

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICOBIOLOGICAS**

**RELACIÓN ENTRE LA CANTIDAD DE CÉLULAS PROGENITORAS CD133⁺
CON EL TIEMPO DE INJERTO EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO.**

Tesis que como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en
Ciencias Químico-biológicas presenta:

QFB Rosa María Martínez Rodríguez.

Directores de tesis:

Dra. Elba Reyes Maldonado.

Dra. Laura Arcelia Montiel Cervantes.

México, D. F.

2009.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Hematopatología del Departamento de Morfología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Elba Reyes Maldonado y en el laboratorio de Hematología Especial del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional “La Raza”, bajo la Dirección de la Dra. Laura Arcelia Montiel Cervantes.

La sustentante fue becaria del CONACYT durante sus estudios de Maestría con número de registro: 162234

DEDICATORIAS

A mis padres que encendieron la chispa que me ha guiado en cada una de mis metas.

A mis profesores que con su ardua labor me han cultivado en lo profesional y me han abierto las puertas en el ámbito laboral.

A la maravillosa institución que es el IMSS que me ha dado las facilidades para seguir superándome.

A mis hijas para quienes he intentado ser un ejemplo a seguir y de quienes espero tengan más y mejores expectativas que yo.

Pero sobre todo a mi esposo que siempre ha estado a mi lado apoyándome en todo y sobre todo, tolerando mis grandes ausencias, mis enojos y mi cansancio.
Gracias mi gran amor.
Este logro también es tuyo...

ÍNDICE.

	Índice	i
	Abreviaturas	iii
	Índice de figuras	v
	Índice de tablas	vii
	Resumen	viii
	Abstract	ix
I.	Introducción	1
	Antecedentes	1
	Planteamiento del problema	29
	Justificación	29
	Hipótesis	29
	Objetivo General	30
II.	Materiales y métodos	31
	Tipo de estudio	31
	Material biológico	31
	Criterios de inclusión	31
	Criterios de exclusión	32
	Metodología	32
	Análisis estadístico	37
III.	Resultados	39
IV.	Discusión	58
V.	Conclusiones	66

VI	Expectativas para trabajos futuros	66
VII	Bibliografía	67
VIII	Anexo I	78
	Anexo II	79

ABREVIATURAS

7-AAD	7- Aminoactinomicina D
AA	Anemia aplásica
ABMTR	Registro americano de trasplante de médula ósea (del inglés American bone marrow transplant registry)
AMM	Asociación médica mundial
Ang-1	Angiopoyetina
APC	Aloficocianina.
CD	Cconjunto de diferenciación (del inglés Cluster of Differentiation)
CFS	Factor estimulante de colonias
CFU's	Unidades formadoras de colonias
CFU-S	Unidades formadoras de colonias del bazo
CMH	Célula madre hematopoyética
CMP	Célula madre precursora o progenitora
CMV	Citomegalovirus
CN	Células nucleadas
G-CSF	Factor estimulador de colonias granulocíticas
CsA	Ciclosporina A
CTE	Células troncales embrionarias
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Etilendiaminotetracético
EICH	Enfermedad injerto contra huésped
EPO	Eritropoyetina
EPCs	Células progenitoras endoteliales
EVO	Enfermedad veno-oclusiva
FACS	Separación de células por fluorescencia activada (del inglés Fluorescence-activated cell sorter)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
FL	Fluorescencia.
FSC	Tamaño ("Forward scatter").
GM-CSF	Factor estimulador de colonias granulocito-macrófago
GVL	Injerto contra leucemia
HLA	Antígeno leucocitario humano
IBMTR	Registro internacional de trasplante de médula ósea (del inglés International bone marrow transplant registry)
IDCG (SCID)	Inmunodeficiencia combinada grave
IL	Interleucina.
kD	kiloDaltones
KDR	Factor de crecimiento
lin	Linaje específico (mieloide o linfoide)
LCP	Leucemia de células plasmáticas
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
LH	Linfoma de Hodgkin

LNH	Linfoma no Hodgkin
LTC	Cultivo a largo plazo
LTC-ICs	Células iniciadoras de cultivos a largo plazo
MAPCs	Células progenitoras adultas multipotentes adherentes
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MSC	Células mesenquimales del estroma de médula ósea.
NOD/SCID	Diabetes no obesa /inmunodeficiencia combinada severa
Nt	Neutrófilos
PAP	Peroxidasa antiperoxidasa
PBSCs	Célula tallo de sangre periférica
PE	Ficoeritrina.
PerCP	Proteína peridina-clorofila.
Pq	Plaquetas
SCF	Factor de células tallo.
SCT	Trasplante de célula tallo
SDF	Factor derivado del estroma (del inglés Stromal derived factor)
SG	Supervivencia global.
SLE	Supervivencia libre de enfermedad.
SP	Sangre periférica
SSC	Granularidad o complejidad interna ("Side scatter").
TACTSP	Trasplante alogénico de células tallo de sangre periférica
TCMNSP	Trasplante de células mononucleares de sangre periférica
TdT	Desoxinucleotidil transferasa terminal.
Th	Linfocito T cooperador.
TMO	Trasplante de médula ósea
TPO	Trombopoyetina.
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento de endotelio vascular
VIH	Virus de Inmunodeficiencia humana
VLA-4	Very late antigen-4

