitió nuevamente el procedimiento (41,42).

Reinfusión del producto de aféresis

- 1) Se hidrató bien el paciente con solución 0,45%, se premedicó con diuréticos, antihistamínicos y esteroides para reducir el riesgo de colapso vascular y hipotensión al administrar el producto IV al paciente, ya que el producto contiene el congelante DMSO, que puede causar efectos cardiovasculares como bradicardia, hipotensión, hipertensión. Se administró diurético porque las células rojas de la bolsa del producto no resisten la descongelación y se hemolizan causando en el paciente hematuria.
- 2) Se descongeló el producto, para lo cual se sumergió la bolsa con el producto dentro de un baño de María a 37 °C por unos minutos inmediatamente antes de la reinfusión.
- 3) Se realizaron determinaciones de la viabilidad celular con azul tripano. Para ello se colocó una pequeña gota del producto sobre una lámina coloreada con azul tripano y se observó la preparación en un microscopio Standard Zeiss. Las células vivas excluían el colorante y las células muertas se teñían con el mismo de color azul
- 4) Una vez corroborada la viabilidad celular se procedió a reinfundir el producto de la siguiente manera:
 - a) Se añadió ACD-A al Producto en una relación de 63 ml de ACD para 450 ml del producto. Esto se realizó con el objeto de reducir el riesgo de agregación

de las células del producto.

- b) Se reinfundieron las células progenitoras del producto cuando el número total de células contenidas fue: $5,4 \pm 0,4 \times 10^8$ mononucleares / Kg y $2 - 4 \times 10^6$ CD34+ / Kg. Esto se obtuvo con 2-3 aféresis.

RESULTADOS

A todas las muestras de sangre fetal prenatal se les determinó las concentraciones de hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio y clase o tipo de hemoglobina por electroforesis. 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 $11,6 \pm 1$ g/dl entre las semanas 17-20, el cual fue ascendiendo a medida que aumentaba la edad gestacional, hasta 13 ± 1 g/dl entre las semanas 27-32 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 progresaba la gestación el volumen corpuscular medio de los eritrocitos disminuyó hasta alcanzar entre las 27-32 semanas un volumen de 117,9 fl (Tabla N° VIII).

TABLA VIII
VALORES HEMATOLÓGICOS EN SANGRE FETAL PRENATAL

Edad gestacional	Hbg/dl	Hto %	VCMfl
17-20	$11,6 \pm 1,0$	$37,0 \pm 4,0$	$130,0 \pm 4,0$
21-26	$12,0 \pm 1,0$	$38,7 \pm 3,0$	$125,0 \pm 8,0$
27-32	$13,0 \pm 1,2$	$40,9 \pm 4,1$	$117,9 \pm 7,6$

La electroforesis de Hb de sangre prenatal fue realizada con el objeto de asegurar que la muestra de sangre procedía del feto y no de la madre. Efectivamente, esta prueba demostró la presencia de hemoglobina fetal en todas las muestras de sangre de menos de 32 semanas de gestación. Las muestras de sangre estaban compuestas de hemoglobina fetal ($Hb \alpha_2 \beta_2$), y no de Hb A ($Hb \alpha_2 \beta_2$), que es la hemoglobina del adulto normal. Otra demostración de que la sangre obtenida por punción intrauterina era fetal es la de que en todos los casos el VCM del eritrocito estuvo muy aumentado, como se ve en sangre fetal, ya que los eritrocitos maternos normales tienen un volumen corpuscular medio menor de 95 fl.

El análisis inmunofenotípico con anticuerpos monoclonales dirigidos hacia las moléculas de diferenciación de las células provenientes de sangre fetal prenatal permitió identificar la

expresión de marcadores para leucocitos 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 (Fig. N° 13 a 16).

FIGURA N° 13
EXPRESIÓN DE MARCADORES DE LEUCOCITOS EN CÉLULAS
DE SANGRE PRENATAL DE 17 A 20 SEMANAS DE GESTACIÓN

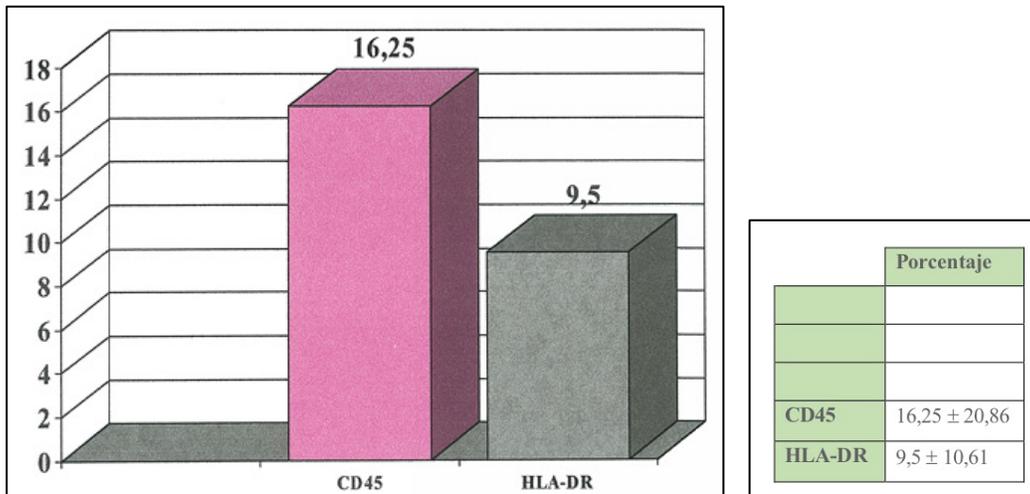


FIGURA N° 14
EXPRESIÓN DE MARCADORES DE LEUCOCITOS EN CÉLULAS
DE SANGRE PRENATAL DE 21 A 25 SEMANAS DE GESTACIÓN

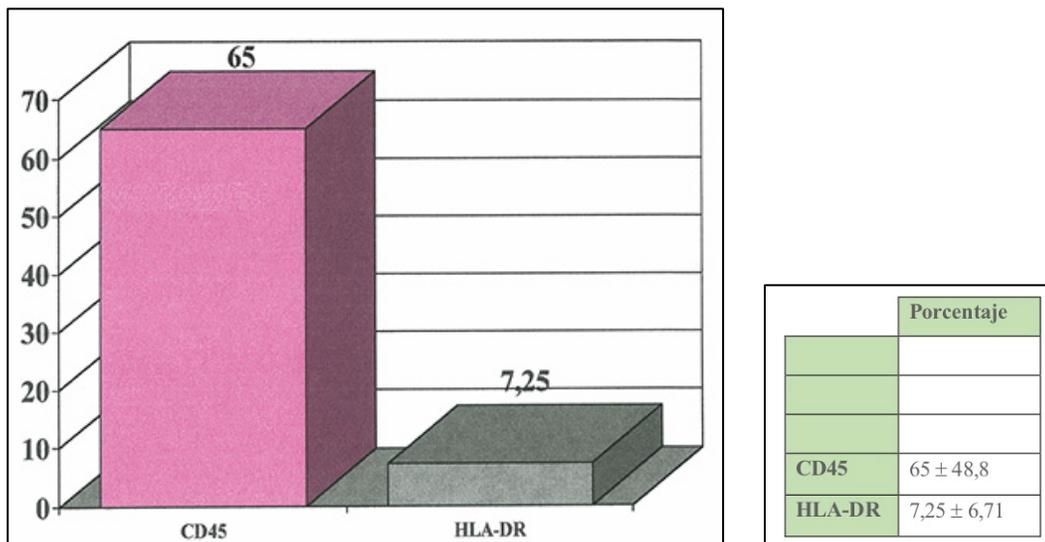


FIGURA N° 15
EXPRESIÓN DE MARCADORES DE LEUCOCITOS EN CÉLULAS
DE SANGRE PRENATAL DE 26 A 32 SEMANAS DE GESTACIÓN

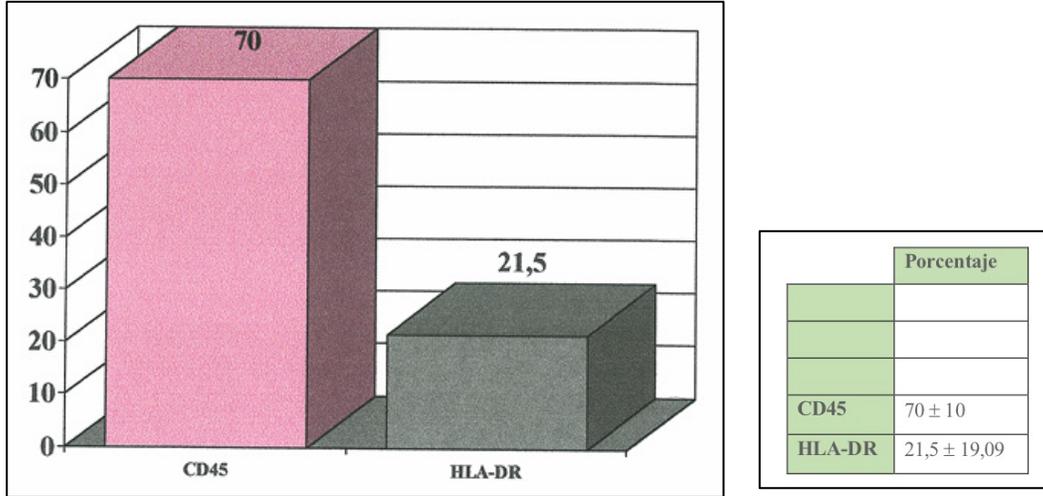
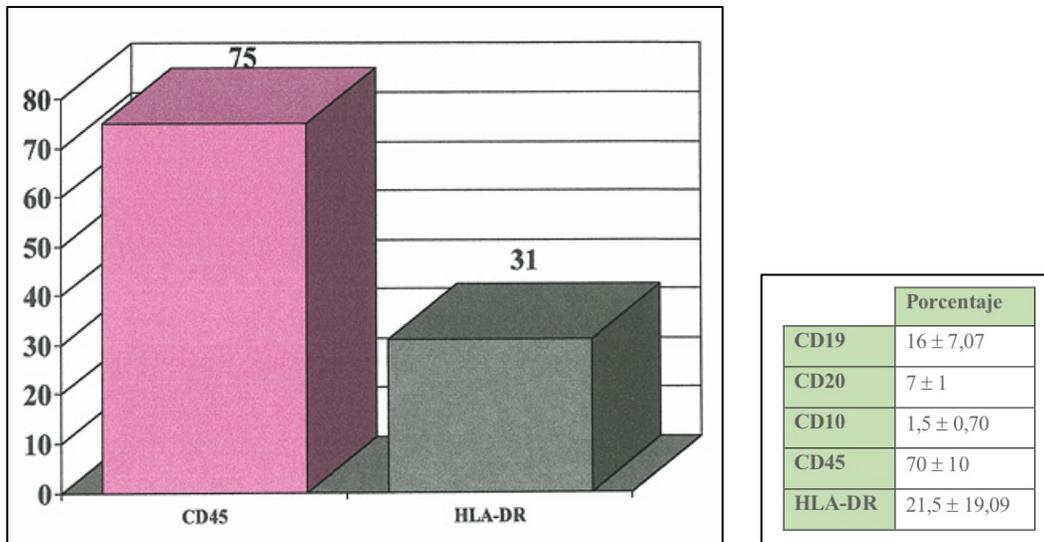


FIGURA N° 16
EXPRESIÓN DE MARCADORES DE LEUCOCITOS EN CÉLULAS
DE SANGRE PRENATAL DE 17 A 32 SEMANAS DE GESTACIÓN



Las células de la sangre prenatal fetal mostraron expresión del marcador CD34 que identifica células madres y progenitoras, el cual tuvo tendencia a disminuir a medida que aumentaba la edad gestacional en estas muestras de sangre prenatal fetal analizadas (Fig. N° 17 a 27).

También hubo expresión en la sangre fetal prenatal de los marcadores para los linfocitos T: CD2, CD7, CD4 y CD8 (Fig. N°17, 18, 19).

FIGURA N° 17
EXPRESIÓN DE MARCADORES DE LINFOCITOS T EN CÉLULAS DE SANGRE PRENATAL DE 17 A 20 SEMANAS DE GESTACIÓN

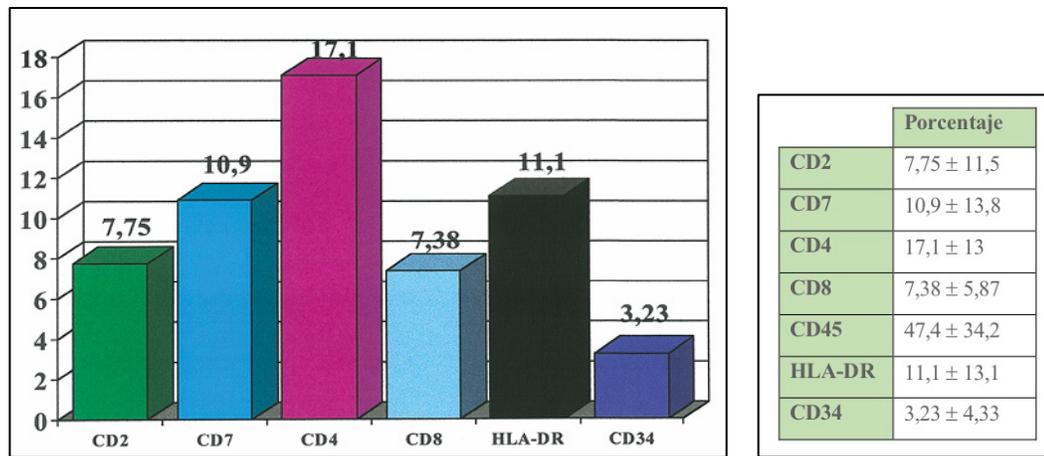


FIGURA N° 18
EXPRESIÓN DE MARCADORES DE LINFOCITOS T EN CÉLULAS DE SANGRE PRENATAL DE 21 A 25 SEMANAS DE GESTACIÓN

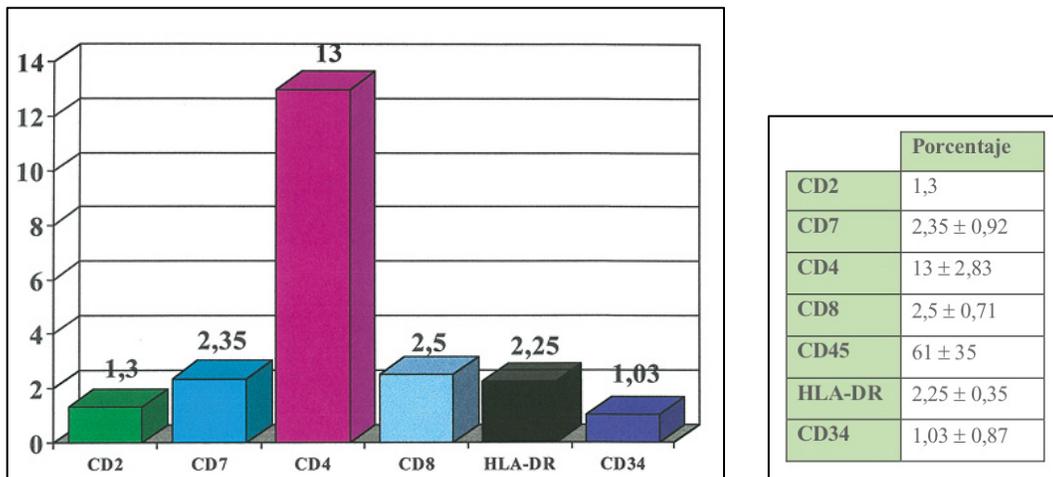
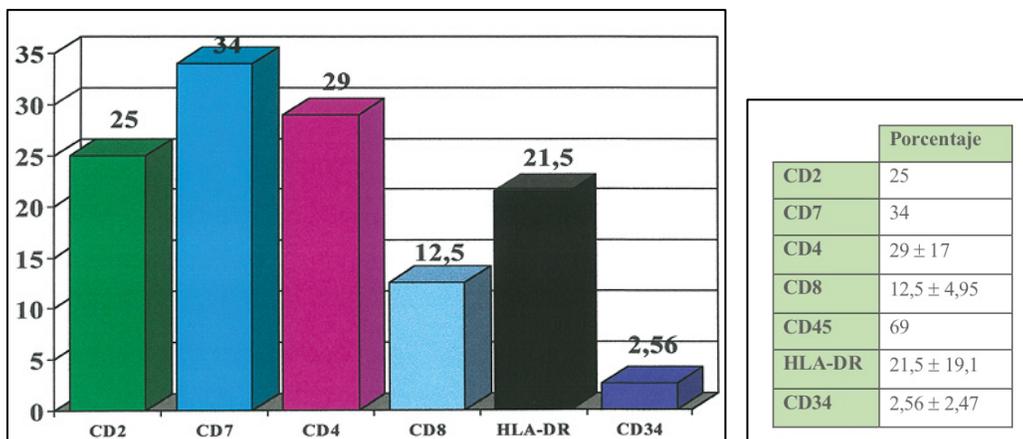


FIGURA N° 19
EXPRESIÓN DE MARCADORES DE LINFOCITOS T EN CÉLULAS
DE SANGRE PRENATAL DE 26 A 32 SEMANAS DE GESTACIÓN



Los anticuerpos monoclonales anti-CD2 y anti-CD7 reconocen principalmente los complejos de diferenciación de la mayoría de los linfocitos T y los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 reconocen subpoblaciones de linfocitos T. Los anti-CD4 reconocen los linfocitos T cooperadores o colaboradores y los anti-CD8, los linfocitos T 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 B más maduros que los linfocitos CD19) (Fig. N° 20 a 23).

