



Cultivos clonogénicos: historia y su uso actual como control de calidad pre-trasplante

Clonogenic Assays: As a quality control for pre-transplant onco-hematological diseases

Alcántara Luz¹, Bonilla-Cisneros Carlos², Luna Fernando³

Recibido: 26-01-2015 Aceptado: 15-04-2015

RESUMEN

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas se utiliza actualmente para el tratamiento de enfermedades onco-hematológicas como leucemias y linfomas. Una técnica utilizada para evaluar la capacidad de proliferación in vitro de las células progenitoras hematopoyéticas colectadas en muestra de sangre periférica, sangre periférica movilizada, médula ósea, y sangre de cordón umbilical es el cultivo clonogénico, en el cuál se forman colonias de células de granulocitos-eritroides-macrófagos-megacariocitos (UFC-GEMM), unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos (UFC-GM), unidades formadoras de eritroides (UFC-E) en un medio de metilcelulosa. El objetivo de este artículo es dar una breve descripción histórica de los cultivos clonogénicos, así como resaltar la importancia de su utilización en el control pre-trasplante para enfermedades onco-hematológicas; esto es utilizado como un medio de calidad y seguridad para el paciente trasplantado.

Palabras clave: Células Progenitoras Hematopoyéticas, CPH; Unidades Formadoras de Colonias, UFC; Cultivos Clonogénicos, CC.

ABSTRACT

The hematopoietic stem cell transplantation is currently used for the treatment of onco-hematological diseases. One technique used to evaluate the ability of in vitro proliferation of hematopoietic progenitor cells in a sample collected from peripheral blood, mobilized peripheral blood, bone marrow, and umbilical cord blood is the clonogenic culture, in which cells form colonies of granulocytes -erythroid-macrophage-megakaryocyte (CFU-GEMM), colony forming units granulocyte-macrophage (CFU-GM), erythroid forming units (CFU-E) in a methylcellulose medium. The aim of this article is to give a brief historical description of clonogenic assays and highlight the importance of their use in controlling pre transplant in onco-hematological diseases as a means of quality and safety for the transplant patient.

Keywords: Cells progenitor hematopoietic, CPH; units forming colonies, UFC; Clonogenic assays, CA.

¹ Aplicaciones en Terapia Celular, SA de CV. Calle Santa Barbara 9C, Jardines Santa Rosa. Puebla, Pue. luzalcantara@gmail.com

² Laboratorio de Histocompatibilidad y Cultivos Clonogénicos. Banco de Sangre de Cordón Umbilical. Departamento de Investigación. Centro Nacional de Transfusión Sanguínea, Secretaría Salud.

³ Área de Cultivo y Criopreservación. Banco de células de Sangre de Cordón Umbilical Banco Central de Sangre. Centro Médico Nacional "La Raza". Laboratorio de Hematopoyesis Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social.

Correspondencia:

Alcántara Luz
Aplicaciones en Terapia Celular, SA de CV.
Calle Santa Barbara 9C, Jardines Santa Rosa. Puebla, Pue.
luzalcantara@gmail.com

Introducción

El creciente éxito del trasplante hematopoyético, ha constituido durante más de medio siglo el paradigma de la existencia de células troncales y de células progenitoras adultas. Hasta hace poco más de una década, hablar de células troncales no embrionarias era referirse casi inequívocamente a la médula ósea o a las células progenitoras hematopoyéticas (CPH's), ya que fueron éstas las primeras en conocerse y en ser aplicadas al tratamiento de enfermedades humanas¹. El objetivo de este artículo es dar una breve descripción histórica de los cultivos clonogénicos, así como resaltar la importancia de su utilización en el control pre-trasplante para enfermedades onco-hematológicas. El cultivo clonogénico actualmente es utilizado como un medio de control de calidad y seguridad para beneficio del paciente trasplantado, sin embargo aún no se ha podido establecer su estandarización entre laboratorios en nuestro país, por lo que sería importante lograr una unificación de criterios en los laboratorios que realizan este ensayo².

Hoy en día se conoce bien la existencia de las células primitivas llamadas troncales (stem cell) y sus descendientes menos primitivos llamados progenitores³. En este artículo nos referiremos únicamente a las células progenitoras hematopoyéticas y a su potencial de proliferación celular.

El tejido hematopoyético es líquido y trasplantable, se puede cultivar y manipular *ex vivo*, las CPH's se han convertido en una herramienta insustituible para terapias hematopoyéticas celulares y algunas aplicaciones en medicina regenerativa⁴.

Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH's)

La hematopoyesis es un proceso que se origina en la médula ósea y es el responsable de la fabricación o producción continua de células sanguíneas; esto ayuda a mantener una concentración constante y normal de estas células a lo largo de toda la vida de un individuo e indirectamente lleva implícita la noción de CPH's⁵. La hematopoyesis humana tiene una organización jerárquica, que está esquematizada en la **Figura 1**⁶. Brevemente, durante la maduración las células sanguíneas atraviesan por estadios intermedios de diferenciación que generan progenitores multipotenciales y diferenciados a linajes específicos; y las cantidades producidas diariamente mantienen la homeostasis en los individuos (**Tabla I**)⁶.

Los ensayos *in vitro* se han utilizado para monitorear las propiedades de crecimiento de las células progenitoras, en el caso de las hematopoyéticas, se han observado linajes multipotenciales (eritrocitos, monocitos/macrófagos y plaquetas), dependiendo del tipo de cultivo celular. Estas células sanguíneas se producen en la médula ósea a la misma velocidad en que se destruyen (principalmente en el bazo); ejemplo, si se tiene en cuenta que un ratón normal tiene unas 5,000 CPH's,

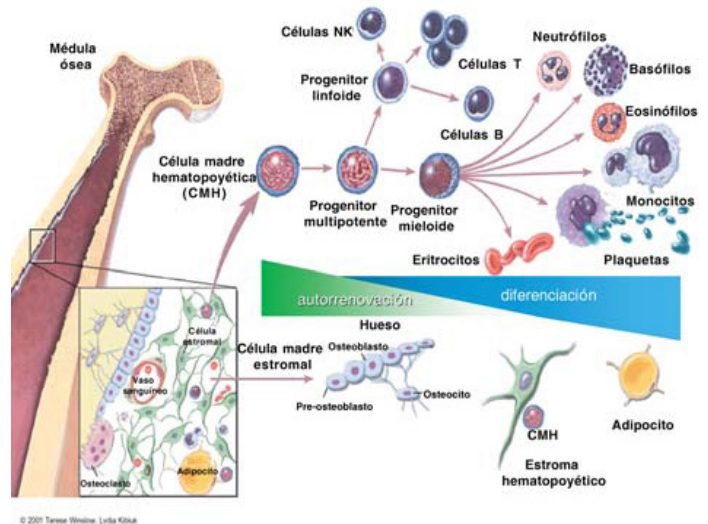


Figura 1. Esquema simplificado de la hematopoyesis. Una rara población de CPH's genera de manera continua y regulada una progenie de células maduras, que pasan a la circulación sanguínea. La multipotencialidad se va perdiendo a medida que las células se van diferenciando en los distintos linajes. La médula ósea también alberga otros tipos de progenitores, como los mesenquimales y los endoteliales. (Tomado de <http://stemcells.nih.gov> 6, modificado por la Dra. H. Eixarch).

Tabla I. Producción diaria estimada y valores normales de los principales tipos de células sanguíneas. Las cifras son aproximadas y están calculadas a partir de las medias para un adulto humano varón de 70 kilogramos de peso (5 L de sangre). No se

Tipo celular	Vida media	Valores normales	Cantidad total en L de sangre	Producción diaria
Hematíes	120 días	4.5 x 10 ⁶	22.5 x 10 ¹²	1,8 x 10 ¹¹
Granulocitos	8-10 horas	7.5 x 10 ³	37,5 x 10 ⁹	9 x 10 ¹⁰
Plaquetas	7-10 días	3 x 10 ⁵	15 x 10 ¹¹	2,1 x 10 ¹¹

incluye la producción de otros tipos celulares minoritarios como monocitos o linfocitos. La producción de los tres tipos celulares indicados supone generar aproximadamente 5 x 10¹¹ células cada día. Tampoco se tiene en cuenta posibles situaciones patológicas o de estrés, en las que esta producción basal puede estar aumentada⁶.

y cuando se analiza una preparación en fresco sólo están presentes entre 1 y 3 % de éstas células, y este 3% se encuentran en una fase activa del ciclo celular, se puede comprobar que la hematopoyesis es un proceso que se produce de una forma relativamente oligoclonal.