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura No. 1	Marcadores antigénicos de células madre hematopoyéticas. CMH-LP= célula tallo hematopoyética de largo plazo, CMH-CP= célula tallo hematopoyética de corto plazo, CMP= célula progenitora multipotencial.	3
Figura No. 2	Gráficas de puntos de células CD133+ viables, en A) muestra basal de donador sano, B) muestra movilizada de donador sano, C) muestra de bolsa de cosecha.	36
Figura No. 3	Distribución de la muestra estudiada por género y edad.	39
Figura No. 4	Distribución de la muestra estudiada por padecimiento.	39
Figura No. 5	Distribución de la muestra estudiada por tipo de enfermedad y género.	40
Figura No. 6	Distribución de los pacientes por padecimiento y edad.	41
Figura No. 7	Comparación de las medias obtenidas en las muestras basales de pacientes y donadores sanos para el antígeno CD34+.	42
Figura No. 8	Comparación de medias entre muestras basales de pacientes y donadores para el antígeno CD133+.	43
Figura No. 9	Comparación entre las muestras basal y movilizada del donador sano para las células CD34+.	45
Figura No. 10	Comparación entre las muestras basal y movilizada del donador sano para las células CD133+.	45
Figura No. 11	Dosis de células tallo CD34+ (A) y CD133+ (B) infundidas a los pacientes.	46
Figura No. 12	Dosis de células tallo CD34+ (A) y CD133+ (B) infundida respecto al día de injerto de neutrófilos.	47
Figura No. 13	Dosis de células tallo CD34+ (A) y CD133+ (B) infundida respecto al día de injerto de plaquetas.	48
Figura No. 14	Dosis de células tallo CD34+ (A) y CD133+ (B) infundida respecto al día de injerto de eritrocitos.	49
Figura No. 15	Distribución de pacientes con TACTSP de acuerdo con la	

	dosis de células CD34+ infundida y presencia y tipo de EICH.	52
Figura No. 16	Distribución de pacientes con TACTSP de acuerdo con la dosis de células CD133+ infundida con la presencia y tipo de EICH.	53
Figura No. 17	Supervivencia global de los pacientes sometidos a trasplante alogénico de células tallo.	54
Figura No. 18	Supervivencia libre de enfermedad en pacientes sometidos a trasplante alogénico de células tallo.	55
Figura No. 19	Comparación de la supervivencia global de los pacientes distribuidos por patología.	56
Figura No. 20	Comparación de la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes sometidos a trasplante alogénico de células tallo distribuidos por patología.	57

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1	Indicaciones de trasplante de células tallo.	22
Tabla 2	Valores de las medias obtenidas para las poblaciones CD34, CD38 y CD133 en las muestras basales de donador y paciente.	41
Tabla 3	Comparación entre cantidades de células progenitoras viables en estado basal y movilizada en el donador.	43
Tabla 4	Comparación de la dosis de células tallo CD34+ infundida respecto a los días de injerto de neutrófilos, plaquetas y eritrocitos.	50
Tabla 5	Comparación de la dosis de células tallo CD133+ infundida y días de injerto de neutrófilos, plaquetas y eritrocitos	50
Tabla 6	Asociación entre muerte, presencia de EICH y diagnóstico en pacientes trasplantados respecto a la dosis de células progenitoras infundida.	51

RESUMEN.

INTRODUCCIÓN: La movilización de células tallo hematopoyéticas dentro de la circulación sanguínea ha mejorado la eficiencia de su colección. El trasplante de células tallo movilizadas para pacientes con diferentes enfermedades hematológicas resulta un paso rápido para la recuperación hematopoyética que deriva de células tallo de médula trasplantada.

La cuantificación de células mononucleares CD34+ es la medida más importante de control de calidad para el trasplante de células tallo hematopoyética (CTH). Estas células constituyen un grupo primitivo de células tallo menos diferenciadas, con una potencial y elevada capacidad de injerto. La cantidad total de células tallo hematopoyéticas periféricas CD34+ y la fracción de estas células que coexpresan CD133+, fue determinado antes y después de la colección automatizada por leucoaféresis, así como el efecto de la dosis de las células tallo CD133+ en la recuperación hematopoyética. En este trabajo se observó la relación entre la cantidad de células progenitoras CD133+ con el periodo de injerto en el trasplante alogénico.

MATERIALES Y METODOLOGÍA: La movilización con el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) de células tallo hematopoyéticas de la médula a la sangre periférica en donadores sanos alogénicos fue seguida por la colección automatizada a través de leucoaféresis al quinto día. La cuantificación de células CD34+, CD38+ y CD133+ fue llevada a cabo en sangre periférica antes de la colección y durante el injerto por citometría de flujo.

RESULTADOS: Se estudiaron 26 pacientes con diferentes padecimientos hematológicos. El promedio de edad fue de 37 años. Se determinaron las poblaciones celulares CD34+38-, 34+38+, 34+133-, 133+38-, 133+38+, 133+34-, 133+34+ en las muestras basales de paciente y donadores, movilizadas y cosecha de donadores. Se compararon las cantidades de células en estado basal y después de la movilización encontrándose diferencia significativa ($P < 0.001$). La dosis promedio de CD34+ infundida fue 8.966 céls. $\times 10^6/\text{kg}$ y de CD133+ fue 5.885 céls. $\times 10^6/\text{kg}$. Posterior al trasplante se hizo un seguimiento de los pacientes para determinar el día de injerto de las líneas celulares. Con las dosis de CD34+ antes mencionada se logró el injerto de neutrófilos al día 12, de plaquetas y eritrocitos al día 13. Con la dosis de CD133+ injertaron neutrófilos al día 13, plaquetas y eritrocitos al día 14. Hubo tendencia a que los pacientes que recibieron la dosis de 8.966 céls. $\times 10^6/\text{kg}$ de CD34+ presenten muerte ($P = 0.077$). La presencia de enfermedad injerto contra huésped (EICH) fue mayor a mayor dosis de células tallo infundidas. Las EICH tipo I y II fueron las más frecuentes, en el 35% de los pacientes. La mediana de la supervivencia global fue de 363 días postrasplante en promedio y la supervivencia libre de enfermedad de 295 días.