FIGURA N° 20
EXPRESIÓN DE MARCADORES DE LINFOCITOS B EN CÉLULAS
DE SANGRE FETAL PRENATAL DE 17 A 20 SEMANAS DE GESTACIÓN

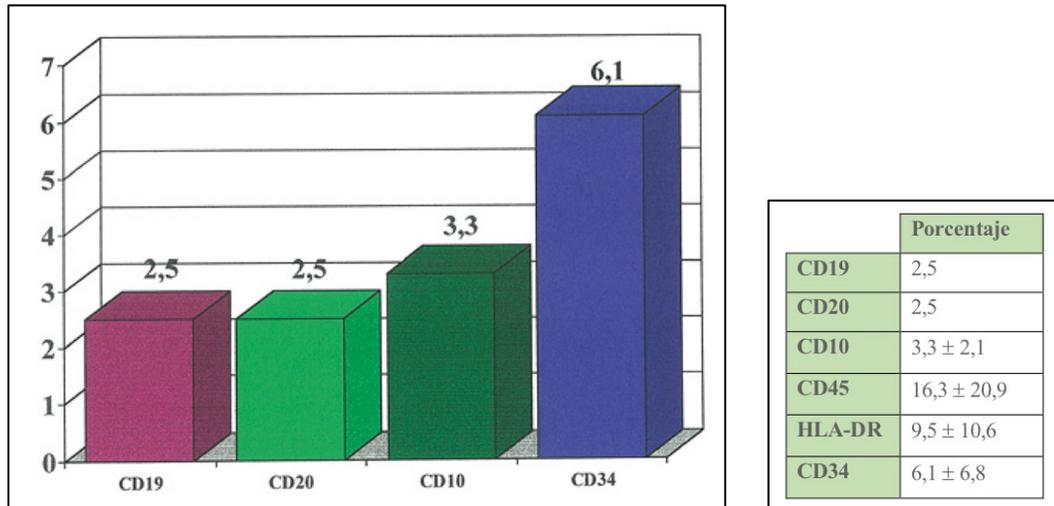


FIGURA N° 21
EXPRESIÓN DE MARCADORES DE LINFOCITOS B EN CÉLULAS
DE SANGRE FETAL PRENATAL DE 21 A 25 SEMANAS DE GESTACIÓN

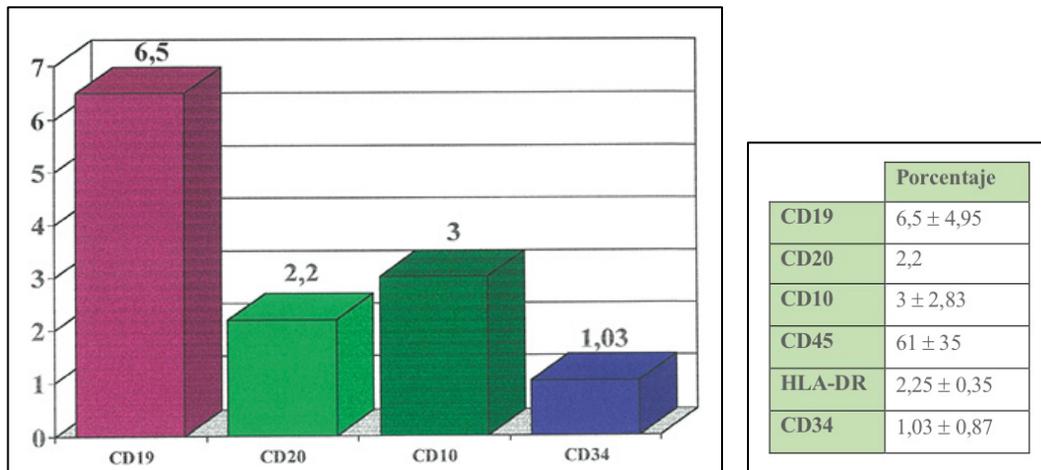


FIGURA N° 22
EXPRESIÓN DE MARCADORES DE LINFOCITOS B EN CÉLULAS
DE SANGRE FETAL PRENATAL DE 26 A 32 SEMANAS DE GESTACIÓN

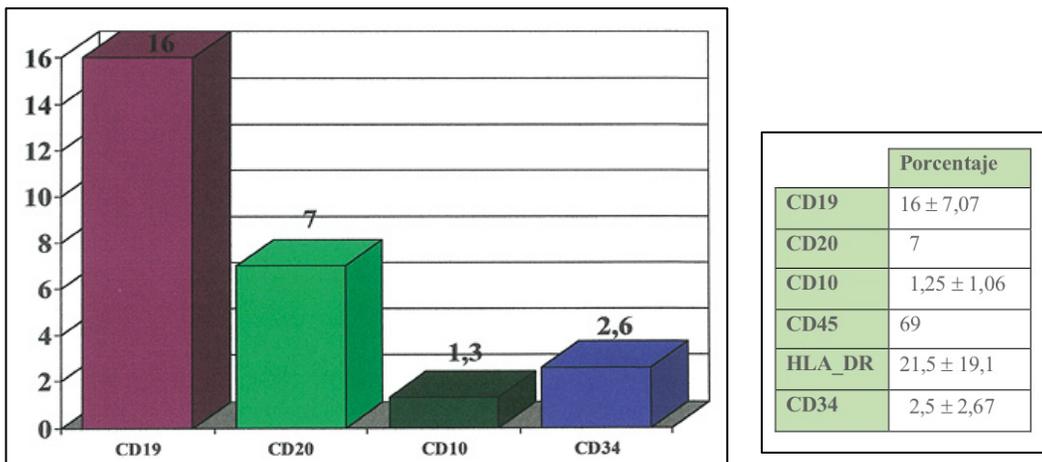
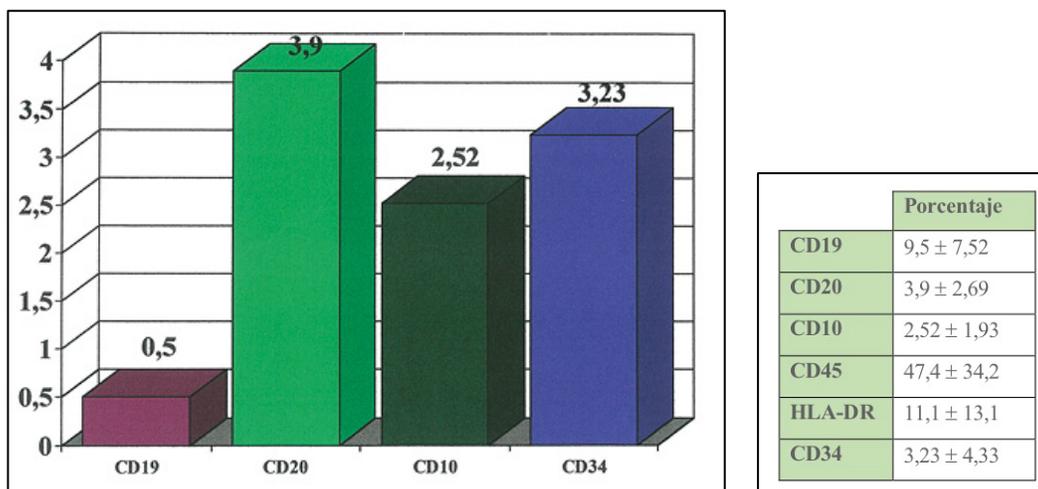


FIGURA N° 23
EXPRESIÓN DE MARCADORES DE LINFOCITOS B EN CÉLULAS
DE SANGRE FETAL PRENATAL DE 17 A 32 SEMANAS DE GESTACIÓN



Así mismo hubo expresión en la sangre fetal de los marcadores mieloides CD13, CD14 y CD33. El CD13 se encuentra presente en monocitos y polimorfonucleares, mientras que el

CD 14 es expresado sólo por monocitos, y el CD33 por células de estirpe mieloide (Fig. N° 24 a 27).

FIGURA N° 24
EXPRESIÓN DE MARCADORES MIELOIDES EN CÉLULAS DE SANGRE FETAL
PRE NATAL ENTRE 17-20 SEMANAS DE GESTACIÓN

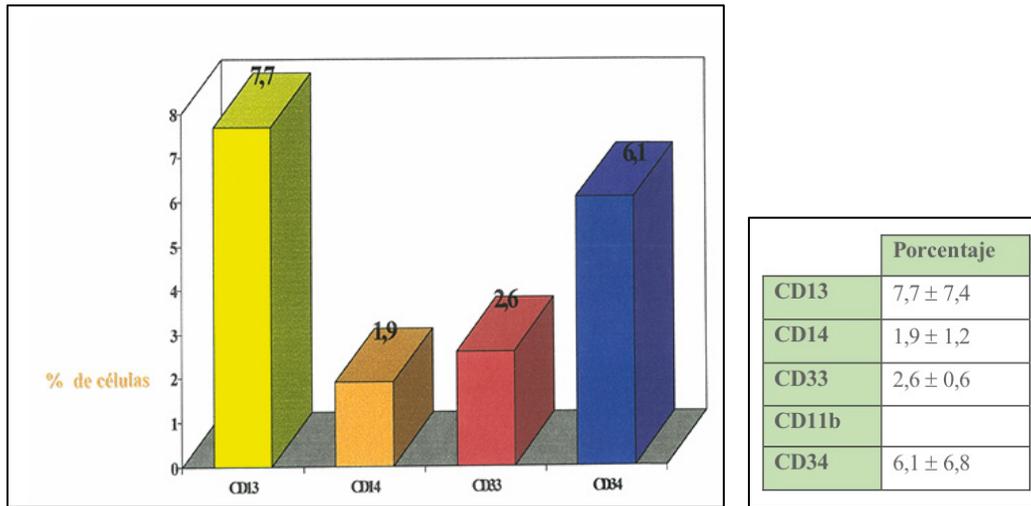
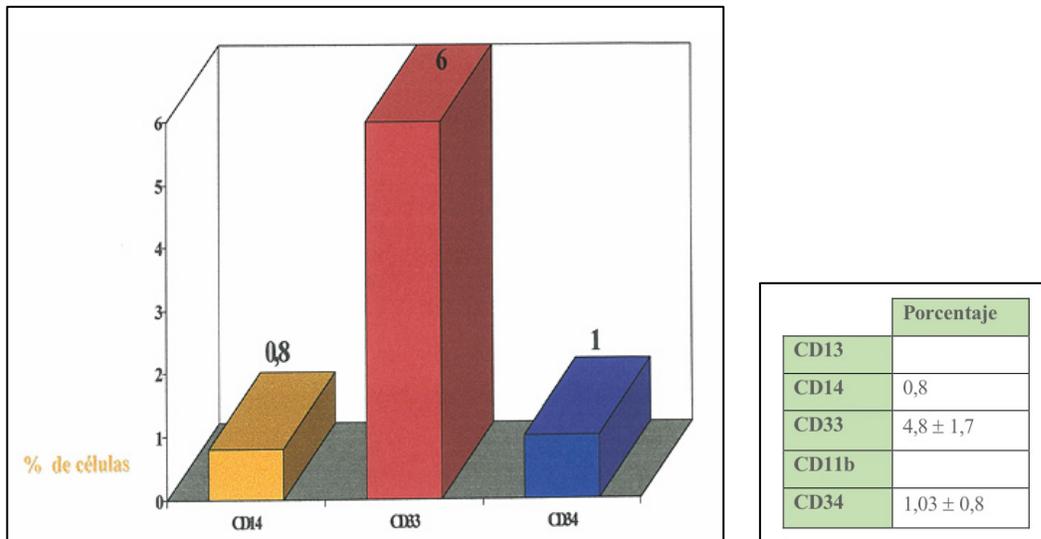


FIGURA N° 25
EXPRESIÓN DE MARCADORES MIELOIDES EN CÉLULAS DE SANGRE FETAL
PRE NATAL ENTRE 21-25 SEMANAS DE GESTACIÓN



Hubo expresión del marcador CD 11b, el cual se encuentra presente en monocitos, mielocitos, células NK (natural killer) y subpoblaciones de linfocitos T (Figs. N° 26 y 27).

FIGURA N° 26
EXPRESIÓN DE MARCADORES MIELOIDES EN CÉLULAS CD34+ DE SANGRE FETAL PRE NATAL ENTRE 26-32 SEMANAS DE GESTACIÓN

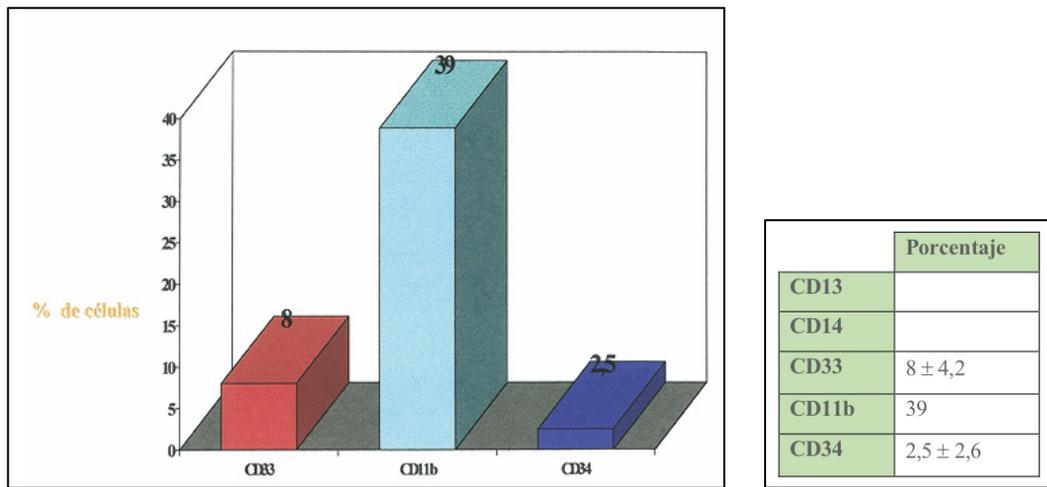
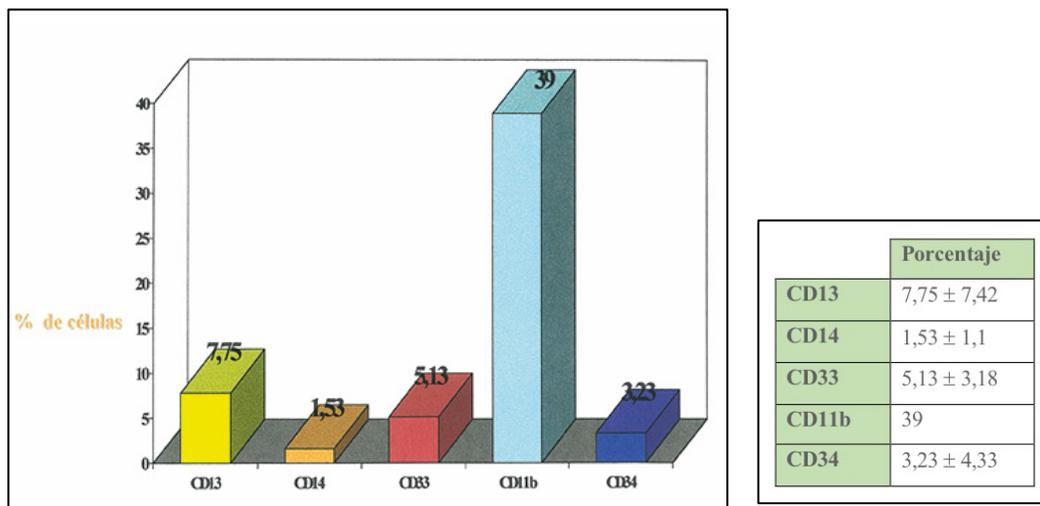


FIGURA N° 27
EXPRESIÓN DE MARCADORES MIELOIDES EN CÉLULAS CD34+ DE SANGRE FETAL PRE NATAL ENTRE 17-32 SEMANAS DE GESTACIÓN



A cada una de las muestras de sangre de cordón de recién nacido se le practicó hematología y electroforesis de hemoglobina. Los valores de Hb y Hto de cordón de recién nacidos a término aparecen en la Tabla N.º IX. La hemoglobina mostró valores de $14,1 \pm 0,07$ g / dl entre las semanas de gestación de 37-41. El hematocrito mostró valores de $42,8 \pm 1,6\%$ durante las mismas semanas de gestación. El volumen corpuscular medio de los eritrocitos mostró macrocitosis

TABLA IX
VALORES HEMATOLÓGICO EN SANGRE DE CORDÓN

Edad gestacional	Hb g/dl	Hto %	VCM fl
37	$13,9 \pm 1,45$	$44,9 \pm 3,67$	$106,7 \pm 6,02$
38	$14,5 \pm 1,40$	45 ± 1	$106 \pm +/- 4$
39	$13,8 \pm 0,93$	$41,7 \pm 2,52$	$106,2 \pm 2,53$
40	$14,6 \pm 2,17$	$44,5 \pm 5,48$	$104,3 \pm 0,57$
41	14,3	46,5	112

El estudio inmunofenotípico con anticuerpos monoclonales realizado en sangre de cordón de recién nacidos a término mostró la presencia de células positivas para CD45 en el $95,8 \pm 2,53\%$ de las células, indicando que estamos en presencia de aproximadamente el 96% de leucocitos en dicha sangre fetal. Se detectaron en la muestra de sangre de cordón $0,86 \pm 0,33\%$ de células CD34.