Por otra parte, la producción debe estar finamente regulada, ya que las necesidades de cada tipo celular pueden variar a cada momento. Al ocurrir alteraciones en algunos de los compartimientos celulares del sistema hematopoyético, sobre todo en los más primitivos, la producción de células sanguíneas puede verse modificada, de manera que los niveles de células circulantes sean abatidos drásticamente o incrementados muy por encima de lo normal; cualquiera de estas condiciones puede conducir a estados fisiológicos muy delicados, e incluso, a la muerte del individuo³.

Esta regulación depende de factores exógenos,

que incluyen mediadores solubles (factores de crecimiento hematopoyéticos, citocinas, factores inhibidores, etc.), que son liberados de forma endocrina, paracrina o por contacto directo entre célula-célula que tendrían lugar en el nicho hematopoyético, así como de sustancias neuroendocrinas liberadas por las terminaciones nerviosas que inervan la médula ósea, y también de factores intrínsecos de las propias CPH's, como la mayor o menor expresión de determinados factores de transcripción (PU-1, GATA-1, GATA- 2 o SCL/TAL-1) o de modificaciones epigenéticas⁵.

Aspectos históricos relacionados con la creación de los cultivos clonogénicos

Los orígenes de esta metodología, tienen que ver con la importancia que se le ha otorgado a la sangre desde los tiempos antiguos, en la conservación de la salud, en la percepción de enfermedades y con la subsecuente necesidad de conocer su fisiología y mecanismos de producción. Varios sucesos convergieron en este sentido, en donde el bazo jugó un papel central⁷.

Las primeras descripciones celulares de la sangre, se realizaron entre los años 1658 y 1674⁸. Las transfusiones experimentales entre animales datan del año 1665⁹, entre humanos y animales de 1667¹⁰ y entre humanos de 1795 a 1818¹¹. A pesar del conocimiento que se generó a lo largo de estos años, los resultados provocaron su prohibición en Europa, lo que ocasiono un gran hueco histórico en el estudio de la sangre¹².

Los antecedentes del empleo del bazo para curar enfermedades hematológicas, se describen en los trabajos de Brown-Séguar a fines del siglo XIX; él planteó la posibilidad de reconstituir la producción de células sanguíneas en caso de anemias, administrando células del bazo crudo o cocido de animales¹³.

El punto histórico clave y relevante del papel que ocupó el estudio de órganos, como el bazo, en el desarrollo de técnicas en la investigación hematopoyética, parece surgir del uso de armas nucleares a fines de la segunda guerra mundial (1939-1945)¹⁴.

En la década de los 50's Jacobson y Leonard demostraron la sobrevivencia del 60% en ratones expuestos a dosis letales de radiaciones (rayos X) y la protección de estos por implantación de bazo en la cavidad intraperitoneal, o bien inyectando células hematopoyéticas de ratón sano inmediatamente después de la radiación. Lo evidente durante su disección, era la formación de nódulos en sus bazos, lo que más tarde explicarían otros autores^{15, 16, 17}.

A principios de los 60's, y retomando este modelo, dos investigadores canadienses James Till y Ernest McCulloch

describieron inicialmente estos nódulos como "áreas locales de regeneración"¹⁸. Interpretaciones posteriores de ellos mismos, especulaban que dichas áreas podían ser colonias generadas a partir de una sola célula; por lo cual podría considerarse a estos ensayos como un modelo *in vivo* para el estudio clonal de progenitores¹⁹. Andrew Becker en una publicación subsecuente demostró que la mayoría de las células de una colonia efectivamente parecían tener un ancestro común, mostrando este punto de vista de Till y McCulloch como razonable y estableciendo por tanto la validez del método, como ensayo para ver a una célula como el origen de una colonia¹⁹. De esta forma, surgió el primer ensayo de colonias *in vivo*.

Ensayos *in vivo* e *in vitro*

Después de surgir la primera evidencia de la existencia de progenitores hematopoyéticos de vida media larga en los años 60's, se desencadenaron otras series de evidencias que sustentaban la teoría de la expansión clonal *in vivo*. Tal es el caso de los estudios de Billingham y Medawar²⁰ quienes aunque no trabajaban con progenitoras hematopoyéticas descubrieron que al realizar prácticas de trasplante de injertos cutáneos entre hermanos idénticos y no idénticos, se sorprendieron al comprobar que en la mayoría de los casos los trasplantes entre no idénticos no eran rechazados. En su búsqueda de una explicación satisfactoria se encontraron con los estudios de Owen y demostraron, en una serie elegante de experimentos en modelo murino, que la creación de quimerismos hematopoyéticos mixtos en ratones neonatos inducía tolerancia específica frente a las células del donante^{21,22}, estos resultados fueron publicados en 1953 y le valieron a Peter Medawar el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1960.