CONCLUSIONES:

Si existe relación entre la cantidad de células progenitoras CD133+ para el injerto exitoso con el mínimo de complicaciones como la EICH ya que la mayoría de los pacientes no la presentaron. Utilizando G-CSF a dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ durante 5 días, se obtuvo movilización significativa. Con la dosis promedio infundidas de CD34+=8.966 céls. $\times 10^6/\text{kg}$ y de CD133+ =5.885 céls. $\times 10^6/\text{kg}$ se logró el injerto para las series mieloide, plaquetaria y eritroide entre los días 12 y 14. Sin embargo, se encontró que la dosis no influyó significativamente con el tiempo de injerto. A dosis menores de 7.2 céls. $\times 10^6/\text{kg}$ de CD34+, 64% de los pacientes no presentaron EICH y 36% restante presentaron solamente tipo I y II. Con dosis menores a 3.9 céls. $\times 10^6/\text{kg}$ de CD133+ se encontró que 67% de los pacientes no presenta EICH y 33% restante presenta EICH tipo I, II y III. Con respecto a la supervivencia global se obtuvo una mediana de 363 días y para la supervivencia libre de enfermedad 295 días.

ABSTRACT.

The mobilization of hematopoietic stem cells into the circulation has improved the efficiency of their collection. Transplantation of mobilized blood stem cells to patients with different haematologic diseases results in a faster pace of hematopoietic recovery than transplantation of marrow derived stem cells.

Quantification of CD34+ mononuclear cells is the most important quality control measure for hematopoietic stem cell (HSC) transplantation. A fraction of CD34+ cells also expressed the CD133 antigen. These cells constituted a group of earlier, less-differentiated HSCs with a potentially higher capacity for engraftment. The total number of CD34+ cells peripheral HSCs and the fraction of these cells that coexpressed CD133+ was determined before and after automated collection by leukapheresis, as well as the effect of HSC CD133+ dose on hematopoiesis recovery. In this work looked the relation between the quantity of progenitor cells CD133+ with the period of graft in the allogeneic transplant.

STUDY DESIGN AND METHODS:

Granulocyte-colony-stimulating factor mobilization of HSCs from the bone marrow to the peripheral blood (PB) of allogeneic donors was followed by automated collection through leukapheresis on the fifth day. Quantification of CD34+, CD38+ and CD133+ cells was performed on PB before collection and in the hematopoietic graft by flow cytometry.

RESULTS: Twenty six patients with different haematologic disease were studied. The average age was 37 years. The cell colonies CD34+38-, 34+38+, 34+133-, 133+38-, 133+38+, 133+34-, 133+34+ were determined in basal samples collected from patients and donors, mobilized and donor's harvest. There was a significant difference after the mobilization in all the cellular population. The average dosis of CD34+ infused was 8.966 cells X10⁶/kg and 5.885 cells X10⁶/kg of CD133+. With this dosis of CD34+ neutrophils were grafted on the thirteenth day, platelets and reticulocytes on the fourteenth. Patients that received a dosis of 8.966 cells X10⁶/kg of CD34+ showed death (P=0.077). The presence of graft versus host disease (GVHD) was higher with high dosis of impled stem cell. The GVHD type I and II were the most frequent among 35% of the patients. The middle of overall survival was of 363 days postransplant in average and 295 days of free of disease survival.

CONCLUSION: A significant mobilization of pheripheral blood was obtained from all the population analized using G-CSF with a dosis of 10 µg/kg/day was administered subcutaneously for five consecutive days.

With the average infused dosis of CD34+=8.966 cells X10⁶/kg and of CD133+=5.885 cells X10⁶/kg., the graft was for the myeloid, platelets and erythroid series was gotten between the 12 and the 14 day. However, it was found that the dosis did not have any influence with the period of the graft. With minor dosis of 7.2 cells X10⁶/kg of CD34+, 64% of the patients did not present GVHD and the other 36% presented only the types I and II. With dosis less than 3.0 cells X10⁶/kg of CD133+, it was found that 67% of the patients did not present GVHD and the other 33% presented GVHD type I, II and III. Regarding the overall survival, a medium of 363 days was obtained and for the free of disease survival it was 295 days.

I. INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES.

A mediados del siglo XIX, científicos italianos propusieron que la médula ósea era la fuente de origen de las células sanguíneas. La idea de que un factor en los tejidos que elaboran la sangre de un individuo podría restablecer la médula ósea dañada de otro, fue considerada un siglo atrás. A principios del siglo XX, se comenzó a formular la idea de que una cantidad pequeña de células de la médula ósea podría ser la responsable del desarrollo de todas las células sanguíneas, por lo que les denominaron “células madre”. Alexander Moximov (1909), hace referencia que “entre los linfocitos de la sangre periférica había una población común de células tallo circulantes”¹.