Así mismo hubo expresión de marcadores de superficie de linfocitos T (CD2: $72,1 \pm 11 \%$), para linfocitos pre-B (CD IO: $0,4 \pm 0,51 \%$), linfocitos B (CD19: $15,7 \pm 3,7 \%$ y 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: $0,54 \pm 0,2\%$) (TablaX).

TABLA X
ESTUDIO INMUNOFENOTÍPICO DE 10 MUESTRAS DE SANGRE DE CORDON

Marcadores celulares	X ± DE
CD 2	72,1 ± 11
CD19	15,70 ± 3,70
CD20	13,90 ± 5,50
CD10	0,40 ± 0,51
CD14	0,54 ± 0,20
CD34	0,86 ± 0,331
CD33	0,83 ± 0,30
CD45	95,8 ± 2,53

Para tratar de diferenciar subtipos de células progenitoras CD34+ se utilizó doble marcaje con los anticuerpos monoclonales CD34 PE/ CD33-FITC y CD34 PE / HLA-Dr-FITC y hubo el marcaje mas alto para las células CD34+ / CD33- de $0,8 \pm 0,5\%$ (Tabla N° XI)

TABLA N° XI
EVALUACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE SUBPOBLACIONES DE CD34+ EN SANGRE DE CORDÓN DE RECIEN NACIDOS

Células CD34+	Porcentaje
CD33-	0,8 ± 0,5
CD33+	0,3 ± 0,1
HLA Dr +	0,4 ± 0,4
HLA Dr-	0,3 ± 0,3

Estudio de los pacientes sometidos a aféresis de células madres y progenitoras

A cada paciente que iba a ser sometido a movilización y recolección de células progenitoras se le practicó una evaluación hematológica pre-movilización (Tabla N° XII). Puede apreciarse que la mayoría de los pacientes presentó pancitopenia pre-movilización, en razón de que habían sido tratados con quimioterapia y radioterapia, según las pautas de tratamiento de la enfermedad maligna de base. Una vez que el paciente estuvo en remisión (con clínica, biopsia, exámenes de sangre e imágenes normales) y sus valores hematológicos estaban en

el rango normal se procedió a la administración de los agentes movilizantes: ciclofosfamida más GM-CSF ó G-CSF.

TABLA XII
HEMATOLOGÍAS DE 8 PTS CON MALIGNIDADES PRE MOVILIZACIÓN

Leucocitos	Plaquetas	Hb	Hto	Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos
5,3	210	9,8	31	38	28	4
4,5	84	9,8	31	57	31	12
10,5	177	11,3	36	34	32	34
14,9	188	9,4	30	30	35	34
3,6	84	10,3	30	52	17	31
2,4	32	12,7	39,4	14,6	40,8	35,3
2,0	10	11,8	35,4	5	51	25
4	14	11,8	35,1	34	24	17

A cada paciente se le practicó una evaluación hematológica diaria post- movilización. En la Tabla No XIII puede apreciarse que la mayoría de los pacientes presentaba pancitopenia post quimioterapia de movilización. En general, todos los pacientes presentaron anemia con valores de Hb de $11,1 \pm 0,9$ g / dl y Hto: $34,8 \pm 2,7$ %; el recuento de leucocitos en sangre fue variable, desde leucopenias de 1.300/ μ l hasta valores de 8.800/ μ l, completamente normales. El recuento diferencial de los leucocitos mostró una monocitosis de $24,7 \pm 13,6$ % con una discreta eosinofilia de $7,5 \pm 4,7$ %.

TABLA No XIII
HEMATOLOGÍAS DE PACIENTES POST MOVILIZACIÓN

Gl. Blancos	Hgb g/dl	Hct %	CP	NEUT	LYMPH %	MONO %	EOS	BAS
1900,0	10,7	33,0	12,0	50,2	25,2	10,9	12,3	1,4
2400,0	12,7	39,0	32,0	14,6	40,6	35,3	8,7	0,6
2000,0	11,8	35,4	10,0	5,0	51,0	25,0		
4000,0	11,8	35,1	14,0	34,0	24,0	17,0		
5300,0	10,0	31,0	20,0	38,0	25,0	28,0		
4500,0	9,8	31,0	84,0	57,0	20,0	12,0		
2000,0	10,0	30,8	288,0	99,0				
1000,0	13,0	39,8	46,0	16,1	51,0	25,9	6,5	0,5
8000,0	11,6	37,7	48,0	81,8	7,3	10,4	0,3	0,2
8800,0	11,2	36,1	51,0	85,2	5,7	7,6	0,7	0,8
5600,0	10,3	35,9	37,0	75,4	0,8	0,5		
6700,0	11,2	35,6	353,0	52,0	41,5	6,5		
4800,0	11,6	37,7	42,0	76,6	7,2	15,3	0,5	0,2
900,0	11,8	37,1	37,0	8,4	14,5	29,4	9,0	38,7
1900,0	10,7	33,2	12,0	50,2	25,2	10,9	12,3	1,4
2500,0	11,3	35,2	14,0	58,9	21,2	9,5	9,9	0,5
2700,0	10,7	33,2	10,0	60,9	16,3	13,5	8,7	0,6
1300,0	11,1	34,9	34,0	6,6	14,8	23,9	12,0	42,7
4000,0	9,3	29,0	143,0	54,0	16,0	20,0		
3100,0	12,6	38,7	286,0	39,5	32,1	26,9	1,4	0,4
1900,0	10,7	33,2	12,0	50,5	25,2	10,9	12,3	
2500,0	11,3	35,2	14,0	58,9	21,2	9,5	9,9	
2700,0	10,7	33,2	10,0	60,9	16,3	13,9		
3000,0	10,7	34,7	31,0	67,1	13,9	178,0		
6000,0	10,4	33,7	40,0	88,2	5,9	53,0		
3580,0±2145,1	11,1±0,9	34,8±2,7	67,2±96,2	51,6±26,4	21,7±13,6	24,7±34,6	7,5±4,7	7,3±15,6

Se procedió a realizar las aféresis de sangre para la recolección de células madres y progenitoras cuando las células CD34+, determinadas por citometría de flujo, comenzaron a aparecer y a aumentar diariamente.

Cuando el paciente presentó un contejo de plaquetas menor de 50.000 / μ l por hipoplasias megacariocíticas secundarias al tratamiento con quimioterapia o radioterapia, o a ambos tratamientos, se le administraron 8 unidades de concentrado plaquetario obtenido por aféresis de un donante del Banco de Sangre antes de comenzar el procedimiento de recolección de células madres y progenitoras con la máquina de aféresis ya que se observó que cada aféresis disminuye el contejo de plaquetas en aproximadamente 15000/ μ l³.

En la Tabla N° XIV puede apreciarse el resultado del estudio inmunofenotípico por citometría de flujo con diferentes anticuerpos dirigidos contra epítomos de las diferentes células sanguíneas de la sangre de pacientes post movilización con ciclofosfamida y factores de crecimiento. La determinación de células CD34+ en dichas muestras de sangre de pacientes postmovilización mostró valores promedios de $2,70 \pm 3,1\%$ y hubo marcaje para leucocitos, linfocitos B y T, linfocitos T cooperadores y citolíticos, monocitos y mielocitos.

TABLA N° XIV
ESTUDIO INMUNOFENOTÍPICO EN 10 MUESTRAS DE SANGRE DE
PACIENTES POSTMOVILIZACIÓN

Marcadores celulares	X \pm DE
CD7	7,41 \pm 15,26
CD2	20,9 \pm 25,60
CD4	38,17 \pm 12,11
CD8	28,30 \pm 25,03
CD19	5,65 \pm 8,95
CD20	1,49 \pm 0,19
CD10	0,70 \pm 0,85
CD13	1,00 \pm 1,48
CD14	31,27 \pm 27,25
CD34	2,70 \pm 3,1
CD33	1,54 \pm 1,80
CD45	88,96 \pm 19,39
HLA-DR	72,67 \pm 32,63

La Fig. N° 28 muestra 3 histogramas obtenidos en el citómetro de flujo. El histograma superior izquierdo muestra parámetros de dispersión de la luz (forward scatter vs side scatter) representado por gran cantidad de puntos negros, que nos indican el total de las

células nucleadas de la muestra de sangre analizada en el citómetro, por lo tanto, se lee que en este histograma la muestra estaba constituida por gran cantidad de células nucleadas. El histograma superior derecho muestra las células nucleadas marcadas por el anticuerpo anti-CD45- FITC (isotiocianato de fluoresceína), que nos indica que la muestra estaba constituida principalmente por leucocitos. El histograma inferior muestra las células marcadas con el anticuerpo CD34 PE (ficoeritrina). Puede apreciarse que a pesar de que el recuento de leucocitos de la muestra de sangre de este paciente era 17.400/ μ l no hubo marcaje con el anticuerpo anti-CD34 PE para células CD34, las cuales aparecen remarcadas en el cuadrante inferior derecho de este histograma. No había ocurrido todavía movilización de células madres y progenitoras CD34+ hacia la sangre en este paciente. Las Fig. N° 29 a 32 muestran como las células CD34+ van en incremento en el cuadrante inferior derecho del histograma inferior SSC-height vs CD34 PE, que como ya dijimos marca las células CD34+. El recuento de células madres y progenitoras varió de acuerdo al paciente desde 0,03 a 0, 12% y puede apreciarse como el número de puntos del cuadrante inferior derecho del histograma inferior SSC-height vs CD34 PE fué en aumento progresivo desde la Fig. N° 29 a la 32, con recuentos de leucocitos de 6.850 / μ l, 4.100 / μ l, 30.200 / μ l, 38.900 / μ L

FIGURA N° 28
ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO POR CITOMETRÍA DE FLUJO
DE CÉLULAS CD34+ EN SANGRE (POST CTX + G-CSF)

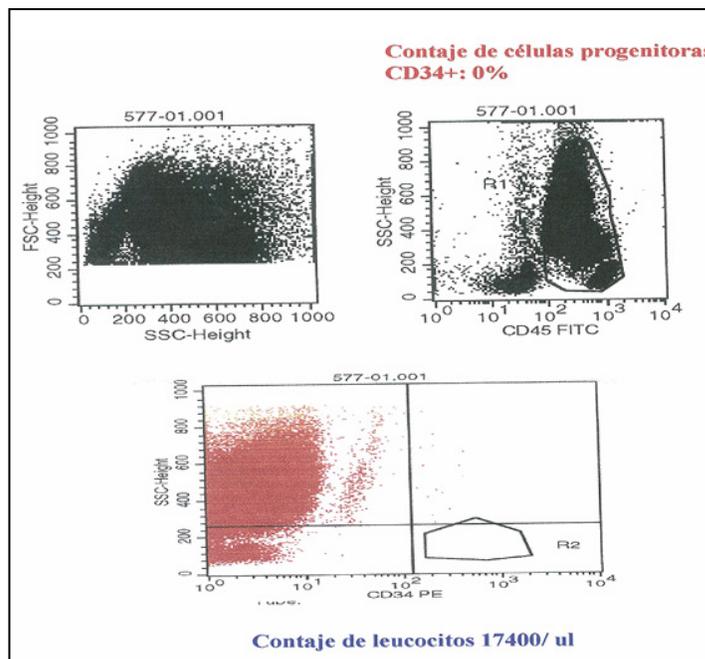


FIGURA N° 29
ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO
DE CÉLULAS CD34+ EN SANGRE (POST CTX + G-CSF)

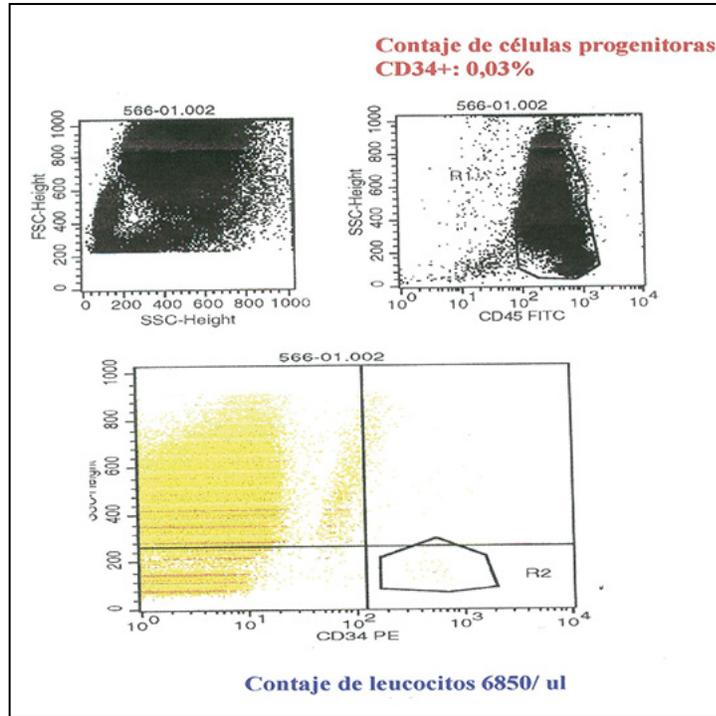


FIGURA N° 30
ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO
DE CÉLULAS CD34+ EN SANGRE (POST CTX + G-CSF)

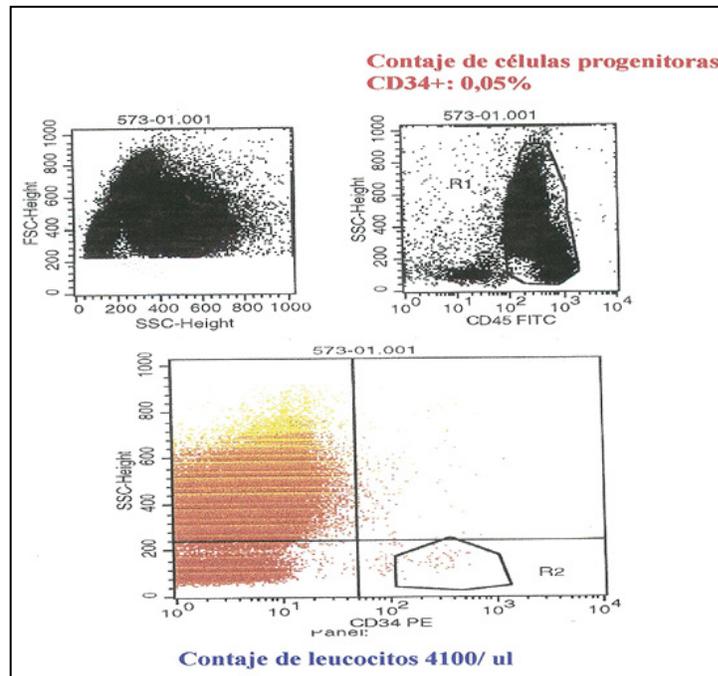


FIGURA N° 31
ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO
DE CÉLULAS CD34+ EN SANGRE (POST G-CSF)

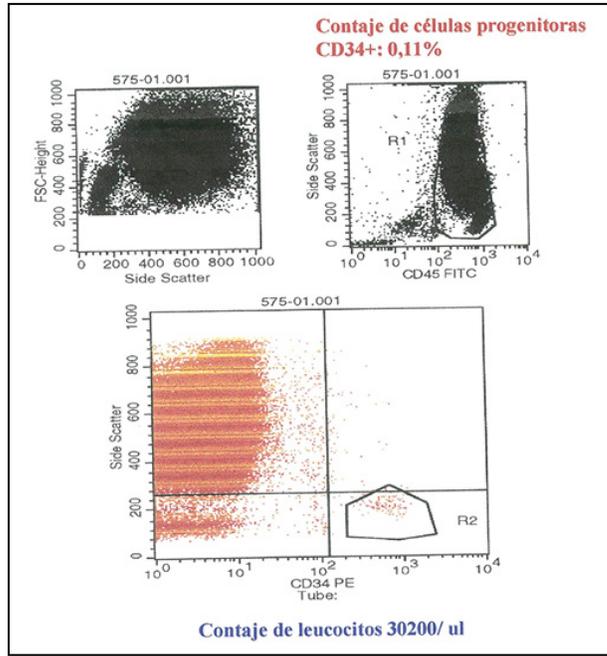
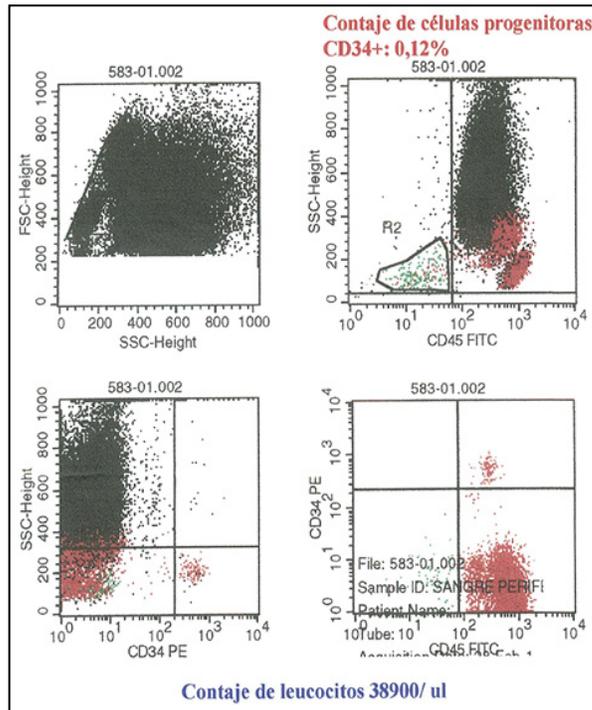


FIGURA N° 32
ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO
DE CÉLULAS CD34+ EN SANGRE (POST G-CSF)



Se realizaron 10 estudios inmunofenotípicos completos a las muestras de sangres periféricas de los pacientes con enfermedades malignas postmovilización con ciclofosfamida y factores estimulantes de las colonias de granulocitos o granulocitos y macrófagos. Se observó un aumento del porcentaje de células marcadas con anti-CD 14, que caracteriza las células de estirpe monocítica, cuando se compararon con porcentaje de células marcadas con anti-CD14 en células de sangre periférica de donantes voluntarios del Banco de Sangre, (Tabla XIV).