Con todas las evidencias indirectas de esa época, a partir de los años 60's, se inició la búsqueda prospectiva de las células progenitoras hematopoyéticas (CPH's); y en 1961, Till y McCulloch¹⁸, describieron un método para detectar y contar células progenitoras del sistema hematopoyético; este método se basó en la cualidad de las células progenitoras para multiplicarse y diferenciarse formando colonias. Así mismo también asignaron el nombre operacional denominado unidad formadora de colonias (UFC o CFU por sus siglas en inglés, units forming colonies), para evitar que se asignara una identidad a estas células todavía no caracterizadas; este término fue usado por otros investigadores para designar a diferentes tipos de progenitores descubiertos.

Becker, McCulloch y Till¹⁹ demostraron que las UFC eran en realidad clonales, es decir, que procedían de una única célula, y se producían colonias de tamaños y morfologías diversas, empezaron a utilizarse diferentes medios semisólidos. El paso siguiente fue, el traslado de este método *in vivo* a condiciones

in vitro lo cual no fue fácil ya que el sustrato pasaba a segundo término, si no se utilizaban los estimulantes apropiados.

El judío Leo Sachs, investigó desde 1961 agentes estimulantes del crecimiento de granulocitos y mastocitos en medio líquido sustentado por células de bazo^{22, 23}. Basándose en los hallazgos en bazo, publicó junto con Pluznik en 1965 un trabajo en el que demostraba que células hematopoyéticas normales de ratón pueden ser clonadas en agar suave y que la formación de estos clones requería de inductores secretados por las células de las capas de sostén, las cuales se habían dejado crecer bajo el agar (feeders)²⁴. Sus hallazgos mostraron la posibilidad de obtener clones celulares y el análisis de su diferenciación clonal normal en agar suave, y demostraron que su formación requiere de sustancias inductoras específicas producidas por tipos celulares diferentes cultivados bajo el agar. Con base en estos reportes, se comenzaron a realizarse estos procedimientos con células hematopoyéticas.

Cada uno de estos tipos de clones se llegó a identificar como un tipo de progenitor. Así, se describieron las UFC-GM (unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos), las UFC-E (unidades formadoras de colonias de eritrocitos), las UFC-Meg (unidades formadoras de colonias de megacariocitos) y las UFC-Mix (unidades formadoras de colonias mixtas). El último paso fue conocer si las células conservaban el mismo comportamiento en un nuevo soporte hecho a base de metilcelulosa²⁵, el cual es un derivado sintético de la celulosa vegetal que ya se había usado muchos años antes²⁶ y se le fue incorporando a este tipo de cultivos por sus mejores cualidades técnicas, por varios autores a mediados de los 60's^{27, 28}.

Hallazgos de Pike y Robinson²⁹ demostraron que el suministro de asparagina en el medio de cultivo era necesario. Un aminoácido no esencial considerado hasta ese momento en cultivos de células normales, se convirtió en un requerimiento para el desarrollo de colonias de precursores progenitores en cultivo. Otro hallazgo, fue la observación de mayor estímulo en sustratos de medio semisólido, tal medio condicionado fue reportado por Iscove en 1971, y se convirtió en estándar constituyente del cultivo de progenitores^{29, 30}.

Definición de cultivo clonogénico y jerarquía de progenitores hematopoyéticos

Hoy en día podemos definir esta metodología como un ensayo de cuantificación de funcionalidad *in vitro* de los progenitores hematopoyéticos (CD34+), empleando un medio de metilcelulosa que promueve la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas de estirpe granulo/monocítica y eritrocítica, más adelante se describirán las características fenotípicas de las células.

Las células hematopoyéticas son una demostración de

la existencia de una jerarquía de progenitores con diferentes potencialidades y de la naturaleza clonal de la hematopoyesis (Figura 2)³⁵.