En 1961, Till y Mc Culloch, en estudios llevados a cabo en ratones, fueron los primeros en realizar experimentos definitivos que sugirieron la existencia de las células tallo en la médula ósea. Ellos describieron una técnica donde se transferían células de la médula ósea y del bazo a receptores irradiados, los cuales dieron lugar a la formación de colonias macroscópicamente visibles en el bazo, llamadas unidades formadoras de colonias del bazo (CFU-S), compuestas de diferentes células iniciadoras eritroides, granulocíticas y/o megacariocíticas^{2,3,4}.

Las células tallo o “*stem cell*” es un término común usado para describir una célula que bajo ciertas condiciones, tiene la capacidad de reproducirse a sí misma por largos periodos y que puede dar origen a células especializadas que forman tejidos y órganos del cuerpo⁵. La célula madre pluripotente o totipotente es aquella que tiene la capacidad de dar origen a células de las tres capas germinales (mesodermo, endodermo y ectodermo). Las únicas fuentes conocidas de células pluripotenciales humanas, son aquellas que son separadas y cultivadas de embriones humanos en la primera semana de vida, o del tejido fetal destinado a ser parte de las gónadas. La célula madre embrionaria es aquella que deriva de la masa celular interna, que es parte del embrión de 4 a 5 días, llamado blastocisto. La célula madre adulta es una

célula indiferenciada que se encuentra en un tejido diferenciado, que se renueva a sí misma, y puede diferenciarse para producir todos los tipos especializados de células del tejido del cual se origina, y que se autorreplica durante toda la vida del organismo. Las células madre adultas habitualmente se dividen para generar células progenitoras o precursoras, que a su vez se diferencian o desarrollan hacia tipos celulares maduros que tienen formas características y funciones especializadas. Las células madre adultas más estudiadas han sido las formadoras de sangre o hematopoyéticas (CMH), que pueden ser separadas de la médula ósea y de la sangre periférica. No se ha aislado hasta la fecha, ninguna población de células madre adultas capaces de regenerar todos los tipos de células del cuerpo. Las células madre adultas generalmente se encuentran en cantidad escasa y frecuentemente son difíciles de identificar, aislar y purificar. Habitualmente estas células madre adultas no se replican indefinidamente en cultivo. La **célula precursora o progenitora (CMP)**, es aquella que se encuentra en los tejidos fetales o adultos, está parcialmente especializada, se divide y da origen a células diferenciadas pero ya no es capaz de auto replicarse, pues se dice que está comprometida con una línea de diferenciación. Las células progenitoras o precursoras pueden reemplazar a las células dañadas o muertas, manteniendo la integridad y función de un tejido, puede dar origen a tipos celulares relacionados, como: células T, B, y NK, pero en su estado normal no generan una amplia variedad de tipos celulares, como se muestra en la **figura 1** ⁶.

La diferencia entre las células tallo hematopoyéticas y las células progenitoras respecto al potencial para diferenciarse en líneas sanguíneas múltiples, es la capacidad para autorrenovarse; así, las células de la médula ósea primitiva con potencial clonal multipotente pueden ser divididas en tres grandes grupos: a) células tallo hematopoyéticas que dan origen a un injerto a largo plazo, pueden autorrenovarse y repoblar la sangre durante toda la vida del individuo (indefinidamente), b) células tallo hematopoyéticas que dan origen a un injerto a corto plazo, son multipotentes y tienen una capacidad limitada para auto renovarse, y c) progenitores multipotenciales en los que no es demostrable el grado de auto

renovación cuando son trasplantadas. Se ha demostrado en ratones usando marcadores fenotípicos y ensayos funcionales, que las células tallo hematopoyéticas de largo plazo pueden ser separadas de las células tallo hematopoyéticas de corto plazo y de las células progenitoras multipotenciales. Se sabe que las células tallo hematopoyéticas de largo plazo pueden auto renovarse o dar lugar a las células tallo hematopoyéticas de corto plazo, las cuales a su vez pueden autorrenovarse o dar lugar a células progenitoras multipotenciales, pero no pueden bajo ninguna circunstancia diferenciarse a células tallo hematopoyéticas de largo plazo ⁷.

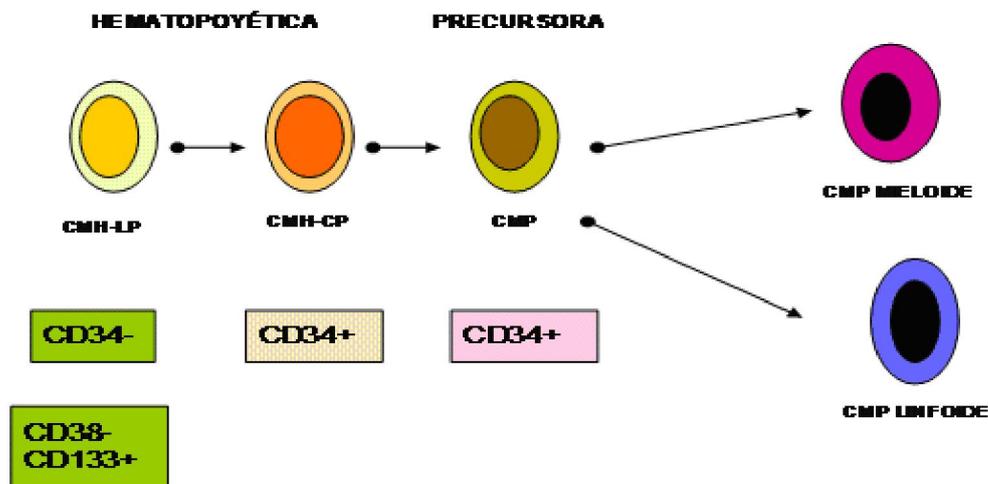


Figura No. 1. Marcadores antígenicos de células madre hematopoyéticas. CMH-LP= célula tallo hematopoyética de largo plazo, CMH-CP= célula tallo hematopoyética de corto plazo, CMP= célula progenitora multipotencial.