El porcentaje de células CD34+ obtenidas en sangre post movilización con G-CSF comparadas con el recuento de leucocitos en sangre periférica según el día de movilización de la paciente CET (con diagnóstico de LMA en remisión completa) aparece en la tabla XV. Puede apreciarse en este caso que la paciente presentó una leucocitosis severa el 4° día de movilización (20.600 / μ l) que aumentó el 7° día (58.500 / μ l) y el contaje de células CD34+ se incrementó de 0,03% a 0,200/o para luego disminuir a 0,012% (Tabla XV).

TABLA N° XV
PORCENTAJ DE CÉLULAS CD34+ EN SANGRE
POSTMOVILIZACIÓN CON G-CSF

Día recolección y % células CD34	Contaje de leucocitos (10³ x μl) promedios
Día 2: 0,03	6850
Día 3: 0,05	4100
Día 4: 0,06	20600
Día 5: 0,11	30200
Día 6: 0,20	47400
Día 7: 0,012	58500

Se realizó el análisis hematológico a cada uno de los productos obtenidos de la aféresis de cada recolección y puede apreciarse el aumento de la concentración de leucocitos hasta 787.000 / μ l y de las plaquetas hasta 5.620.000 / μ l, mientras que la concentración de Hb y Hto de dicho producto disminuyó (Tablas N° XVI a XX). 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. En la Tabla N° XXI se observa los valores hematológicos pre y post movilización con G-CSF en donantes.

TABLA XVI A LA XIX
VALORES HEMATOLÓGICOS EN LOS PRODUCTOS DE AFÉRESIS

Ptes	Leucocitos x 10³/ul	Plaquetas x 10³/ul	Hb g/dl	Hto %
1	179	670	4,0	16
2	207	5620	7,0	27
3	175	1130	7,0	27
4	617	2460	9,0	40
5	787	1910	9,0	40
6	254	2260	1,0	37
7	287	400	5,8	16
8	177	257	3,7	10
9	127	113	3,4	9,2
10	209	2010	9,0	39
11	159,9	1219	7,8	29
12	152	1670	5,0	25
13	250	1550	4,0	16
14	630	2010	4,5	16
15	315,8	4744	7,2	30
16	311	1020	7,0	34
17	153	1730	6,0	27
18	254	2260	10,0	37
19	162	1722	5,0	17
20	96,2	1722	4,0	12
21	253	2910	12,0	38
22	318	1460	11,5	35,6
23	283	3710	4,0	12
24	280	3880	4,0	11
25	107	5000	2,0	4
26	121	734	2,1	7,9
27	138	1194	3,0	9,6
28	121	1700	4,0	12
29	91	986	2,6	8,3
30	122,8	1138	2,0	77
31	283	3710	4,0	12
32	362	3880	4,0	11
33	174	1700	2,0	4
34	155	167	5,0	25
35	209	201	9,0	39
36	150	6700	4,0	16
37	179	5340	4,2	16,5
38	145	5010	4,0	16
39	360	3710	4,0	12
40	155	167	5,0	25

TABLA N° XX
VALORES HEMATOLÓGICOS DE LOS PRODUCTOS DE AFÉRESIS

Hb (gdl)	6,00 ± 2,6
Hto (%)	24,00 ± 10,8
Eritrocitos (10³/mm³)	2,62 ± 1.51
Plaquetas (10³/mm³)	2579 ± 2640
Leucocitos (10³/mm³)	168,9 ± 23,9
VCM (fl)	95,88 ± 8,8
HCM (pg)	37,28 ± 2,6
CHCM (g/dl)	26,55 ± 4,52

TABLA No XXI
VALORES HEMATOLÓGICOS PRE Y POST RECOLECCIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS EN 6 DONANTES MOVILIZADOS CON G-CSF

	PRE	POST
Contaje de leucocitos (10³ x ul)	42,5 ± 15	35 ± 12,4
Neutrófilos (10³ x ul)	35 ± 14,1	30 ± 10,5
Mononucleares (10³ x ul)	7,7 ± 2,5	5 ± 1,9
Hematocritos (%)	40,5 ± 2,8	38,8 ± 3.1
Contaje de plaquetas (10³ x ul)	255 ± 58	175 ± 35
Contaje de eritrocitos (10³ x ul)	4,6 ± 0,4	4,5 ± 0,4
CD34+ (10⁶/l)	108 ± 115	60,6 ± 63

En las Fig. N° 33 a 37 se muestran histogramas de citometría de flujo de las cosechas de los productos de aféresis de diferentes pacientes en los cuales podemos apreciar un aumento de las células CD34 + desde 0,58% a 1,48% en los productos de la cosecha de aféresis. En todos los casos se realizaron recuento de células vivas con azul tripano del producto de aféresis antes de realizar el estudio de citometría de flujo y puede apreciarse que la viabilidad era de 78 a 97%; esto dependió de si la muestra del

producto de analizó en fresco de inmediato o a las 24 horas en la muestra dejada a temperatura ambiente, en los casos en los cuales la recolección de células progenitoras se realizó en la tarde.

FIGURA N° 33
ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE CÉLULAS CD34+
EN EL PRODUCTO DE AFÉRESIS

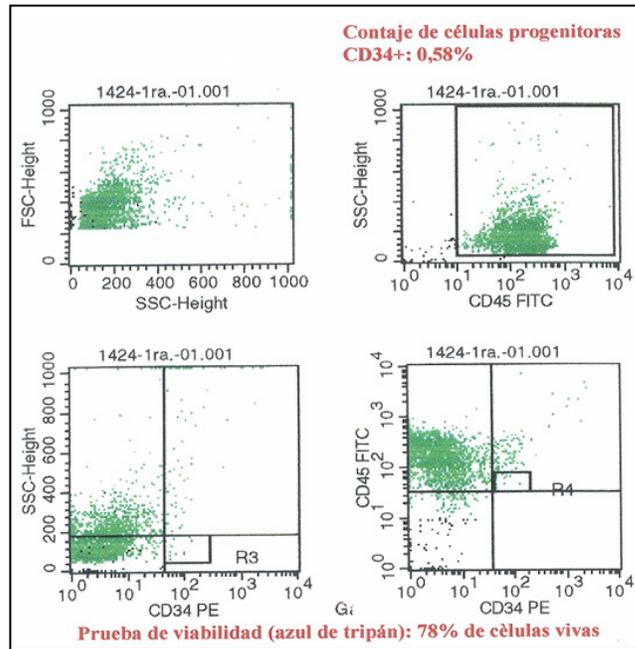


FIGURA N° 34
ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE CÉLULAS CD34+
EN EL PRODUCTO DE AFÉRESIS

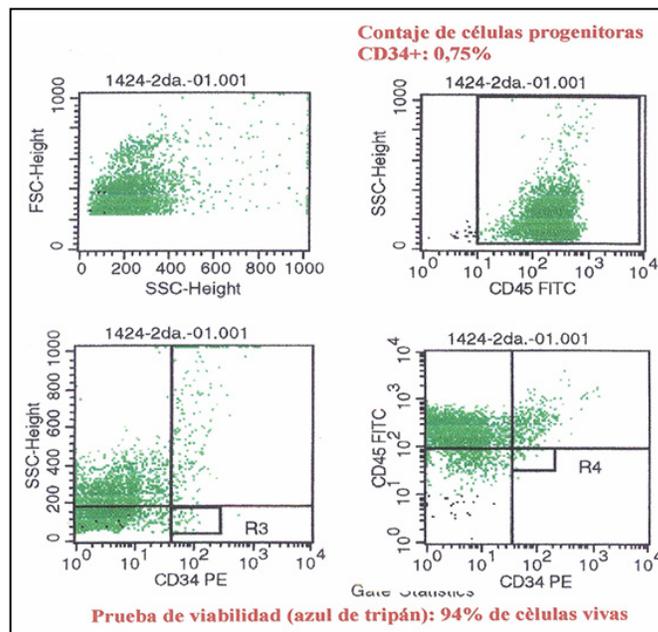


FIGURA N° 35
ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE CÉLULAS CD34+
EN EL PRODUCTO DE AFÉRESIS

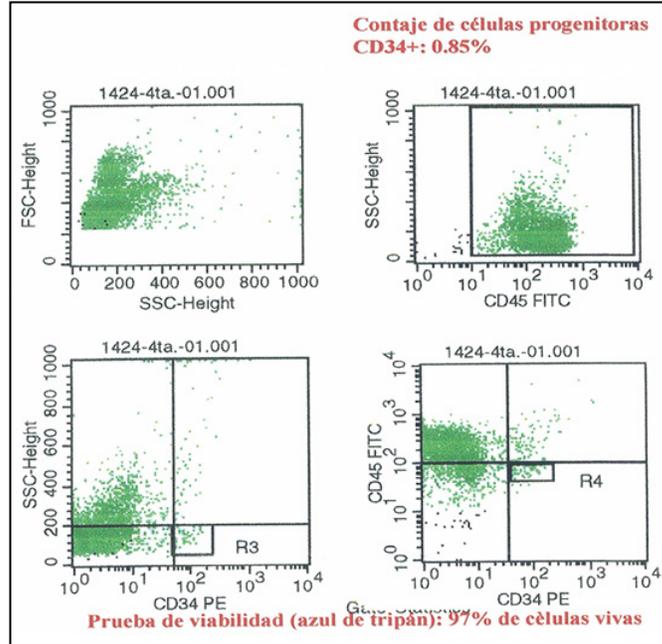


FIGURA N° 36
ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE CÉLULAS CD34+
EN EL PRODUCTO DE AFÉRESIS

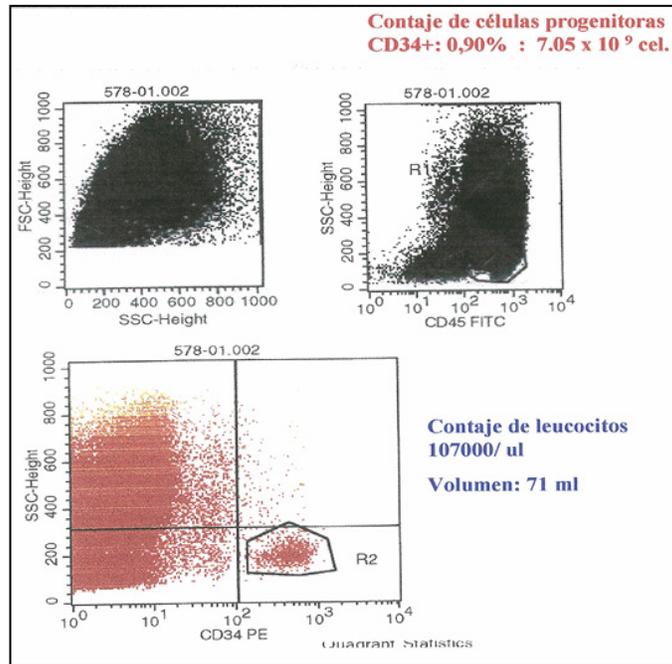
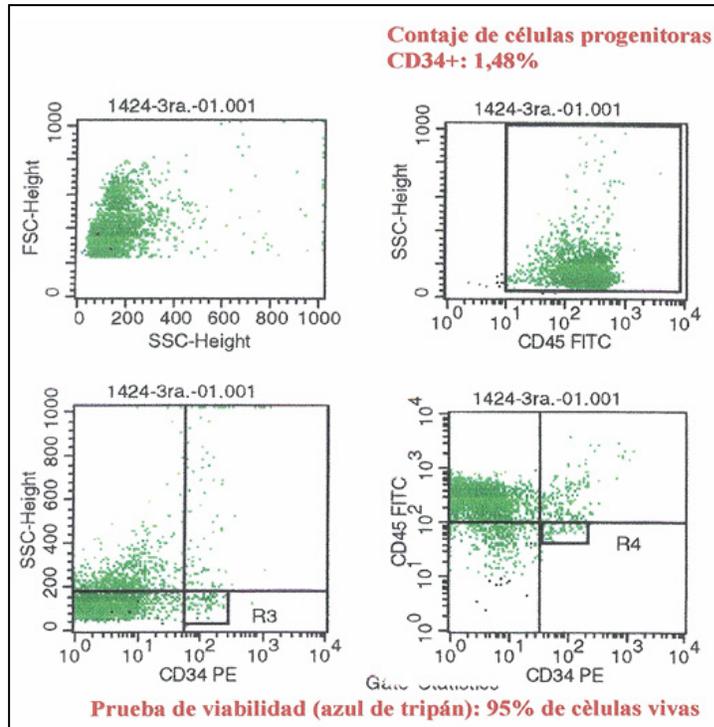


FIGURA N° 37
ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE CÉLULAS CD34+
EN EL PRODUCTO DE AFÉRESIS



Las Fig. N^{os} 33 a 35 y 37 muestran 4 histogramas obtenidos en el citómetro de flujo de muestras de productos de aféresis de células madres y progenitoras. El histograma superior izquierdo muestra parámetros de dispersión de la luz (forward scatter vs side scatter) representado por gran cantidad de puntos verdes, que nos indican el total de las células nucleadas de la muestra de sangre analizada en el citómetro. El histograma superior derecho muestra las células nucleadas marcadas por el anticuerpo anti-CD45, que nos indica que la muestra estaba constituida principalmente por leucocitos. El histograma inferior izquierdo SSC-height vs CD34 PE muestra las células marcadas con el anticuerpo CD34PE. El histograma inferior derecho muestra las células marcadas simultáneamente con los anticuerpos anti-CD34 PE y anti- CD45 FITC, lo que indica coexpresión de moléculas CD34 y CD45. Las Fig. N^{os} 33 a 35 y 37 muestran como las células CD34+, que aparecen remarcadas en un recuadro, van en incremento en el cuadrante inferior derecho del histograma inferior SSC-height vs CD34 PE, que como ya dijimos marca las células madres y progenitoras CD34+.

Puede apreciarse como el número de puntos verdes del cuadrante inferior derecho del histograma inferior derecho muestra las células marcadas doblemente con los anticuerpos anti-CD34 PE y anti- CD45 FITC coexpresando antígeno CD34 y el CD45.

La Fig. N° 36 muestra 3 histogramas ampliados donde puede apreciarse que las células CD34+ de ese producto de aféresis aparecen como gran cantidad de puntos naranja remarcadas dentro del cuadrante inferior derecho del histograma inferior derecho SSC-height vs CD34 PE, cuyo conteo de células era 107.000/ μ l.