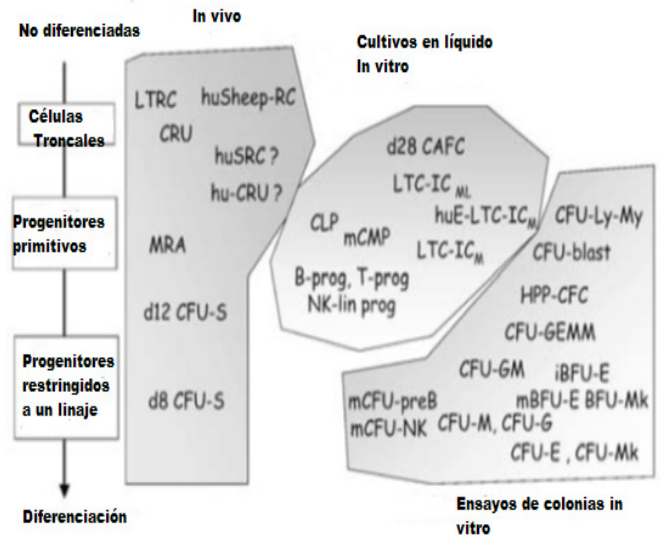


Figura 2. Varios tipos de células troncales y progenitoras hematopoyéticas se han identificado en los ensayos *in vitro* e *in vivo*. En el eje vertical se señala su estado de maduración, hu, denota células que no se ha demostrado el origen y m, significa que se ha descrito solo para murinos. Tomado y modificado de Coulombel L (2004). Para mayores referencias consultar³⁶.

Los ensayos clonogénicos, se utilizan en los bancos de células progenitoras y en investigación para evaluar la calidad de un producto celular (muestras de sangre de cordón umbilical o médula ósea congelada), proporcionan una información funcional de progenitores más diferenciados formando unidades.

Otros ensayos clonogénicos que permiten analizar progenitores más inmaduros que las UFC son el LTC-IC (*long-term culture initiating cell*)³² y los CAFC (*cobblestone area forming cell*)^{33,34}, o células formadoras de áreas en empedrado, por la disposición que adoptan las células de la colonia, que recuerda a la de los adoquines de las calles antiguas. En ambos ensayos se emplean cultivos a largo plazo, y requieren un soporte estromal.

Sin embargo, hasta el momento ningún ensayo *in vitro* permite evaluar rigurosamente la funcionalidad de las CPH's, los únicos que lo hacen son los que atienden a la propia definición de estas células, es decir, que demuestran su capacidad de repoblación *in vivo* y de diferenciación hacia los principales linajes hematopoyéticos, y a largo plazo (un mínimo de 4 meses en el ratón y varios años en un humano)³¹.

Por otra parte, los ensayos de repoblación *in vivo* también tienen sus limitaciones, pues una vez que se documenta que la repoblación se ha producido, las CPH's que la originaron desaparecen. Además, en los ensayos de repoblación *in vivo* hay que tener en cuenta que las células que se trasplantan, tienen que

llegar a alcanzar los tejidos hematopoyéticos y anidar (*homing*) en los nichos adecuados, este proceso de homing puede ser un factor crítico cuando se trasplantan números muy reducidos de células o una sola célula³². Una solución a estos problemas, son los ensayos de repoblación competitiva; en ellos, una población de células «problema» es trasplantada simultáneamente con otra población «control», de esta manera, una población puede ser cuantificada y diferenciada de la otra en las muestras de tejidos hematopoyéticos de los animales receptores mediante algún marcador fenotípico (CD34+, CD38 low, CD45 dim, CD90)³³. Así, se definieron las unidades de repoblación competitiva (CRU siglas en inglés), lo que equivale a una célula única que es capaz de producir linaje mielóide y linfóide a largo plazo cuando es trasplantada a un animal irradiado letalmente.

Con todo, estas exigencias de los ensayos de repoblación *in vivo* imponen enormes restricciones y dificultades para el estudio de las CPH's, y ello ha impulsado la búsqueda de métodos alternativos que permitan identificar a las CPH's de una manera prospectiva.

Caracterización fenotípica de las CPH's

Tras los primeros intentos de enriquecimiento basados en el tamaño y la densidad celular, la aparición de anticuerpos policlonales o monoclonales frente a distintos marcadores inmunofenotípicos, acoplados a nuevos y mejores fluorocromos y los avances en la citometría de flujo, que permiten análisis multiparamétricos a tiempo real y la separación de poblaciones celulares con fenotipos cada vez más complejos, han revolucionado el conocimiento sobre la hematopoyesis.