Los ensayos *in vitro* para los progenitores hematopoyéticos se utilizan para valorar su potencial de proliferación y diferenciación. Estos ensayos cuentan con la presencia de células del estroma derivadas de la médula ósea para mantener el crecimiento y desarrollo ^{8, 9, 10}.

Se han realizado estudios de células hematopoyéticas en cultivos semisólidos y líquidos en presencia de varias citocinas y ausencia del estroma de soporte, en los cuales se ha demostrado su capacidad para promover la actividad de las células tallo hematopoyéticas^{2, 3}. No ha sido posible llevar a cabo la autorrenovación sin la presencia de células del estroma. Estas células son las adherentes que se derivan de cualquier cultivo primario de médula ósea. Se cree que producen factores de crecimiento o proveen el estímulo necesario para mantener la hematopoyesis^{3, 4, 11}.

En relación a la hematopoyesis en el adulto, la mayoría de las células hematopoyéticas están localizadas en las cavidades de la médula ósea, en donde se encuentran progenitores que son capaces de iniciar y sostener la hematopoyesis a lo largo de la vida, y mantenerla en equilibrio constante. **Las células progenitoras hematopoyéticas iniciales surgen de precursores no hematopoyéticos** en dos episodios de duración finita durante el desarrollo embrionario. En el primero como evento *de novo*, las células progenitoras hematopoyéticas son generadas en **los islotes sanguíneos del saco vitelino**^{12, 13}. **La progenie de estas células migra al hígado fetal y ahí se inicia la hematopoyesis**, sitio en el cual su duración es transitoria; el segundo episodio de formación *de novo*, ocurre en la región paraórtica y la progenie de estas células, otra vez, inicia la población del hígado fetal, para posteriormente poblar en forma permanente la médula ósea y el bazo¹⁴.

Las células progenitoras hematopoyéticas que son necesarias para la generación de células maduras, se agrupan en tres subpoblaciones: células tallo, células progenitoras y células que proliferan y maduran. Las células tallo generan células progenitoras y luego éstas llevan a cabo la proliferación y maduración celular. En cada paso ocurre una amplificación importante del número de células, en donde aproximadamente una de cada 10^5 células de médula ósea es una célula tallo, y alrededor de una en 200 es una célula progenitora comprometida a una u otra línea. La progenie inicial que genera la célula progenitora son células inmaduras que pueden ser identificadas morfológicamente en varias líneas. Los diferentes estadios de maduración de una línea tienen menos capacidad progresiva para la proliferación

y producen células postmitóticas que terminan la maduración antes de liberarse a la sangre ^{15, 16}.

Se han realizado estudios de separación de células y bioensayos que han permitido ordenar a las células tallo en forma jerárquica, y determinar su capacidad para renovarse y generar una progenie más madura; ya que son multipotenciales y tienen la más alta capacidad de autorrenovación y de producción celular; éstas son detectadas por pruebas de repoblación *in vivo* a largo plazo ^{2, 17}. Las células tallo con cierto grado de maduración son detectadas en cultivos celulares a largo plazo, los cuales permiten la regeneración de células que son capaces de sostener la hematopoyesis en cultivos con la presencia de una capa basal de células del estroma. ¹⁸ Los cultivos en agar semisólido son capaces de formar colonias de células blásticas compuestas de células progenitoras ^{3, 15}. Las células tallo humanas son de tamaño y complejidad similar al linfocito maduro pequeño, con tinción débil para rodamina ¹²³, CD34⁺, CD33⁻, HLA-DR⁻, CD117^{+/-} y marcadores de linaje de población negativos ^{19, 20}. Las células progenitoras, difieren de las células tallo en que son más grandes, son mononucleares, indiferenciadas y frecuentemente con una morfología de tipo blasto ²¹. La mayoría de las células progenitoras están en ciclo celular activo. En el ratón las células progenitoras son rodamina ¹²³-positiva, CD117⁺, linaje⁻ y pueden exhibir receptores de membrana para factores de crecimiento. Ellas poseen poca o nula capacidad para autorrenovarse, pero cada una de ellas puede generar más de 10,000 células de progenie. Esencialmente las células progenitoras son una población transitoria, ya que la progenie de las células tallo genera las células maduras ^{22, 23, 24}.

Mientras algunas células progenitoras pueden generar 10,000 células de progenie, otras pueden ser capaces de formar sólo 50 a 100 células. Además de que el compromiso hacia una u otra línea parece ser irreversible en las células progenitoras. La mayoría están comprometidas a una sola línea, por ejemplo: eritroide o granulocítica, pero las progenitoras menos maduras pueden ser bipotenciales o a veces multipotenciales. Es lógico esperar que en un orden de

producción celular, las células progenitoras multipotenciales generen bipotenciales y luego unipotenciales; sin embargo, existen estudios que muestran que las células multipotenciales generan varios tipos de progenie de células progenitoras de una manera aleatoria ^{4, 16}. Desde que se sabe que las células progenitoras expresan el antígeno CD34⁺ es más simple y rápido detectarlas. Las células tallo purificadas pueden repoblar a individuos, sin la inclusión necesaria de precursores maduros para proveer células iniciales al injerto ²⁰.