El análisis inmunofenotípico de los productos de aféresis mostraron como hubo aumento del % de células CD34 + en los productos de la cosecha de aféresis en relación a lo obtenido en sangre periférica en la mayoría de los casos (Tabla N° XXII)

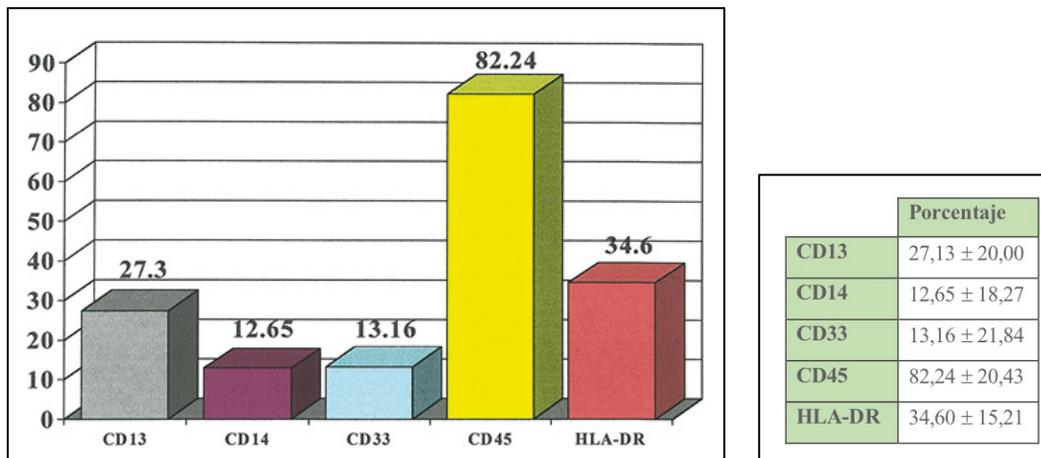
TABLA No XXII
PORCENTAJE DE CÉLULAS CD34+ EN SANGRE
POSTMOVILIZACION Y EN LOS PRODUCTO DE AFÉRESIS

N°	% CD34 EN SANGRE	% CD34+ EN LOS PRODUCTOS
1	0,7	2
2	0,5	0,5
3	4	3,1
4	0,1	0,1
5	4	3,1
6	2	2,8
7	0,9	1,7
8	0,5	2
9	0,3	0,7
10	0,76	2,8
11	1,20	1,9
12	0,50	0,32
13	3,2	0,90
14	0,76	2,8
15	0,30	0,5
16	2	6,33
17	2	3,2
18	1,8	0,3
19	3,2	5,1

La Fig. 38, 39, y 40 se aprecia que las células recolectadas en los productos de aféresis mostraron marcaje para antígenos de superficie de leucocitos con los anticuerpos anti-HLA-Dr y anti-CD45.

La Fig. N° 38 muestra que dichas células recolectadas en los productos de aféresis presentaron marcaje para antígenos de superficie mieloides con los anticuerpos anti CD33, para antígenos de superficie de monocitos con los anticuerpos anti-CD13 y anti-CD14.

FIGURA N° 38
EXPRESIÓN DE MARCADORES MIELOIDES
EN CÉLULAS DE PRODUCTOS DE AFÉRESIS



La Fig. N° 39 muestra que las células de los productos de aféresis mostraron marcaje para antígenos de su superficie celular con los anticuerpos anti- CD19, anti- CD20, anti- CD 10 que reconocen linfocitos **B** aunque el % de células que marcaron con dichos anticuerpos fueron escasas y la Fig. N° 40 muestra que las células obtenidas por aféresis mostraron marcaje para sus antígenos de superficie con los anticuerpos anti- CD2, anti-CD7 que reconocen linfocitos T, con los anticuerpos anti-CD4 que reconocen linfocitos T cooperadores y con anticuerpos anti CD8 que reconocen linfocitos T supresores.

FIGURA N° 39
EXPRESIÓN DE MARCADORES DE LINFOCITOS B
EN CÉLULAS DE PRODUCTORES DE AFÉRESIS

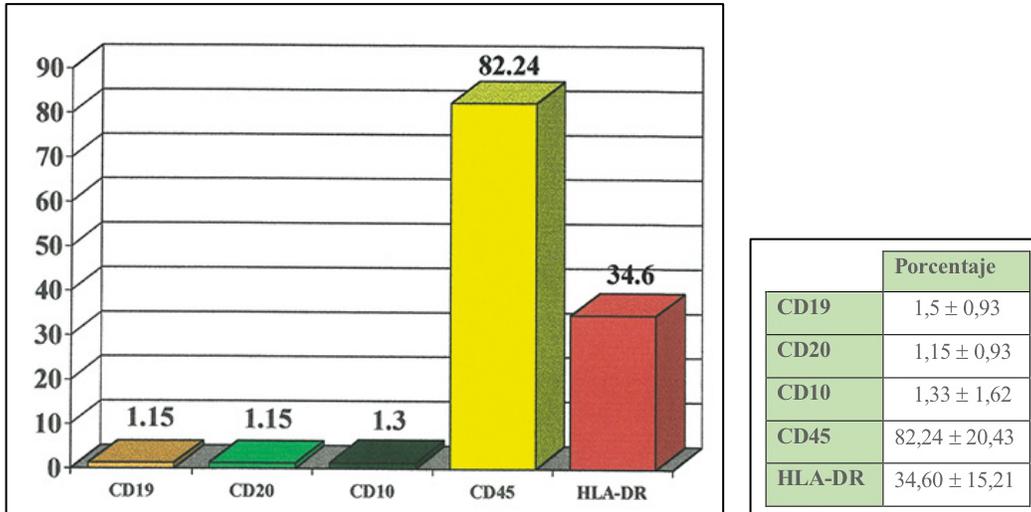
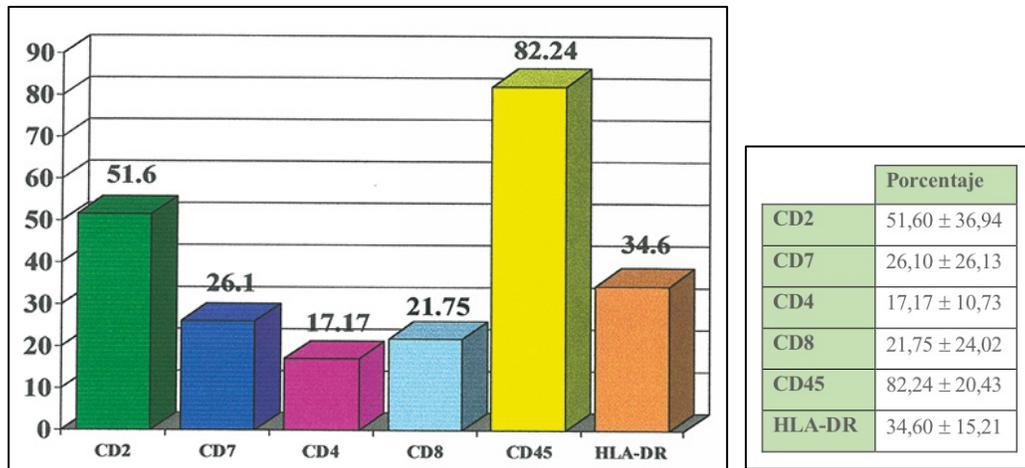


FIGURA 40
EXPRESIÓN DE MARCADORES DE LINFOCITOS T EN CÉLULAS DE
PRODUCTOS DE AFÉRESIS



La Tabla N° XXIII muestra en % el estudio inmunofenotípico, realizado a los productos de aféresis.

TABLA N° XXIII
ANÁLISIS INMUNODEFOTÍPICO DE LOS PRODUCTOS DE AFÉRESIS

Marcadores	Porcentajes
CD45	82,24 ± 20,23
HLA-DR	34,60 ± 15,21
CD2	51,60 ± 36,94
CD7	26,10 ± 26,13
CD4	17,17 ± 10,73
CD8	21,75 ± 24,02
CD10	1,33 ± 1,62
CD19	1,15 ± 0,93
CD20	1,15 ± 0,93
CD13	27,13 ± 20,00
CD14	12,65 ± 18,27
CD33	13,16 ± 21,84
CD34	1,26 ± 0,88

Las Fig N^{os} 41 a 43 muestran las fotos de los frotis de productos de aféresis obtenidos en este estudio y coloreados con el colorante Wright donde puede apreciarse que las células cosechadas por aféresis en su mayoría aparecen como de núcleo grande con múltiples nucleólos y citoplasma basofílico escaso, con características de blastos y otras células de apariencia inmadura, pero con granulaciones en el citoplasma probablemente de estirpe mieloide.

FIGURA N° 41
CÉLULAS MADRES HEMATOPOYÉTICAS CD34+
OBTENIDAS POR AFÉRESIS

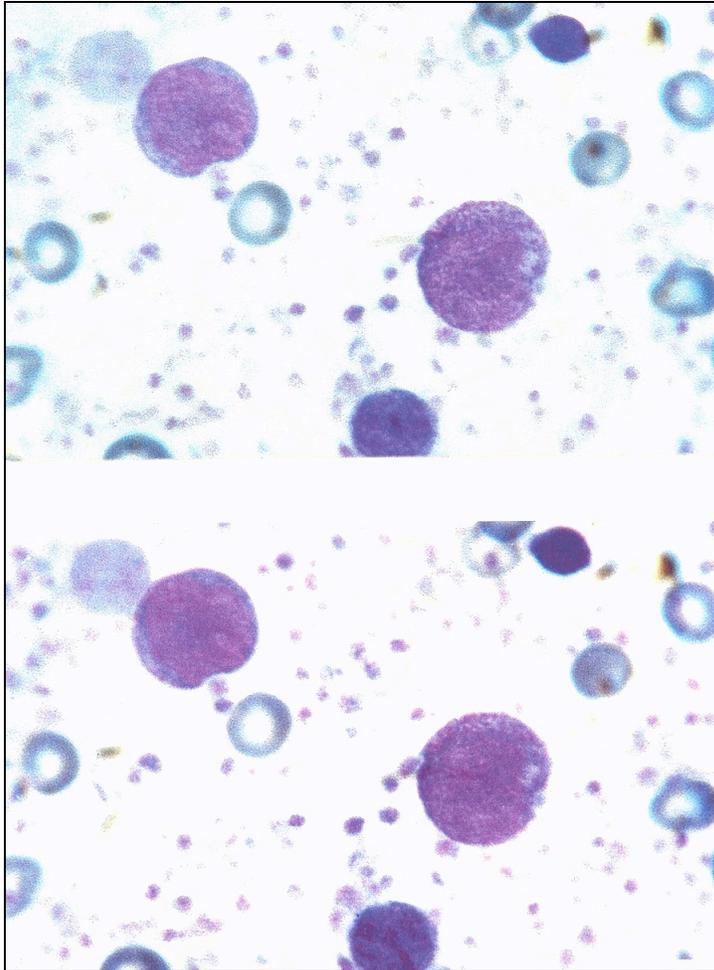


FIGURA N° 42
CÉLULAS MADRES HEMATOPOYÉTICAS CD34+
OBTENIDAS POR AFÉRESIS

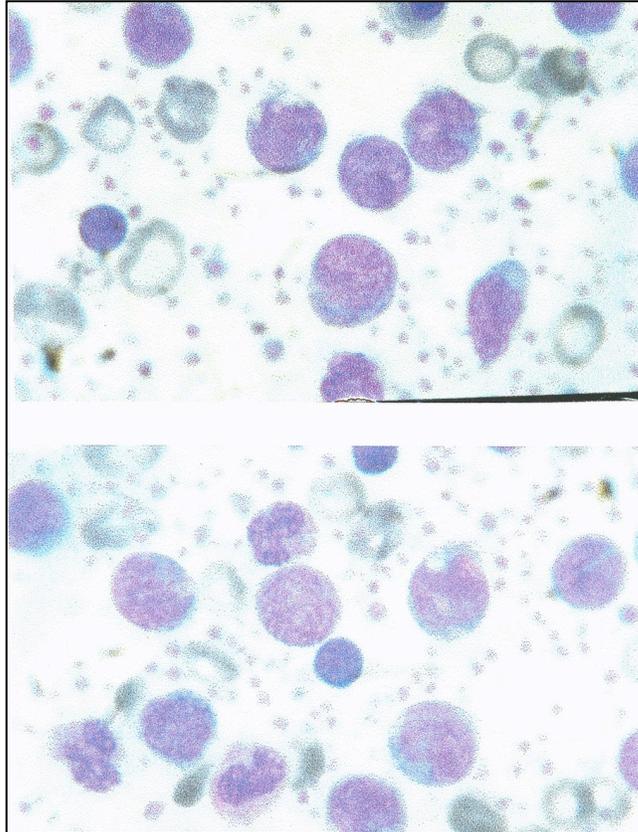
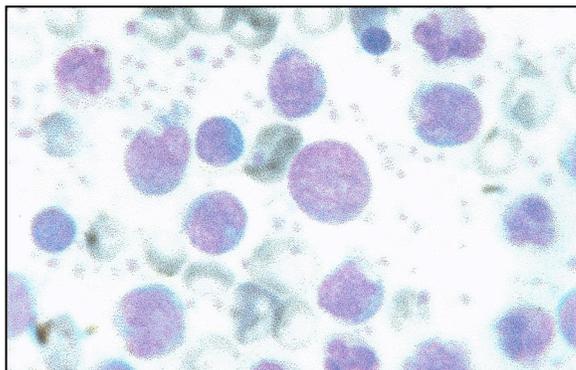


FIGURA N° 43
CÉLULAS MADRES HEMATOPOYÉTICAS CD34+
OBTENIDAS POR AFÉRESIS



Se hizo recuento del número de células recolectadas en 30 productos de aféresis post movilización pertenecientes a pacientes con las diferentes patologías malignas, el cual en promedio fue de $2,32 \pm 1,62 \times 10^5$ (Tabla N° XXIV). El volumen promedio de células

recolectadas en esos productos de aféresis fue de $1,25 \pm 0,8 \times 10^{10}$ (Tabla N° XXV). El volumen promedio total de células recolectadas por Kg de peso corporal en los productos de aféresis fue de $1,75 \pm 1,25 \times 10^8$ (Tabla N° XXVI).

TABLA N° XXIV
N° DE CÉLULAS RECOLECTADAS EN LOS PRODUCTOS DE AFÉRESIS

MIELOMA MÚLTIPLE	1,58 x 10 ⁵ 0,68 x 10 ⁵ 2,15 x 10 ⁵
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	1,00 x 10 ⁵ 3,44 x 10 ⁵ 1,80 x 10 ⁵ 2,83 x 10 ⁵
LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA	1,38 x 10 ⁵ 0,77 x 10 ⁵ 1,33 x 10 ⁵
CÁNCER DE MAMA	1,50 x 10 ⁵ 2,50 x 10 ⁵ 1,53 x 10 ⁵ 2,07 x 10 ⁵
CÁNCER DE MAMA	6,30 x 10 ⁵
LINFOMA NO HODGKIN	1,98 x 10 ⁵ 1,73 x 10 ⁵ 7,80 x 10 ⁵ 6,10 x 10 ⁵
LINFOMA NO HODGKIN	3,20 x 10 ⁵
LINFOMA NO HODGKIN	3,10 x 10 ⁵ 3,00 x 10 ⁵
LINFOMA NO HODGKIN	2,47 x 10 ⁵ 1,98 x 10 ⁵
LINFOMA NO HODGKIN	2,84 x 10 ⁵ 1,74 x 10 ⁵ 1,26 x 10 ⁵ 1,72 x 10 ⁵
LINFOMA NO HODGKIN	1,21 x 10 ⁵ 1,38 x 10 ⁵ 1,21 x 10 ⁵ 0,91 x 10 ⁵ 1,23 x 10 ⁵
TOTAL	2,32 ± 1,6 x 10⁵

TABLA N° XXV
VOLUMEN DE CÉLULAS RECOLECTADAS EN LOS PRODUCTOS DE
AFÉRESIS

MIELOMA MÚLTIPLE	0,79 x 10 ¹⁰ 0,34 x 10 ¹⁰ 1,08 x 10 ¹⁰
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	0,71 x 10 ¹⁰ 1,03 x 10 ¹⁰ 0,91 x 10 ¹⁰ 1,90 x 10 ¹⁰
LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA	0,69 x 10 ¹⁰ 0,38 x 10 ¹⁰ 0,67 x 10 ¹⁰
CÁNCER DE MAMA	0,75 x 10 ¹⁰ 1,25 x 10 ¹⁰ 0,76 x 10 ¹⁰ 1,04 x 10 ¹⁰
CÁNCER DE MAMA	3,10 x 10 ¹⁰
LINFOMA NO HODGKIN	0,99 x 10 ¹⁰ 0,87 x 10 ¹⁰ 3,90 x 10 ¹⁰ 3,10 x 10 ¹⁰
LINFOMA NO HODGKIN	1,60 x 10 ¹⁰
LINFOMA NO HODGKIN	1,60 x 10 ¹⁰ 1,50 x 10 ¹⁰
LINFOMA NO HODGKIN	1,25 x 10 ¹⁰ 0,99 x 10 ¹⁰
LINFOMA NO HODGKIN	1,42 x 10 ¹⁰ 0,87 x 10 ¹⁰ 0,63 x 10 ¹⁰ 0,86 x 10 ¹⁰
LINFOMA NO HODGKIN	1,20 x 10 ¹⁰ 1,30 x 10 ¹⁰
TOTAL	1,25 ± 0,81 x 10¹⁰

TABLA N° XXVI
VOLUMEN TOTAL DE CÉLULAS RECOLECTADAS
POR KGS. EN LOS PRODUCTOS DE AFÉRESIS

MIELOMA MÚLTIPLE	1,10 x 10 ⁸ 0,48 x 10 ⁸ 1,40 x 10 ⁸
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	0,88 x 10 ⁸ 1,30 x 10 ⁸ 1,10 x 10 ⁸ 2,30 x 10 ⁸
LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA	1,20 x 10 ⁸ 0,60 x 10 ⁸ 1,20 x 10 ⁸
CÁNCER DE MAMA	1,70 x 10 ⁸ 1,60 x 10 ⁸ 1,00 x 10 ⁸ 1,40 x 10 ⁸
CÁNCER DE MAMA	4,80 x 10 ⁸
LINFOMA NO HODGKIN	1,50 x 10 ⁸ 1,33 x 10 ⁸ 6,00 x 10 ⁸ 4,70 x 10 ⁸
LINFOMA NO HODGKIN	1,80 x 10 ⁸
LINFOMA NO HODGKIN	1,80 x 10 ⁸ 1,50 x 10 ⁸
LINFOMA NO HODGKIN	2,20 x 10 ⁸ 1,80 x 10 ⁸
LINFOMA NO HODGKIN	2,00 x 10 ⁸ 1,20 x 10 ⁸ 0,90 x 10 ⁸ 1,20 x 10 ⁸
LINFOMA NO HODGKIN	1,20 x 10 ⁸ 1,30 x 10 ⁸
TOTAL	1,75 ± 1,25 x 10⁸

El total de células CD34+ I Kg de peso corporal del paciente recolectadas en los 30 productos de aféresis fue de $2,25 \pm 2,57 \times 10^6$ (Tabla N° XXVII).