En 1984, Kurt Civin³⁴ descubrió el antígeno My10 en la línea leucémica humana KG-1a. Este marcador, que posteriormente se denominó CD34, se expresaba en la membrana del 1-4% de las células nucleadas de la médula ósea humana y se comprobó que dicha población contenía la capacidad de repoblación hematopoyética, lo que indicaba que, al menos de forma mayoritaria, las CPH's humanas expresaban dicho marcador. De hecho, se ha utilizado la selección positiva de células CD34+ como un método para depleccionar o purgar *ex vivo* de células tumorales contaminantes en productos hematopoyéticos (médula ósea, productos de aféresis) autólogos antes de ser trasplantados, bien sea como único método de purga o en combinación con la selección negativa (por ejemplo, de células B en algunos linfomas). Posteriormente, se descubrió que la mayoría de los progenitores con capacidad de repoblación, además de ser CD34+, eran CD38-, lo que permitió enriquecerlos al menos en una orden de magnitud más. El fenotipo que define mejor a las CPH's humanas es Lin-CD34+ CD38-/low CD45RA- CD90 y fue descrito recientemente en la sangre de cordón umbilical^{35, 36}.

En el ratón, que es la especie en la que los distintos progenitores hematopoyéticos están mejor caracterizados, y a pesar de que muchos de los marcadores que los identifican se han conservado bien a lo largo de la evolución, las cosas son algo distintas; por ejemplo, en el ratón las CPH son CD34. Una característica que define a los progenitores inmaduros, es que no expresan ninguno de los marcadores específicos de los distintos linajes maduros como: CD3, CD5, CD7, CD4 o CD8 para células T; CD13, CD14, CD15, CD11b o Gr1 para células mieloides; B220, CD19, CD20, CD21 para células B, o el Ter-119 para células de la serie roja; es decir son Lin-.

La denominada depleción Lin- utiliza una mezcla de anticuerpos frente a estos marcadores y permite eliminar la inmensa mayoría de células maduras y de precursores diferenciados, enriqueciendo unas 20 veces en capacidad de repoblación en comparación con la médula ósea no fraccionada. Los marcadores c-Kit y Sca-1 suponen un paso más allá en la purificación de las CPH's murinas. Las células Lin- Sca-1+ c-kit+ o simplemente KLS están enriquecidas unas 1000 veces en capacidad de repoblación a largo plazo, en comparación con las de médula ósea no fraccionada. Aun así, sólo una de cada 10 células KLS es una CPH³⁶.

Importancia actual del potencial de proliferación celular

El uso de esta metodología *in vitro* ha llevado a la clonación y aislamiento de progenitores y de factores de crecimiento para la mayoría de las células hematopoyéticas, incluyendo diferentes tipos de linfocitos. Y ha ayudado a entender los controles que regulan el crecimiento y la diferenciación en la hematopoyesis y cómo estos controles están acoplados en el desarrollo normal y sus anormalidades en leucemia y otras enfermedades como anemia aplásica³⁷.

Así mismo, esta técnica es importante en la clínica ya que ha servido para garantizar a los centros de trasplantes, la calidad de las unidades de CPH's provenientes de médula ósea, sangre periférica o sangre de cordón umbilical³⁸ que serán transfundidas a los pacientes, además de conservar su viabilidad y la capacidad proliferativa para producir el injerto aun después de la descongelación. Se asegura que la capacidad de diferenciación de la célula troncal, o progenitores primitivos no se ha visto afectada, después de la criopreservación y descongelación. Es importante hacer notar, que la pérdida celular después de la congelación se estima entre un 16 a 20 % de las unidades y que los linajes de células primitivas son los más afectados, por lo que es importante realizar una criopreservación cuidadosa³⁸.

Los ensayos de UFC se evalúan *in situ* después de un período de incubación de 14 a 16 días y se puede reportar por separado cada colonia (UFC-E, UFC-GM, UFC-Meg, UFC-Mix); o

bien una eficiencia de clonogenicidad, llamada E-clone, que se refiere a las células CD34+ / UFC totales, multiplicadas por 100. De esta forma un E-clone mayor al 10% refleja un potencial de proliferación aceptable, o dicho en otras palabras, las células CPH's han conservado su capacidad de diferenciación. Es muy importante mencionar que el E-clone se basa exclusivamente para células CD34+, ya que existen células hematopoyéticas primitivas que son CD34- y también podría haber células CD34+ que no son hematopoyéticas en la unidad.