Para valorar la población hematopoyética de médula ósea en un animal pequeño, el número total de células progenitoras hematopoyéticas puede ser determinado por la colecta de la población de un fémur entero, el cual tuvo 6% de la población medular total.²⁵ Existen estudios que han permitido identificar dos tipos de mecanismos reguladores que controlan el número y tipo de células progenitoras hematopoyéticas que son generadas: a) control local por microambiente de las células del estroma y b) control por reguladores hematopoyéticos ¹⁹.

La hematopoyesis está habitualmente restringida a la médula ósea y el bazo; esto sugirió desde un principio, la existencia del microambiente especial en estos tejidos que podría ser necesario para sostener o estimular la hematopoyesis. Las células tallo como las progenitoras están presentes en la sangre periférica. El nicho del microambiente difiere ligeramente entre la médula ósea y el bazo en los tipos de formación de colonias hematopoyéticas que ellos soportan. La presencia de células especializadas del estroma en estos órganos y los diferentes tipos de dichas células que pueden existir, con funciones de regulación diferentes para las células de varias líneas hematopoyéticas, son evidencias de que el microambiente lleva a cabo el control local. En estudios realizados con cultivos de tejidos, se encontró que las monocapas de células estromales son esenciales para el mantenimiento de la hematopoyesis a largo plazo por las células de la médula; y que la célula tallo necesita estar en contacto con las células del estroma para poder sostener dicha hematopoyesis ²⁶. En dichos cultivos no ha sido posible definir los eventos moleculares pero sí los procesos: 1) moléculas de adhesión vía unión celular ²⁷; 2)

exposición a ciertos factores de crecimiento sobre la membrana celular del estroma, como el factor de células tallo (SCF) y el factor estimulador de colonias-macrófago (M-CSF) ^{28, 29} ; 3) la producción local de múltiples reguladores por las células del estroma ^{30,31,32,33}; 4) la respuesta de la producción reguladora por células del estroma induciendo señales de varios tipos, por ejemplo interleucina-1 (IL-1) ^{31, 33} y 5) la capacidad del glicocalix de las células del estroma para liberarse de la unión de ciertos reguladores ³⁴.

Los reguladores hematopoyéticos, tienen la capacidad de estimular la proliferación de varias clonas hematopoyéticas. Dentro de este grupo se encuentran: la eritropoyetina (EPO), factor estimulador de colonias granulocito macrófago (GM-CSF), factor estimulador de colonias granulocito (G-CSF), factor estimulador de colonias macrófago (M-CSF), interleucina-3 (IL-3), factor de células tallo (SCF), trombopoyetina (TPO), interleucina-6 (IL-6), interleucina-11 (IL-11). Estos reguladores son casi todos glicoproteínas de un tamaño que varía de 18,000 a 90,000 Daltones, algunos funcionan de manera parecida a las hormonas, siendo transportados a las células blanco por vía sanguínea (acción endocrina), otros producen su efecto localmente (acción paracrina) y en ocasiones ambos mecanismos son operativos³⁵. Existen dos características inusuales de los reguladores hematopoyéticos: a) La mayoría pueden ser producidos por diferentes células como: endoteliales, fibroblastos, macrófagos, linfocitos y algunas epiteliales; además difieren de las hormonas clásicas; 2) La mayoría tienen acción sobre células de más de una línea hematopoyética; sin embargo, pueden tener una acción dominante sobre células de una línea particular, tal como la acción de la eritropoyetina sobre las células eritroides o la de G-CSF sobre células granulocíticas. Un aspecto sorprendente de los reguladores hematopoyéticos es su polifuncionalidad, la cual ha sido caracterizada ya para los cuatro factores estimulantes de colonias. Cada CSF **no solamente tiene la función de controlar la proliferación celular, sino también tiene acciones sobre células comprometidas, definiendo a qué línea hematopoyética entra la progenie, cuando debe cesar la división celular, la iniciación de la maduración y**

mantenimiento de los sistemas de transporte de membrana y la viabilidad de las células con disminución de la muerte por apoptosis^{36, 37, 38, 39, 40}.

Existen reportes que sugieren una característica de la célula tallo, para transdiferenciarse cruzando las barreras de tejido para crear células diferenciadas invirtiendo su estado diferenciado y contribuir a la poza de células tallo^{5, 41}. Esta inesperada plasticidad de la célula tallo de tejido somático tiene un impacto clínico potencial.

Al realizarse ensayos con precursores clonogénicos de linajes mielóide-eritroide *in vitro*, llamados células iniciadoras de cultivos de largo plazo (LTC-ICs), y unidades formadoras de colonias (CFU's), en un modelo de ratones con diabetes no obesa inmunocomprometidos / inmunodeficiencia combinada severa (NOD/SCID), se pudo estudiar la capacidad de las células humanas hematopoyéticas de repoblar un modelo *in vivo*. Este ensayo fue paralelo con el progreso de la caracterización fenotípica de células hematopoyéticas usando anticuerpos monoclonales^{42, 43}.

La célula tallo hematopoyética más primitiva tiene la capacidad de reconstituir un huésped NOD/SCID letalmente irradiado. La expresión de antígenos de superficie CD34 así como factores de crecimiento KDR (flk-1), factor de crecimiento endotelial, c-kit para factor de célula tallo y flt-3 para flt-3 ligando, los cuales actúan como reguladores positivos en el desarrollo hematopoyético. Estos factores de crecimiento también actúan sinérgicamente *ex vivo* siguiendo una expansión del número de células tallo hematopoyéticas⁴⁴.