TABLA N° XXVII
TOTAL DE CÉLULAS CD34+ / Kg. RECOLECTADAS
EN LOS PRODUCTOS DE AFÉRESIS

MIELOMA MÚLTIPLE	0,99 x 10 ⁶ 0,34 x 10 ⁶ 0,42 x 10 ⁶
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	0,51 x 10 ⁶ 0,98 x 10 ⁶ 1,63 x 10 ⁶ 1,96 x 10 ⁶
LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA	6,20 x 10 ⁶ 1,51 x 10 ⁶ 2,29 x 10 ⁶
CÁNCER DE MAMA	3,23 x 10 ⁶ 5,44 x 10 ⁶ 3,10 x 10 ⁶ 4,34 x 10 ⁶
CÁNCER DE MAMA	0,50 x 10 ⁶
LINFOMA NO HODGKIN	0,15 x 10 ⁶ 0,13 x 10 ⁶ 12,00 x 10 ⁶ 2,35 x 10 ⁶
LINFOMA NO HODGKIN	3,60 x 10 ⁶
LINFOMA NO HODGKIN	1,30 x 10 ⁶ 2,25 x 10 ⁶
LINFOMA NO HODGKIN	1,54 x 10 ⁶ 3,60 x 10 ⁶
LINFOMA NO HODGKIN	0,26 x 10 ⁶ 0,20 x 10 ⁶ 0,04 x 10 ⁶
TOTAL	2,25 ± 2,57 x 10⁶

La Tabla XXVIII muestra un resumen de los promedios del número de células mononucleares y CD34+ obtenidos en los productos de aféresis para recolectar las células madres y progenitoras.

TABLA N° XXVIII
NÚMERO DE CÉLULAS MONONUCLEARES Y CD34+/Kg.
EN LOS PRODUCTOS DE AFÉRESIS

N° total CMN en los productos de aféresis	$2,32 \pm 1,6 \times 10^5$
Volumen total CMN colectadas	$1,25 \pm 0,81 \times 10^{10}$
Volumen total CMN/Kg.	$1,75 \pm 1,25 \times 10^8$
CD34+ /Kg.	$2,25 \pm 2,57 \times 10^6$

Se comparó % de células CD34+ en sangre periférica de 3 pacientes postmovilización con ciclofosfamida y G-CSF y prerrecolección de cada uno de los productos observamos que el promedio de células CD34+ en sangre periférica fue mas o menos estable, sin embargo, disminuyó entre el tercero al cuarto producto desde un promedio de 1,40 a 0,40%. La cantidad de células CD34+ de los productos de aféresis se mantuvo constante desde la primera recolección a la cuarta recolección (Tabla N° XXIX).

TABLA N° XXIX
% DE CÉLULAS CD34+ EN SANGRE
DE PACIENTES Y EN SUS PRODUCTOS

	1er. Producto	2do. Producto	3er. Producto	4to. Producto	TOTAL CD34
Sangre periférica promedio	$1,24 \pm 1,03$	$1,79 \pm 2,45$	$1,40 \pm 1,87$	$0,40 \pm 0,42$	$1,21 \pm 0,59$
Producto Promedio	$1,85 \pm 2,10$	$1,71 \pm 1,07$	$1,43 \pm 1,13$	$1,49 \pm 1,15$	$1,62 \pm 0,19$

En la tabla XXX se observa el resultado de la cosecha de células progenitoras de acuerdo al factor estimulante utilizado en 8 pacientes en este estudio. Puede observarse que el numero de células mononucleares por kilogramo de peso cosechadas fue similar en los productos de pacientes movilizados con ciclofosfamida más GM-CSF vs. movilizados con ciclofosfamida más G-CSF mientras que el número de células CD34+ por Kg. de peso cosechadas fue mayor y estadísticamente significantes cuando se comparó con el numero de células CD34+ por Kg. de peso cosechadas de pacientes movilizados con G-CSF.

TABLA N° XXX
RESULTADOS DE LAS COSECHAS DE CÉLULAS PROGENITORAS
DE ACUERDO AL TIPO DE FACTOR ESTIMULANTE
UTILIZADO EN 8 PACIENTES

❖ Movilización con CTX + GM-CSF
<ul style="list-style-type: none"> ▪ No fêresis: 15 (5 pacientes) Requerimientos ▪ CMN /Kg: $5,4 \pm 0,4 \times 10^8$ (3×10^8) ▪ CD34+ /Kg.: $6,8 \pm 1,4 \times 10^6$ ($2-4 \times 10^6$)
❖ Movilización con CTX + G-CSK
<ul style="list-style-type: none"> ▪ N° fêresis: 9 (3 pacientes) ▪ CMN / Kg.: $5,5 \pm 0,3 \times 10^8$ ▪ CD34 7 Kg.: $14,7 \pm 3,5 \times 10^6$

En este estudio una vez obtenidas las células progenitoras se congelaron; en la Tabla N° XXXI aparece el total de células mononucleares y células CD34+ autólogas reinfundidas a cada paciente. Puede apreciarse que el número de dichas células reinfundidas varió ampliamente de acuerdo al paciente, y tipo de malignidad. El número de células mononucleares autólogas reinfundidas a los 3 pacientes con carcinoma ductal infiltrante de mama osciló entre 1,8 a $6,6 \times 10^8$ / Kg. Las células CD34+ autólogas reinfundidas a los pacientes con carcinoma de mama varió de 3,6 a $14,70 \times 10^6$ / Kg.

TABLA No XXXI
TOTAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES Y CD34+
AUTÓLOGAS REINFUNDIDAS A CADA PACIENTE

Pacientes	Diagnósticos	Edad	CMN x 10^8 /Kg	CD34+ x 10^6 /Kg
M.G	Ca mama	44	1,80	3,60
N.V	Ca mama	40	6,60	4,10
G.G	Ca mama	45	5,10	14,70
J.I,M	LNH	47	3,60	4,60
G.S	LNH	50	5,52	8,10
G.L	LNH	46	16,00	14,60

* Ca = Carcinoma

** LNH = Linfoma No Hodgkin

La Tabla N° XXXII muestra el estudio inmunofenotípico realizado en sangre periférica en 2 pacientes 4 meses post-trasplante autólogo, se observa que el porcentaje de linfocitos totales que marcaron con CD2 y CD7 fueron normales, mientras que hubo una disminución muy

marcada de porcentaje de linfocitos CD4, que disminuyeron al 0,4% (VN: $27,5 \pm 17,0$) y de porcentaje de linfocitos CDS que cayeron a 0,3% (VN: $23,9 \pm 17,0$), así mismo se observó una disminución del porcentaje de células CD13 a 1,1% (VN: $10,2 \pm 14,8$).

TABLA N° XXXII
ESTUDIO INMUNOFENOTÍPICO DE SANGRE
DE 1 PACIENTE 4 MESES POST TRANSPLANTE ALOGÉNICO

	Pacientes %	Valores normales %
CD45	97	$79,9 \pm 25,3$
HLA-DR	40,2	$22,6 \pm 22$
CD2	83,5	$57,7 \pm 30,3$
CD7	67	$66,2 \pm 25,4$
CD4	0,4	$27,5 \pm 17$
CD8	0,3	$23,9 \pm 17$
CD10	0,2	$3,63 \pm 8,43$
CD19	4,2	$15 \pm 11,7$
CD20	2,5	$11,1 \pm 9,1$
CD33	13,2	$6,3 \pm 6,14$
CD13	1,1	$10,2 \pm 14,8$
CD14	4,9	$3,84 \pm 6,3$
CD34	0,6	

En este estudio se cuantificó el porcentaje de células CD34+ en medula ósea y sangre periférica de pacientes con leucemias linfoides agudas B, leucemias linfoides T y leucemias linfoides crónicas B. se puede observar en la Tabla N° XXXIII que las células linfoides agudas B se caracterizaron por un aumento de células CD10 y CD19 así mismo un aumento marcado de las células CD34+ identificándose hasta $90 \pm 2\%$ en medula ósea. En las células de las leucemias agudas T, el porcentaje de CD34+ fue menor. Estas leucemias se caracterizaron por porcentajes elevados de CD2 y CD7.

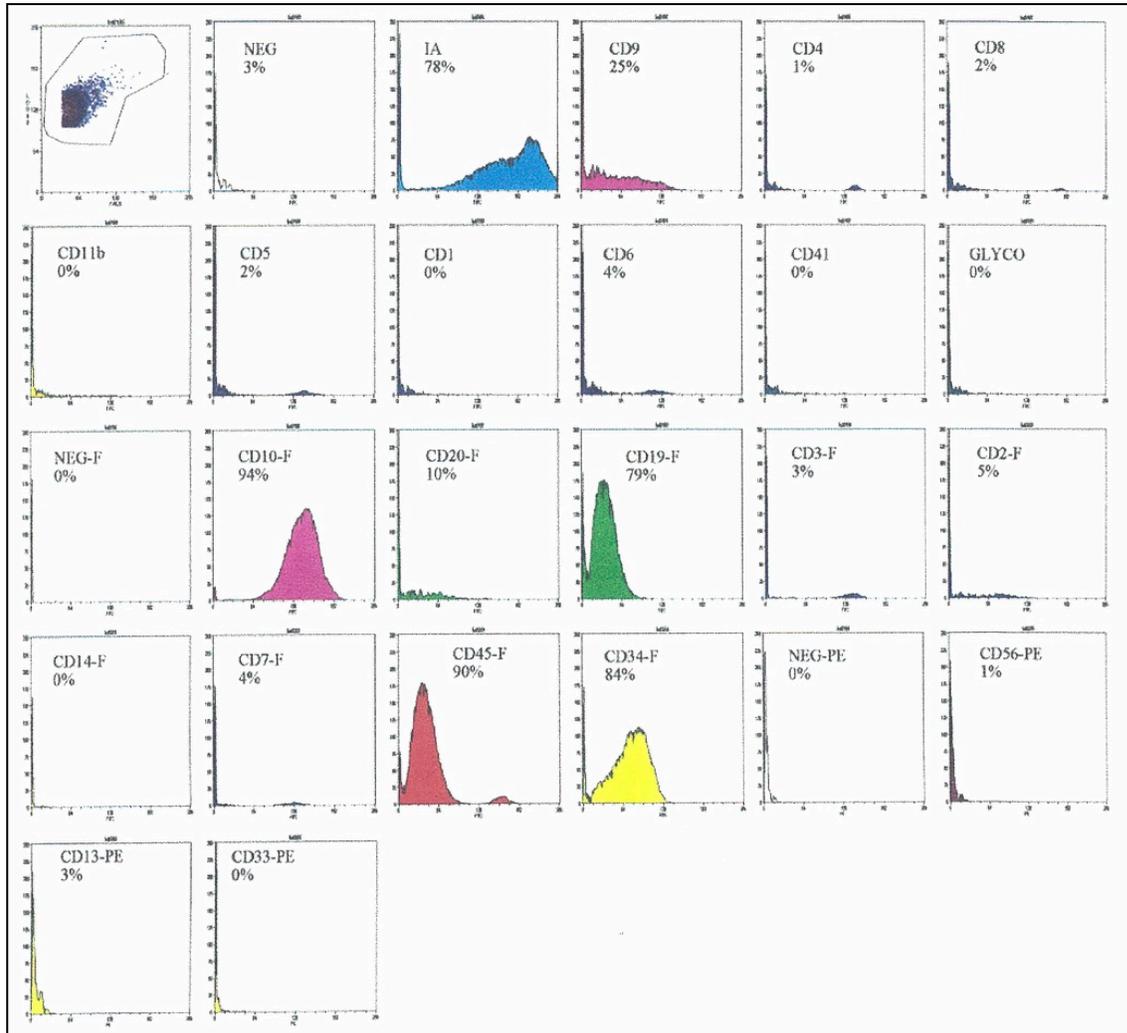
TABLA N° XXXIII
CD34+ EN LAS LEUCEMIAS LINFOIDES AGUDAS Y CRÓNICAS

De la misma forma se identificaron células CD34+ en sangre y médula ósea de pacientes con leucemia linfoide crónica, pero en menor proporción que en las leucemias agudas B.

	No Pts	CD34	CD2	CD7	CD4	CD5	CD8	CD10	CD19	CD20	CD33	CD14	CD13	
	Leucemia Linfoide Aguda B													
M.O.	Promedio	35	22,36	20,52	20,65	10,10	14,09	10,10	18,94	35,42	18,38	19,42	2,96	19,74
	Desvi.Estandar		30,16	20,73	18,36	8,29	12,64	8,29	30,14	31,44	26,15	13,78	3,27	19,54
Sangre	Promedio	12	90,00	22,60	31,00	15,00	17,33	8,71	35,84	62,75	21,08	17,62	1,00	12,83
Periférica	Desvi.Estandar		2,00	31,36	29,75	13,53	12,10	9,86	30,58	28,72	31,48	11,12	0,00	13,14
	Leucemia Linfoide Aguda T													
MO	Promedio	8	5,60	72,38	54,00	55,25	55,00	49,67	2,00	10,90	9,33	33,00	28,00	26,50
	Desvi.Estandar		6,22	30,36	19,81	25,55	29,22	36,68		10,84	12,74	24,04	36,77	33,23
Sangre	Promedio	9	0,50	22,60	17,33	15,00	17,33	8,71	35,84	62,75	21,08	17,62	1,00	12,83
Periférica	Desvi.Estandar		1,41	31,36	12,10	13,53	12,10	9,86	30,58	28,72	31,48	11,12		13,14
	Leucemia Linfoide Crónica													
MO	Promedio	3	3,00	13,00	5,50	7,00	70,00	4,00	7,00	73,33	56,67		3,00	13
	Desvi.Estandar		1,00	1,00	0,71	2,65	21,79	1,00		16,77	21,13			
Sangre	Promedio	4	1,00	13,00	5,50	7,00	70,00	4,00	7,00	73,33	56,67		3,00	13
Periférica	Desvi.Estandar		1,00		0,71	2,65	21,79	1,00		16,77	21,13			

La Fig. N° 44 muestra el estudio inmunofenotípico realizado a las células del aspirado de la médula ósea de un paciente con leucemia linfoide aguda B donde se aprecia aumento de células CD45, CD10, CD19 y CD34.