La Tabla 2, enumera las frecuencias con las que se encuentran las UFC de los progenitores hematopoyéticos en condiciones normales³⁵. Sin embargo, como puede observarse hay diferencias en el número de unidades formadoras de colonias resultantes, aunque sean condiciones normales pero diferentes recursos de obtención de las células cuantificables. Estas mismas diferencias se han observado en productos de leucoféresis de algunos centros de trasplantes. Por ejemplo analizando, el cociente de las células UFC/CD34, da como resultado, para los injertos entre 1/6.2 a 1/6.6 para injertos con <2% células CD34+, vs. 1/10.2 para injertos que contienen ≥2% células CD34+. Por tal razón es de vital importancia reportar el cociente de UFC/CD34+, ya que existen variaciones dependiendo del tipo de patología: 1/9.3 para mieloma múltiple, 1/6.8 para enfermedad de Hodgkin's, 1/6.5 para linfoma no Hodgkin, y 1/4.5 para tumores sólidos³⁹.

Tabla II. Frecuencias de las UFC en los diferentes recursos terapéuticos.

*Las UFC fueron determinadas utilizando Methocult, Stem Cell Technologies. Los valores son expresados como la media ± 2 sd.³⁵

Recurso Terapéutico	Tipo de Células Progenitoras Hematopoyéticas			
	UFC- Eritrocitos	UFrojos	UF-Granulocitos/	UFC-Mix
Médula Ósea	31 (1-78)	115 (1-251)	100 (30-170)	5 (1-15)
Médula Ósea (células mononucleares)	188 (1-506)	175 (1-477)	408 (1-990)	10 (1-30)
Médula Ósea (CD34+)	30 (1-59)	34 (1-74)	54 (7-101)	2 (1-5)
Sangre de Cordón umbilical	9 (1-48)	104 (1-310)	115 (1-303)	25 (1-59)
Sangre Periférica (células mononucleares)	2 (1-10)	30 (1-62)	9 (1-18)	2 (1-5)
Sangre Periférica Mobilizada	8 (1-27)	121 (1-257)	111 (1-257)	23 (1-67)

Conclusiones

Podemos concluir que existe todo un desarrollo histórico para la creación de esta técnica pre-trasplante, por tal razón es importante su utilización como control de calidad en enfermedades onco-hematológicas y para la seguridad del

paciente trasplantado. Así mismo la estandarización de esta metodología, en las unidades de salud en México contribuirá a homogenizar los datos de la calidad de las unidades trasplantadas y asegurar el éxito de esta terapia.

Bibliografía

1. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *New Eng. J. Med.* 1989; 1174-8.
2. Lumley M. A, Burton A, Billingham LJ, McDonald DF, Czarnecka HM, Milligan DW. Quality assurance of CFU-GM assays: inter-laboratory variation despite standard reagents. *Eur J Haematol.* 1999 Jan;62(1):32-7.
3. Martínez-Jaramillo G, Vela-Ojeda J, Sánchez-Valle E, Montesinos JJ, Mayani H. In vitro functional alterations in the hematopoietic system of adult patients with acute lymphoblastic leukemia. 2007:83-9.
4. Verena Reimann, Ursula Creutzig, Gesine Kögler. Stem Cells Derived From Cord Blood in Transplantation and Regenerative Medicine. *Dtsch Arztebl Int.* 2009:831-836.
5. Bonifer C. Epigenetic plasticity of hematopoietic cells. *Cell Cycle.* 2005: 211-214.
6. <http://stemcells.nih.gov>
7. Boylan M. Galen: On blood, the pulse and the arteries. *J Hist Biol;* 2007:207-30.
8. Hajdu SI. A note from history: The first two laboratory scientists. *Ann Clin Lab Sci* 2003; (33) 438-40.
9. Keynes G. Blood transfusion. London: John Write and Sons. 2010:1-19.
10. Starr D. Blood: An epic history of medicine and commerce. New York: Perennial (HarperCollins), 2003: 31-52.
11. Doyle k. Blood component preservation a storage. In: Rudmann Sv. Ed Textbook of blood banking and transfusion medicine. Philadelphia. Elsevier Saunders, 2005:258-80.
12. Ficarra B J. The evolution of blood transfusion. *Ann Med Hist.* 1942:305-6.
13. Ernest Beutler M.D., Marshall A. Lichtman M.D., Barry S. Coller M.D., Thomas J. Kipps M.D. Ph.D., Uri Seligsohn M.D. (Editor) Structure of the marrow and the hematopoietic environment. McGraw-Hill Professional. Williams Hematology 6th edition. November 28, 2000.
14. Borell M. "Brown-Séquard's organotherapy and its appearance in America at the end of the nineteenth century". *Bull Hist Med.*1976: 309-320.
15. Martín Gilbert. Segunda Guerra Mundial 1939-1945, La V. i. Editorial Edaf. 2005. 696pp. ISBN: 8497342984
16. Leonard J. Cole, Maurice C. Fishler, and Victor P. Bond. Subcellular fractionation of mouse spleen radiation protection activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1953: 759-772.
17. Jacobson, L. O., Simmons, E. J., Marks, E. K., and Eldredge, J. H., Recovery from irradiation injure. *Science* 1951: 510-511.
18. Till E, McCulloch JA. Direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Research.*1961:213-222.
19. Becker A. J, McCulloch E A & Till J E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature.* 1963:452-4.
20. Bellingham RE, Brent L, and Medawar PB. Activity acquired tolerance of foreign cells. *Nature.* 1963; 172, 603-606.
21. Ono S J J. The birth of transplantation immunology: the Billingham-Medawar experiments at Birmingham University and University College London. 1951. *Exp Biol* 2004: 4013-4014.
22. Ginsburg H, Sachs L. The long term cultivation in tissue culture of leukemic cells from mouse leukemia induced by Moloney virus or by