El establecimiento de métodos de cultivo *in vitro* de las células de estroma de médula ósea, provee un microambiente en cocultivos con células hematopoyéticas. Las células mesenquimales dan diversos tipos de tejidos como cartilaginoso, óseo, adiposo y muscular. Jiang y cols. (2002) identificaron una población menor de células progenitoras adultas multipotentes adherentes (MAPCs), las cuales, bajo ciertas condiciones de cultivo, pueden diferenciarse en hepatocitos funcionales, células endoteliales, mieloblastos, osteoblastos, condrocitos o células hematopoyéticas⁴⁵.

Estos progresos sugieren que la médula ósea puede tener un valor terapéutico para regenerar tejidos multilíneaje.

Los progenitores hematopoyéticos normalmente son los encargados de los compartimientos linfóide, mieloide o eritroide y pueden llegar a ser sorprendentemente plásticos, si se exponen a condiciones inusuales de microambiente o sujetos a reprogramación genética. Los progenitores linfoides comunes dan células mielomonocíticas en respuesta a señalización por citocinas. La sobreexpresión de factores de transcripción tipo *raf*, *myc* y *max* también inducen "switches" entre los linajes hematopoyéticos.⁵ Un alto grado de plasticidad fue descubierto en células de linaje B derivadas de ratones "knockout" Pax-5, las cuales diferenciaron hacia células hematopoyéticas *in vitro* e *in vivo*^{46,47}.

Desde 1999 se han hecho estudios en ratones, los cuales sugieren que la célula tallo puede ser reclutada fuera de la circulación y empleada en la generación de diversos tejidos a sitios distales. En mujeres con leucemia que recibieron células de médula ósea de hombres, se detectaron hepatocitos con cromosoma Y, que fueron relacionadas con el trasplante de células hematopoyéticas⁴⁸. La transdiferenciación de células hematopoyéticas de circulación hacia hepatocitos, se ha implicado en receptores masculinos de hígados femeninos. No sólo las células tallo derivadas de médula ósea, sino también las movilizadas a la circulación con G-CSF tienen la capacidad de contribuir a la generación de varios órganos, y se han encontrado en piel e hígado de los receptores. También se ha descrito quimerismo entre donador no relacionado (mujer), con el receptor hombre en trasplante de corazón⁴⁹. Estudios *postmortem* revelaron una proporción sustancial de miocitos y capilares con el cromosoma Y. Los beneficios clínicos han sido reportados en pacientes con enfermedad isquémica cardíaca, e isquemia distal tratados con infusión autóloga de células tallo de médula ósea, dentro de las arterias coronarias o liberadas directamente en el músculo afectado, mejorando la función del miocardio y la neo-angiogénesis; esto sugiere no solo la capacidad de las células tallo para generar

miocitos o progenitores endoteliales sino probablemente también, sintetizar los factores de crecimiento respectivos^{50, 51}.

La capacidad de las CMH para migrar de la sangre a la médula ósea (“homing”) y de médula ósea a sangre (movilización), se ha conservado a través de la evolución. El flujo constante de las CMH en el adulto, puede proveer un reclutamiento inmediato de células progenitoras para iniciar la hematopoyesis extramedular en caso de pérdida de sangre.

La migración de CMH inicia por la función de células de adhesión y receptores de quimiocinas. El “homing” de CMH a médula ósea se inicia por las células endoteliales a través de selectinas vasculares (selectina E y/o P) e integrinas, como la molécula de adhesión muy tardía (VLA-4, 4 1). Las células endoteliales de médula ósea expresan constitutivamente el ligando VLA-4, molécula 1 de adhesión de células vasculares (VCAM-1) y E-selectina. Un quimioatrayente, el SDF-1, puede afectar directamente la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas y aumentar la adhesión a receptores⁵².

En relación con el aislamiento de las células tallo hematopoyéticas, se han empleado varios métodos para separarlas de las otras células de la sangre y médula ósea, basados en las características físicas tales como tamaño y densidad de flotación; las técnicas empleadas incluyen: velocidad de sedimentación, centrifugación en gradiente de densidad y en contra de un flujo; estas células también han sido separadas con base en su carga eléctrica por electroforesis; o por sus propiedades de adhesión de la membrana a materiales como vidrio, lana o sustancias como lectinas. El desarrollo de la tecnología de separación de las células por fluorescencia activada “fluorescence-activated cell sorter” (FACS), ha incrementado significativamente la capacidad para purificar poblaciones celulares⁵³.

Una contribución para la definición y aislamiento de las células tallo hematopoyéticas humanas, fue el desarrollo de los anticuerpos monoclonales que reconocen a la molécula de superficie CD34, la cual es una glicoproteína que está presente en la

superficie de 0.5-5.0% de las células de la médula ósea humana. En las fracciones enriquecidas con células CD34⁺ del humano, la médula ósea contiene virtualmente todos los progenitores hematopoyéticos^{54, 55}.

Los grupos de diferenciación o CD (del inglés *cluster differentiation*), es un término utilizado para la identificación e investigación de moléculas celulares de superficie presentes en leucocitos. Las moléculas CD pueden actuar en numerosas vías como receptores o ligandos (molécula que activa a un receptor) importantes en la célula que inicia una vía de señalización. También los CD pueden tener funciones de adhesión celular.