FIGURA N° 44
ESTUDIO INMUNOFENOTÍPICO DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA



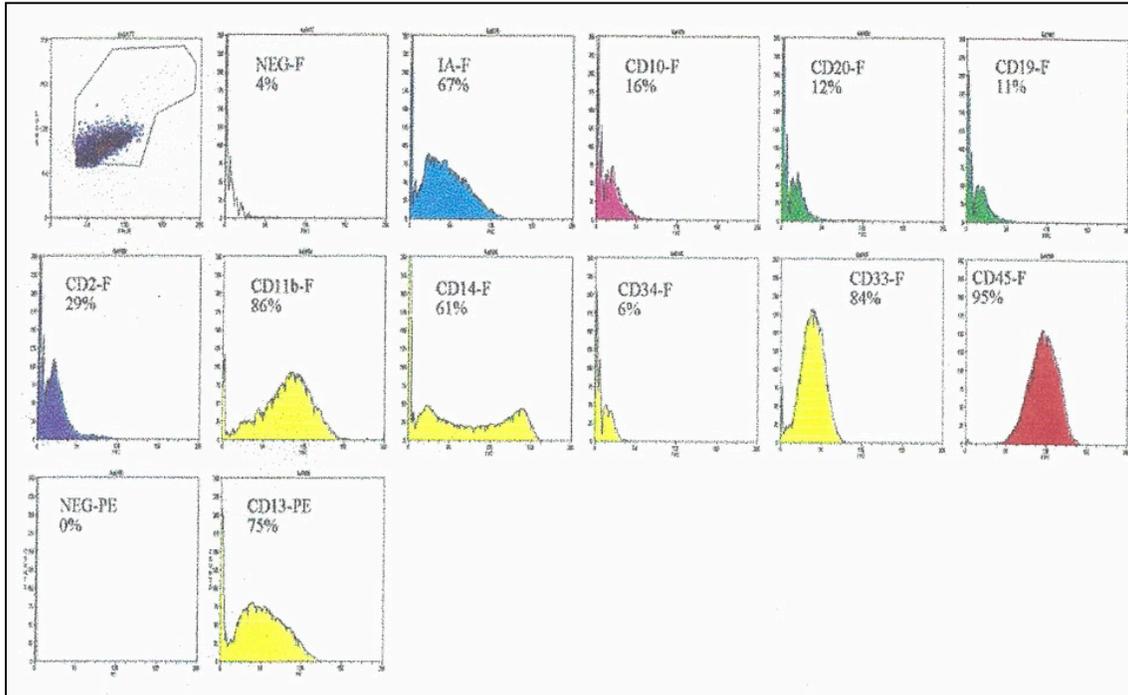
La Tabla N° XXXIV muestra el % de células CD34+ detectadas en la células de las médulas óseas de los pacientes con leucemia mieloide aguda, el cual tubo una variación muy amplia tanto en las células de las médulas óseas como en las células de las sangres periféricas de dichos pacientes. Así mismo se detectaron células CD34+ en las células de las médulas óseas de los pacientes con leucemia mieloide crónica.

TABLA No XXXIV
CD34+ EN LAS LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS Y CRÓNICAS

	No. Pts	CD34	CD33	CD13	CD14	HLA-DR	MPO	CD2	CD3	CD7
Leucemia mieloide Aguda										
Médula ósea	47	21,56	39,27	39,25	4,40	43,26	74,70	13,40	15,31	21,29
	-	± 20,53	± 23,43	± 26,03	± 21,79	± 26,16	± 27,21	± 10,64	± 15,77	± 20,09
Sangre Periférica	19	36,12	57,53	50,69	12,86	37,06	98,50	14,82	26,60	28,50
	-	± 33,97	± 32,21	± 35,05	± 21,79	± 23,91	± 0,50	± 21,11	± 27,78	± 24,46
Leucemia mieloide crónica										
Médula ósea	18	36,12	57,53	50,69	12,86	37,06	98,50	14,82	26,60	28,50
	-	± 33,97	± 31,21	± 35,05	± 21,79	± 23,91	± 0,50	± 21,11	± 27,78	± 24,46

La Fig. N° 45 muestra el estudio inmunofenotípico realizado a las células del aspirado de la médula ósea de un paciente con leucemia mieloide aguda donde se aprecia aumento de células CD33, CD13, CD14 y MPO (mieloperoxidasa)

FIGURA N° 45
ESTUDIO INMUNOFENOTÍPICO DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA



DISCUSIÓN

Las muestras de sangre de cordón prenatales se tomaron en casos de sospecha de malformaciones congénitas para la realización de estudios cromosómicos y un mi extra fue utilizado para los estudios descritos. Se asumió que aunque el feto presentara un defecto del desarrollo del tubo neural, de los riñones, del tubo gastrointestinal, anomalías múltiples congénitas, esto no debe influir en los resultados de los valores hematológicos o estudios inmunofenotípicos, ya que las células sanguíneas se desarrollan independientemente de otros tejidos fetales, como ha sido demostrado por muchos investigadores de la última centuria, quienes usando análisis microscópico de secciones de tejidos de embriones humanos han descrito la secuencia del desarrollo hematopoyético que ocurre en embriones y fetos, siendo un desarrollo completamente diferente al de otros tejidos. Así ha sido descrito que durante el desarrollo humano en útero las células sanguíneas se desarrollan por primera vez en el saco vitelino entre los días 16 y 19, a continuación entre las semanas 5 y 6 ocurre la hematopoyesis fetal hepática y entre la semanas 8 a 19 colonización injerto y expansión de las células hematopoyéticas en los huesos largos Esta expansión ocurre principalmente entre las semanas 11 y 12 de la vida fetal, de tal manera que la mayoría de los huesos se convierte en hematopoyéticos de las 11 a las 12 semanas de gestación (43). El hígado funciona como el sitio primario de hematopoyesis desde la semana 6 hasta la 22 de gestación, cuando la médula ósea se convierte en el sitio principal de producción de las células sanguíneas (44). Los hallazgos que acabamos de describir reportados por otros investigadores avalan nuestra teoría que las células de las sangres prenatales de fetos con malformaciones congénitas son apropiadas para el estudio de los antígenos de la superficie celular, ya que la malformación fetal que ocurrió en el proceso de desarrollo embrionario no tiene relación con el desarrollo de la hematopoyesis fetal

El procedimiento utilizado para obtener sangre prenatal fue básicamente de punción de vías intrahepáticas o cordocentesis. En un solo caso se realizó por error una punción por cardiocentesis y no hubo complicaciones ni fetales ni maternas, ya que la paciente fue hospitalizada para observación en el Servicio de Obstetricia del HUC y se le realizaron estudios ecosonográficos fetales y controles de la salud materna La cardiocentesis es un procedimiento que ha sido utilizado previamente. Las primeras 6 muestras de sangre prenatal se tomaron por punción de vías intrahepáticas y posteriormente por cordocentesis. Se observó

que el procedimiento de cordocentesis era más fácil y de menor riesgo para la paciente y el feto.

Las hematologías realizadas en sangres fetales prenatales mostraron que la hemoglobina tuvo un valor de $11,6 \pm 1$ g/dl entre las semanas 17-20, el cual fue ascendiendo a medida que aumentaba la edad gestacional hasta 13 ± 1 g/dl entre las semanas 27-32 de gestación, así mismo el hematocrito ascendió a 40,9%, lo cual concuerda con lo reportado. El volumen corpuscular medio de los eritrocitos mostró macrocitosis severa siendo entre las 17-20 semanas de gestación de 130 fl, la cual disminuyó a 117 fl, lo cual concuerda con la literatura reportada. La macrocitosis severa es característica de los eritrocitos fetales, ya que los eritrocitos maternos presentan valores mas bajos del VCM, a menos que la madre sufriera de anemia severa macrocítica por deficiencia de ácido fólico o vitamina B12 (45).

Estos casos habían sido controlados en la consulta de Obstetricia del Servicio de Obstetricia del HUC y sus hematologías mostraban valores de Hb y Hto normales para su edad gestacional Al procesar la muestra de sangre prenatal y obtener macrocitosis severa nos indica que los glóbulos eran fetales y no maternos y por lo tanto que no se habían punzado vasos maternos.

La electroforesis de Hb en sangre prenatal confirmó los hallazgos obtenidos en las hematologías prenatales, de que la muestra de sangre procedía del feto y no de la madre, ya que las membranas de acetato de celulosa corridas a pH 8,6 mostraron solamente la presencia de hemoglobina fetal en todas las muestras de sangre menores de 32 semanas de gestación. La hemoglobina fetal es característica de la sangre fetal ya que la hemoglobina del adulto normal está compuesta aproximadamente en el 96,5% de Hb AA, en el 1% de Hb fetal y en el 2,5% de Hb A2 (40).

En este estudio se demuestra que la sangre obtenida por punción de vías hepáticas, cordocentesis, cardiocentesis, era fetal ya que en todos los casos el VCM del eritrocito estuvo muy aumentado y la electroforesis de la hemoglobina mostró que la muestra de sangre estaba compuesta de hemoglobina fetal, que es la Hb del feto y no de Hb AA, que es la Hb del adulto normal y por consiguiente la materna.

La muestra de sangre fetal prenatal contenía eritrocitos como lo demostró el recuento de eritrocitos y el frotis de sangre coloreado con Wright en las hematologías prenatales realizadas en este estudio. Ha sido reportado con coloraciones hematológicas que las células eritroides constituyen cerca del 35% del total de células de la médula ósea de fetos de 12 semanas de gestación y posteriormente del 20 al 30% y que número de células eritropoyéticas excede el de la granulocíticas en los embriones de 10-11 semanas de edad, siendo la relación de eritropoyesis sobre granulopoyesis de 0,8 (2).

El análisis inmunofenotípico con anticuerpos monoclonales en este estudio en muestras de sangre fetal prenatal provenientes de edades gestacionales desde 17 a 32 semanas permitió identificar que dichas muestras contenían células nucleadas, que eran leucocitos, ya que se marcaron con el anticuerpo anti-HLA DR y anti-CD45 (Fig. N^{os} 13 a la 16).

El análisis inmunofenotípico de este estudio también demostró la presencia de células CD34+ en las sangres fetales prenatales tempranamente desde la semana 17 a la 32, el cual tuvo tendencia a disminuir a medida que aumentaba la edad gestacional (Figs. N^{os} 17 a la 27)

Ha sido reportado previamente que el antígeno CD34 es expresado sobre las células hematopoyéticas del hígado fetal humano y la mayor cantidad de, este antígeno CD34 está localizado sobre las células progenitoras hematopoyéticas fetales que sobre las células progenitoras hematopoyéticas del adulto (46, 47). 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. Los clusters hematopoyéticos se observaron en el lumen fuertemente asociados a las células endoteliales y las células CD34+ intraembriónicas en la región ventral de la aorta dorsal alrededor de la región preumbilical. (48). Huyhn y col, aislaron células CD34 de sacos vitelinos, hígados y embriones propiamente dichos entre 35-40 días de gestación, y cultivaron esas células en metilcelulosa y reportaron que las células progenitoras hematopoyéticas fueron más numerosas en el propio embrión que en el hígado o el saco vitelino. Esos resultados fueron interpretados como evidencia que precursores hematopoyéticos intraembriónicos ocurren en altas concentraciones cuando el hígado está iniciando la hematopoyesis y confirman estudios en ratones que sugieren que la hematopoyesis hepática definitiva sigue después que células hematopoyéticas del embrión se siembran en el hígado (49). Los hallazgos de este estudio que permitieron detectar células progenitoras CD34+ fetales prenatalmente concuerdan con lo reportado anteriormente

Así mismo el análisis inmunofenotípico de este estudio detectó la presencia de granulocitos en las sangres fetales prenatales estudiadas, los cuales se marcaron con el anti-CD33. Estos granulocitos detectados provienen de la hematopoyesis en hígado y médula ósea fetales ya que ha sido demostrado por investigaciones previas que la granulopoyesis predomina a la semana 12 y alcanza la relación del adulto de 3 (VN: 1,8 a 3,3) a la semana 21 del desarrollo humano. Con coloraciones hematológicas se han detectado granulocitos neutrofilicos en las médulas óseas de fetos de 10 y 13 semanas de edad. Hacia la semana 21 los granulocitos neutrofilicos representan el componente principal de las células sanguíneas y cerca del 60% de las células hematopoyéticas en la médula ósea fueron granulocitos neutrofilicos en proliferación o ya maduros. Los granulocitos eosinófilos (1%) están presentes en la médula de embriones de 10 semanas y gradualmente aumentan al 5% de todas las células de la médula ósea para la semana 21. Los granulocitos basofílicos son escasos a la semana 10 y permanecen bajos (0,3%) aún en embriones de 28 semanas. Los neutrófilos inmaduros y maduros fueron identificados en el bazo solo a las 16 semanas de gestación. (2,3) El anticuerpo monoclonal anti-CD33 utilizado aunque permitió identificar los granulocitos no diferencia entre granulocitos, neutrofilicos, eosinofílicos y basofílicos.

Los estudios inmunofenotípicos de las sangres fetales prenatales realizados en este trabajo demuestran la presencia de linfocitos T, los cuales marcaron con los anticuerpos anti-CD2, anti-CD7, subpoblaciones de linfocitos T con anti-CD4 y anti-CD8, linfocitos pre-T con el anticuerpo anti- CD 10, linfocitos B inmaduros con el anti-CD 19, linfocitos B más maduros que los linfocitos CD19 con el anticuerpo anti-CD20 (Figs. N^{os}17, 18, 19, 20, 21, 22, 23). Desde el punto de vista morfológico han sido demostrados linfocitos en la hematopoyesis hepática tempranamente desde la semana 5 a la 22 de gestación (2), sin embargo, con dichos estudios morfológicos es imposible subclasificar los linfocitos como se hizo en este estudio.

El estudio con anticuerpos monoclonales para subclasificar las células CD34⁺ en sangre de cordón permitió detectar un promedio de 0,8 % de células CD34⁺ / CD33⁻ y 0,3 % de células CD34⁺ / HLA Dr ⁻, ambas subpoblaciones representan células CD34⁺ madres muy primitivas que no expresan antígenos asociados a linajes específicos. Un grupo de células CD34⁺ de este estudio coexpresaron antígenos CD33 y HLA-Dr, lo cual nos indica que eran células progenitoras ya comprometidas al linaje granulocítico y por ende inmaduras pero mas diferenciadas que las anteriores (Tabla N^o XI) Estos hallazgos coinciden con el patrón de

expresión de antígenos observado en las células madres hematopoyéticas de la médula ósea de adultos, donde el análisis inmunofenotípico con anticuerpos monoclonales de las células en el citómetro de flujo ha permitido caracterizar las células CD34 pluripotenciales en 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.
2. **Las células menos primitivas son CD34+, CD38-, HLADr +**, que pueden diferenciarse en todas las líneas hematopoyéticas (Fig. N° 8, Fig. N° 9) (50).

También Waller y col reportaron que las células CD34+ más primitivas (1-3% del total) coexpresan HLA-Dr, como ocurrió en este estudio con células provenientes de sangre de cordón y dichas células CD34+ más primitivas expresaban niveles variables de CD13, CD49, COSO y CD54, pero esas células no expresaban CD38 o marcadores de linajes ya comprometidos como CD13, CD15, CD3 y CD20 (51) (Fig. N° 6).

Los hallazgos de este estudio en sangre de cordón nos sugieren que las células CD34+ son una población heterogénea y que las células progenitoras CD34+ poseen grados variables de compromiso para diferenciarse en una determinada línea celular.

Shpall y col. concluyeron en sus estudios sobre la caracterización de las células CD34+ en trasplantes que solo una pequeña fracción de células CD34+ representan verdaderas células madres o stem cells (52).

Cuando se realizaron hematologías postmovilización con quimioterapia y factores de crecimiento, se observó una monocitosis de $24,7 \pm 13,6$ % con una discreta eosinofilia de $7,5 \pm 4,7$ %, esto es causado por el GM-CSF o el G-CSF, ya que en la práctica clínica se observa en la mayoría de los pacientes que reciben dichos factores de crecimiento.

La determinación de células CD34+ en sangre periférica postmovilización mostró valores promedios de $2,70 \pm 3,1$ y hubo marcaje para leucocitos, linfocitos B y T, subpoblaciones de T: cooperadores y supresores, monocitos y mielocitos. En condiciones normales el porcentaje de células madres y progenitoras CD34+ en médula ósea es de 1 a 3 % y en sangre periférica es aproximadamente 0,1% o 1/10 de la cantidad en médula ósea (30)

(18). En este trabajo encontramos una amplia variación en el número de células CD34+ en la sangre de los pacientes postmovilización (Tabla N° XII), lo cual se debe a que los pacientes eran muy heterogéneos en sus patologías de base, en sus estadios de sus enfermedades, en la edad, en la cantidad de quimioterapia y radioterapia recibidos previamente a la movilización. Esto concuerda con los hallazgos de otros investigadores. Así por ejemplo Dreger y col. encontraron en 9 donantes normales una relación inversa entre la edad y la cantidad de células CD34+ recolectadas después de la administración de G-CSF (53). Los estudios realizados por muchos autores sobre los factores que afectan la movilización de las células progenitoras en sangre periférica respaldan la variabilidad en el número de células CD34+ detectadas en este estudio (30, 54, 55, 56)

En este estudio el porcentaje de células CD34+ post movilización con G-CSF y GM-CSF adecuado para la recolección de células progenitoras no apareció en sangre sino después del 4°-6° días post movilización. (Tabla N° XV). La cinética de movilización durante la administración de G-CSF fue evaluada por Sckhsaria S. y col. quienes reportaron que el valor pico de células CD34+ se observa entre el 4-6 día postadministración del factor de crecimiento como ocurrió en los pacientes de este estudio movilizados. (57)

Las hematologías obtenidas en de los productos de las cosechas de aféresis de este trabajo concuerdan con lo reportado por Rodríguez JM y col. usando la máquina de aféresis CS-3000 de la Baxter con el mismo tipo de cámara de separación de granulocitos que se usó en este trabajo. Rodríguez y col. reportaron 98% de reducción de los eritrocitos, aumento importante del número de leucocitos, de células nucleadas y de plaquetas en los productos de las cosechas de aféresis en relación a los contajes de sangre periférica de los donantes o pacientes. (Tablas N°s XVI a XIX) (58).