- x rays. *J Nat. Cancer Inst.* 1961;53-71.
23. Ginsburg H, Sachs L. Formation of pure suspensions of mast cells in tissue culture by differentiation of lymphoid cells from the mouse thymus. *J Nat Cancer Inst.* 1963; 31:1-40
 24. Pluznik DH, Sachs L. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J Cell Comp Physiol.* 1965; 66:319-24.
 25. Hotchin J. E. Use of methyl cellulose gel as a substitute for agar in tissue-culture overlays. *Nature* 175; 1955: 352
 26. Ichikawa Y, Pluznik DH, Sachs L. In vitro control of the development of macrophage and granulocyte colonies. *Proc Nat Acad Sci US.* 1966; 56:488-95
 27. Pluznik D H & Sachs L. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *Cell. Comp. Physiol* 1965; 66:319-24. [Citation Classic. *Current Contents/Life Sciences* 1983; 39:18.
 28. Iscove N, Senn J, Till J, McCulloch E. Colony formation by normal and leukemic human marrow cells in culture: effect of conditioned medium from human leukocytes. *Blood* 1971; 37:1-5. Citation Classic. *Current Contents/Life Sciences.*1983; 23:151.
 29. Pike B L & Robinson W A. Human bone marrow colony growth in agar-gel. *J. Cell. Physiol.* 1970; 76:77-84.
 30. Hoang T, Iscove N. N. & Odartchenko N. Agar extract induces release of Paran M, Sachs L, Barak Y, Resnitzky P. In vitro induction of granulocyte differentiation in hematopoietic cells from leukemic and non-leukemic patients. *Proc. Nat Acad Sci US.* 1970; 67:1542-9.
 31. Kinzfojl JM, Broxmeyer HE. Brief historical overview of hematology, cord blood, and links between the nervous and hematopoietic systems. In: Broxmeyer H. E, ed. *Cord Blood: Biology, Transplantation, Banking, and Regulation* Bethesda, MD Press, 2011; 1:1-16
 32. Ploemacher RE, van der Sluijs JP, Voerman JS *et al.* An *in vitro* limiting dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood.* 1989; 74, 2755-2763
 33. Majeti R, Park CY, and Weissman IL. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Stem Cell;* 2007; 1, 635-645.
 34. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. An hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* 1984; (33):157-65.
 35. Human Colony-Forming Cell (CFC) Assays using Methocult®. Technical Manual. V. 3.1.0. 2009. Stem Cell Technologies®.
 36. Coulombel L. Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. *Oncogene.* 2004; (23): 7210-22.
 37. Dobo I, Pineau D, Robillard N, Geneviève F, Piard N, Zandecki M, y Hermouet S. Standardization of the CFU-GM Assay: Advantages of Plating a Fixed Number of CD34⁺ Cells in Collagen Gels. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research.* 2003;12(5): 543-551.
 38. Kurita N, Frassoni F, Chiba S, Podestà M. Impact of length of cryopreservation and origin of cord blood units on hematologic recovery following cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2015 Mar 23. doi: 10.1038/bmt.2015.56
 39. Jo-Anna Reems, Karen M. Hall, Luladay H. Gebru, Greta Taber, Ivan N. Rich. Development of a novel assay to evaluate the functional potential of umbilical cord blood progenitors. *Transfusion.* 2008; (48): 620-628.