El porcentaje de células CD34 + obtenidas en la cosecha de los productos de aféresis en este trabajo osciló entre 0,58% a 1,48% usando una dosis diaria de factor de crecimiento GM-CSF o G-CSF de 16ug/ Kg peso corporal. Grigg y col. encontraron niveles picos de células CD34+ circulando en donantes normales cuando la dosis de G-CSF fue de 10ug en lugar de 3-5ug / Kgp (59) Similarmente Hogleung y col. reportaron que un aumento de la dosis de G-CSF de 3, 5, 7,5 a 10 ug/Kgp mejoró la movilización de células progenitoras en voluntarios

saludables. (60) Un aumento de G-CSF de 10 a 24 ug / Kg /día aumenta significativamente la cosecha de células progenitoras de sangre periférica en un grupo de pacientes con linfoma y cáncer testicular. El G-CSF se une a los neutrófilos, de tal manera que podemos asumir que el aumento de las células progenitoras en sangre periférica postquimioterapia y G-CSF en relación al número de las células progenitoras en sangre periférica cuando la hematopoyesis se realiza en condiciones basales podría simplemente reflejar una mejor biodisponibilidad del G-CSF para actuar debido a la neutropenia. (61) La variabilidad de los valores de células CD34+ en los productos de las cosechas de células progenitoras de sangre periférica encontrados en los pacientes de este estudio fueron los esperados tomando en cuenta que trabajamos con una población heterogénea de pacientes en cuanto a patología, antecedentes de quimioterapia y radioterapia.

El estudio inmunofenotípico realizado a las células de los productos de las cosechas de aféresis mostraron la presencia de leucocitos y células con antígenos pertenecientes a linfocitos B y T, monocitos y mielocitos, lo cual nos sugiere que un grupo de las células CD34+ serían células progenitoras que podrían ya estar comprometidas a diferenciarse a linfocitos, monocitos o mielocitos. En este estudio no se confirmó la coexpresión de dichos antígenos sobre las células progenitoras CD34+ porque en estas células no se dispuso del doble marcaje de anticuerpos.

El volumen promedio total de células nucleadas recolectadas por kg de peso corporal en los productos de aféresis de este estudio fue de $1,75 \pm 1,25 \times 10^8$ (Tabla N° XXVI), lo cual es un número de células que cuando se reinfunden a los pacientes durante los trasplantes autólogos son capaces de injertarse y producir reconstitución de la médula ósea (62), de tal forma que el volumen promedio total de células nucleadas recolectadas por kg de peso corporal es actualmente un índice para medir el potencial de injerto de las células progenitoras cosechadas por aféresis.

El total de células CD34+ / kg de peso corporal del paciente recolectadas en los 33 productos de aféresis de este estudio fue de $2,25 \pm 2,57 \times 10^6$ (Tabla N° XXVII). La dosis de células CD34+ I Kg y la dosis reportada por otros investigadores que produce injerto es de $1,5-2,0 \times 10^6 / \text{Kg}$. Es de hacer notar que este número debe de ser interpretado con cuidado ya que se ha demostrado en estudios multicentros nacionales e internacionales que hay una variabilidad

en la determinación de células CD34+ en los laboratorios debido básicamente a variables tales como tipo de anticuerpo monoclonal utilizado, elección del conjugado, la ventana utilizada en el análisis por citometría de flujo, el total de eventos adquiridos (63).

Cuando se realizó estudio inmunofenotípico a las células de sangre periférica de una de las pacientes trasplantadas de este estudio se observó que el conteo de leucocitos era normal, el estudio inmunofenotípico mostró el % total de linfocitos detectados con anticuerpos anti CD2 y anti-CD7 normal pero el % de células CD4 y CD8 muy disminuido. Este es un hallazgo importante ya que explica las infecciones mortales que pueden presentar estos pacientes en el período post-trasplante.

Los linfoblastos de los pacientes con leucemias linfoblásticas “B” expresaron aumento en su superficie de CD10, CD19, CD20, CD34, los linfoblastos de los pacientes con leucemias linfoblásticas T expresaron aumento en su superficie de CD2, CD7 y los mieloblastos expresaron en su superficie aumento de HLA-DR, CD13, CD33, CD34 y carecieron de CD11b estos hallazgos coincide con estudios de otros autores (41).

Se detectaron células madres CD34+ en todos los tipos de leucemias estudiadas tanto en las agudas como en las crónicas; siendo el porcentaje de células CD34+ más alto en leucemias agudas sobre todo en las de estirpe linfoide. Podemos asumir que las células madres pluripotenciales en los pacientes con leucemia fueron capaces de renovarse y diferenciarse eventualmente en células hijas que formaron las células progenitoras linfoides y mieloides primitivas y de allí que se detecten en leucemias tanto de estirpe mieloide como linfoide.

Este esquema ontogénico ha sido sostenido por estudios de células normales y neoplásicas sin embargo permanece especulativo, particularmente en los estadios más tempranos cuando las células todavía no se han comprometido hacia un linaje específico (65).

Los hallazgos de células CD34+ en leucemias agudas y crónicas nos lleva a concluir que una leucemia puede originarse en cualquier estadio de desarrollo a nivel de células madre, durante la maduración de las células progenitoras desde sus estadios más maduros, así como a nivel de precursores inmaduros.

BIBLIOGRAFÍA

1. Orlic D, Bodine DM. What defines a pluripotential hematopoietic stem cell (PHSC): Will the real PHSC please stand up! *Blood*: 84: 3991;1994.
2. Yoder Mervin C. Embryonic Hematopoiesis in Christensen Robert D (ed) *Hematologic Problems of the neonate*. W.B. Saunders Co, pag: 3.-19, 2000.
3. Kelemen E., Calvo W., Fleidner T. M: *Atlas of human hemopoietic Development*, New York. Springer-Verlag, 1979.
4. Calhoun D., Li Y., Braylan R., y col. Assessment of the contribution of the spleen to granulocytopoiesis and erythropoiesis of the mid-gestation human fetus. *Early Hum. Dev.* 46, 217; 1996.
5. Jacobson L., Simmons E., y col. Further studies on recovery from radiation injury. *J. Lab. Clin. Med.* 37: 683; 1951.
6. Till J., McCulloch E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* 14: 213; 1961.
7. Becker A, McCulloch E., Till J. Cytological demonstration of the clonal nature spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature.* 197: 452; 1963.
8. Pluznik D., Sach L. The cloning of normal mast cells in tissue Culture. *J. Cell Comp. Physiol.* 44: 287; 1966.
9. Bradley T., Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 44: 287; 1966.
10. Axelrad A., Me Leod D., Shreeve M., y col. *Properties of cells that produce erythrocyte colonies in vitro*. Washington, D.C.: National Institute of Health, 1974.

11. Spangrude G: Biological and clinical aspects of hematopoietic stem cell. *Annu Rev. Med.* 45: 93; 1994.
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* (Ed). 1996.
13. Dexter T., Allen T., Lajtha L.: Conditions controlling the proliferation of haematopoietic stem cell in vitro. *J. Cell Physiol.*: 91: 335; 1976.
14. Orlic D., Bodine D: What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up; *Blood* 84: 3991, 1994.
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 *86: 2137; 1995.*
16. Leemhuis T., Yoder M.C., Grigsby S., y col.: isolation of primitive human bone marrow hematopoietic progenitor cells using Hoechst 33342 and rhodamine 123. *Exp. Hematol.* 24: 1215; 1996.
17. Barclay A., Birkeland M., Brown M., y col.: *The leucocyte Antigen Facts Book.* London: Academic Press, 1993.
18. Civin C. I., Strauss I. C., Brovall C., y col.: Antigenic analysis of hematopoyesis III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against K-G 1^a cells. *J. Immunol* 133: 157; 1984.
19. Krause D., Facker M., Civin C., y col.: CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87: 1 ; 1996.

20. Bender J.G., Unverzagt K.: Flow cytometric analysis of peripheral blood stem cells. *J. Hematother* 2: 421; 1993.
21. Andrews R G., Singer J W., Bemstein ID. Precursors of colony- forming cells in human can be distinguished from colony-forming cells by expresión of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties: *J. Exp. Med.* 169: 1721; 1989.
22. Andrews R G., Singer J W., Bemstein ID. Human hematopoietic precursors in long term culture: Single CD34+ cells that lack detectable T cell, B cell and myeloid cell antigens produce multiple colony forming cell when culture with marrow stromal cells. *J. Exp. Med.* 172: 355; 1990.
23. Hogg N., Mac Donald S., Slusarenkom M., Beverley PCL. Monoclonal antibodies specific for human monocytes, granulocytes and endothelium. *Immunology* 53: 753; 1985.
24. Loken MR., Shah VO., Dattilio KL., Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. Normal erythroid development. *Blood* 69: 255; 1987.
25. Terstappen LWMM., Huang S., Picker L J. Flow cytometric assessment of human T-cell differentiation in thymus and bone marrow. *Blood* 79: 666; 1992.
26. Bender J.G., Unverzagt K., Walker DE y col. Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. *Blood* 77: 2591; 1991.
27. Libundgut K., von Rohr A., Brulhart K y col. The number of circulating CD34+ blood cells predict colony forming capacity of leukapheresis products in children. *Bone marrow Transplant* 15: 25; 1995.
28. Shpall EJ., Jones RB., Berannan SI., y col. Transplantation of CD34+ hematopoietic progenitor cell. *Hematothe.* 3(2): 145; 1994.

29. Gorin N., Lopez M., Laporte J., y col. Preparation and successful engraftment of purified CD34+ bone marrow progenitor cells in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 85: 1647; 1995.
30. Lane Thomas. Mobilization of Hematopoietic Progenitor Cells in Brecher ME, Lasky LC, Sacher RA and Issit, eds Hematopoietic Progenitor Cells Processing, Standards and Practice. Bethesda, MD. American Association of Blood Banks, 1995.
31. Richman CM., Weiner RS., Yankee RA. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood* 47: 1031; 1976.
32. Socinski MA., Elias A., Schinipper L., y col. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haematopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet* 1: 1194, 1988.
33. Gianni AM., Siena S., Bregni M., y col. Very rapid and complete haematopoietic reconstitution following myeloablative treatments: The role of circulating stem cells harvested after high dose cyclophosphamide and GM-CSF. In: Kicke KA, Spitzer G., Jangannath s., Evinger-Hodges MJ., eds. Bone marrow transplantation. 4th edition. Austin. University Texas Press 723: 31, 1989.
34. Pettengell R., Luft T., de Wynter E., y col. Effects of interleukine-6 on mobilization of primitive haemopoietic cells into the circulation. *Br. J. Haematol* 89 (2): 237; 1995.
35. Mohle R, Haas R., Hunstein W. Expression of adhesion molecules and e-kit on CD34+ hematopoietic progenitor cells: Comparison of cytokine mobilized blood stem cells with normal bone marrow and peripheral blood. *J. Hematother.* 2 : 483, 1993.

36. Lieschke GJ, Burgess AW. Granulocyte colony stimulating factor and granulocyte macrophage colony stimulating factor. *N Engl. J. Med.* 327; 28, 1992
37. Pettengell R., Testa NG., Swindell R., y col. Transplantation potential of haematopoietic cells released into the circulation during routine chemotherapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 11 (5): 369, 1993.
38. Gabutti v., Foa R., Anglietta M. Behavior of human haematopoietic stem cells in cord blood. *Haematologia* 60: 492, 1975.
39. Esmail Zanjani: in utero transplantation: VIII Congreso Europeo de Hematología, Florencia, junio 2002.
40. Muller Aixa: Anemias hemolíticas por deficiencia de enzimas glicolíticas en Venezuela. Estudio en humanos y perros. Tesis de ascenso a profesor agregado de la UCV año 2000.
41. Camps Begoña A., Cancelas Pérez José A., Henao Gegorio M., González J. Pétriz: Curso de determinación de células CD34+ por citometría de flujo ed. Florencio Carretero de Abajo. Div. Citometría Izasa S.A. Barcelona, España.
42. Bender J.G., Unverzagt K.: Flow cytometric analysis of peripheral blood stem cells. *J. Hematother* 2: 421; 1993.
43. Charbord P., Tavian M., Humeau L., y col: Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment. *Blood* 87: 4109; 1996.
44. Tavassoli M: Ontogeny of hemopoiesis. In Misami E., Timiras P.(eds) *Handbook of Human Growth and Developmental*. Boca de Raton: CRC Press, 1988, pag. 101.

45. Christensen R: Expected Hematologic Values for Term and Preterm Neonates in Christensen R: Hematologic Problems of the Neonate capítulo 7, pág. 117, editado por W. B Saunders Co. 2000.
46. Gilles J., Divon M., Bentolila E., y col. : Immunophenotypic characterization of human fetal liver hematopoietic stem cells during midtrimester of gestation. Am. J. Obstet. Gynecol. 177: 619; 1997.
47. Muench M., Roncarolo M., Menon S., y col. : FLK-2/ FLT-3 ligand regulates the growth of early myeloid progenitors isolated from human fetalliver. Blood 85: 963; 1995.
48. Tavian M., Coulombel L., Luton D., y col. Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo. Blood 86: 4474, 1996.
49. Huyhn A., Dommergues M., Izac B., y col.: Characterization of hematopoietic progenitor from human yolk sacs and embryos. Blood 86: 4474; 1995.
50. Zanjani E., Flake A., Rice H. y col.: Long term repopulating ability of xenogenic transplanted human fetal liver hematopoietic stem cells in sheep. J. Clin. Invest. 93: 1051, 1994.
51. Waller EK., Olweus J., Lund-Johansen F., y col. The “common stem cell” hypothesis reevaluated: Human fetal bone marrow contains separate population of hematopoiect and stromal progenitors. Blood 85: 2422; 1995.
52. Shpall EJ., Jones RB., Berarman SI., y col. Transplantation of CD34+ hematopoietic progenitor cell. Hematothe. 3(2): 145; 1994.
53. Dreger P., Haferlach T., Eckstein V y col. G-CSF-movilized peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: Safety, kinetics of mobilization and composition of the graft. Br J. Haematol 87: 609,1994.

54. Pettengell R, Morgenstern GR, Woll PJ, et al. Peripheral blood progenitor cell transplantation in lymphoma and leukemia using a single apheresis. *Blood* 82 (12):3770-7, 1993
55. Bensinger W., Appelbaum F., Rowley S y col. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. *J. Clin. Oncol.* 13: 2547, 1995.
56. Shneider JG., Crown JP, Wasserheit C y col. Factors affecting the mobilization of primitive and committed hematopoietic progenitors into the peripheral blood of cancer patients. *Bone Marrow Transplant* 14: 877, 1994.
57. Sckhsaria S., Fleisher TA, Vowells S y col. Granulocyte colony- stimulating factor recruitment of CD34+ progenitors to peripheral blood impaired mobilization in chronic granulomatous disease and adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency disease patients. *Blod:* 88: 1104, 1996.
58. Rodríguez JM, Carmona M., Noguerol P., y col. A fully automated meted for mononuclear bone marrow cell collection. *J. Clin. Apheresis:* 7: 101, 1992.
59. Grigg AP, Roberts AW, Raunow H y col. Optimizing dose and scheduling of filgrastim (granulocyte colony-stimulatinf g factorfor mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells in normal volunteers. *Blood* 86: 4437, 1995.
60. Hoglund M, Smedmyr B, Simonsson B y col. Dose dependent mobilization of haematopoietic progenitor cells in healthy volunteers receiving glycosylated rHuG-CSF. *Bone Marrow Transplant* 17: 709, 1996.
61. Zeller W, Gutensohn K, Stockschlader M y col. Increased of mobilized CD34+ peripheral blood progenitor cells in patients with Hodgkin disease, non-Hodgkin Lymphoma, cancer of the testis. *Bone Marrow Transplant* 17: 709, 1996.

62. Hohaus S, Voso Maria Teresa y Hass R: The role of cytokines in the mobilization of blood stem cells in Blood Stem Cell Transplantation edited by Reiffers J, Goldman J., y Armitage J. Mosby 1998.
63. Gee A: Collection and processing of peripheral blood hematopoietic progenitor cells in Blood Stem Cell Transplantation edited by Reiffers J, Goldman J., y Armitage J. Mosby 1998.
64. Vaickus L, Foon K: Immunology of acute leukemia in neoplastic diseases of the blood.