La utilización del CD34 como marcador de CMH, ha sido difícil de estandarizar debido a dos aspectos principales: a) la inespecificidad debida a la presencia de un alto número de progenitores linfoides B (CD19⁺ y CD34⁺) pueden provocar un resultado falso-positivo en cuanto al contenido de CMH de un injerto ⁵⁶ y b) la expresividad variable dada por la variación en los niveles de CD34⁺ puede ser influenciada por la estimulación de citocinas e integrinas ⁵⁷.

A pesar de todo, el CD34 constituye hasta el momento, el marcador más útil y práctico para cuantificar la CMH según lo confirman sus perfiles genéticos. Las células CD34 negativas expresan preferentemente genes de diferenciación neuronal, epitelial y muscular; en tanto que las células CD34 positivas expresan sobre todo genes responsables de su movilización y alojamiento en la médula ósea, tales como receptores de quimiocinas e integrinas. Esta evidencia molecular explica la mayor capacidad de injerto de estas células ⁵⁸.

Como sucede en el ratón, existen en el humano dos tipos celulares con capacidad de repoblar a la médula ósea, unos a corto y otros a largo plazo y su potencial de autorreplicación es heterogéneo ⁵⁹. La combinación de marcadores de membrana como la glicoproteína CD133 presente en las CMHs CD34 positivas y negativas, como indicadora de la fase G0 de ciclo celular, permite identificar una población de

CMHs con una capacidad formadora de colonias *in vitro* de más de 100 millones de veces, siendo éste, hasta la fecha, el mejor protocolo de purificación de CMHs ⁶⁰.

Para fines de trasplante hematopoyético debe continuar el uso del CD34 como marcador de células hematopoyéticas con capacidad de repoblar la médula ósea, mientras no se cuente con métodos más prácticos y efectivos para identificar las CMHs, ⁶¹ pues aunque esto parece lograrse con la selección basada en el CD133 y la actividad citosólica de la enzima aldehído deshidrogenasa que incluye CMHs CD34+, y células CD34-CD38-CD133+. Todavía faltan estudios clínicos controlados que validen este hecho. ^{62, 63}

La población humana CD34+ representa un grupo inmaduro y heterogéneo de células, que pueden diferenciarse inducidas por factores de crecimiento y que intervienen en la regulación de la angiogénesis y hematopoyesis, como se ha demostrado en varios estudios. La importancia del antígeno CD34 radica en su adhesión y capacidad de migración ⁶⁴.

Por otro lado, se ha detectado la expresión de genes reguladores de angiogénesis como: angiopoyetina-1 (Ang-1), angiopoyetina-2 (Ang-2) y su receptor Tie-2, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 en células CD34+/CD133+ de cordón umbilical ⁶⁴.

El CD34 es un antígeno específico asociado con células tallo y progenitoras, también es expresado en células endoteliales de pequeños vasos y en fibroblastos embrionarios. La densidad del antígeno CD34 es elevada en progenitores tempranos y disminuye progresivamente en las células maduras. La población CD34 contiene población de células tallo primitivas que por sí mismas se reconstituyen. CD133 es un nuevo antígeno de células tallo, una glicoproteína con peso molecular aproximado de 120 kD. Los ensayos *in vitro* de clonogenicidad han demostrado que la población doble positiva de CD34+CD133+ de médula ósea adulta, contienen la mayoría de las unidades formadoras de colonias granulocito-monocito (CFU-GM) ^{65, 66, 67, 68}.

En el sistema hematopoyético, la expresión de CD133 está restringida a un subgrupo de células tallo y progenitoras CD34+ en hígado fetal humano, médula ósea, sangre de cordón umbilical y sangre periférica. Adicionalmente, CD133 se expresa en una pequeña porción de células CD34- en estos tejidos. La molécula es un antígeno nuevo de superficie celular 5-transmembranal. El homólogo murino, denominado **prominina**, se expresa en células de epitelio y neuroepitelio, el cual fue identificado recientemente. Sólo en el 0.2% de las células lin-CD34- de sangre de cordón se encontró la expresión de CD133 y dentro de esta población, solo CD133+ es capaz de repoblar cultivos *in vitro* de ratón ⁶⁹.

Las células tallo hematopoyéticas se encuentran normalmente en un número muy limitado en la circulación periférica (menos del 0.1% de todas las células nucleadas). Las células tallo de sangre periférica (PBSCs) son CD34+CD38- y no expresan un complemento total de cualquiera de los marcadores de linaje específico mieloide o linfoide (Lin-), pero expresan el antígeno de diferenciación Thy-1. Estas células CD34+/ CD38-/ Lin-/ Thy-1+ son las responsables e iniciadoras de las colonias en cultivos a largo plazo (LTC-IC).

Las células tallo derivadas de médula ósea movilizadas a sangre periférica, expresan antígenos de diferenciación de linaje específico (CD13, CD33), tienen una menor proporción de células en fase S (son menos activas en ciclo celular) y son menos activas metabólicamente (en ensayos de retención de rodamina y menor positividad a CD71). Además, PBSCs demostraron una alta clonogenicidad en ensayos LTC (cultivos a largo plazo). El método más reproducible de cuantificación y colección de células tallo CD34+ es la citometría de flujo ^{69, 70}.

Las células que mantienen fenotipos hematopoyéticos primitivos (CD34+CD38-) realizan la función de repoblación secundaria a trasplante. La expresión de CD133 provee CMH con función de repoblación a largo plazo y puede ser una alternativa para seleccionar células CD34 ⁷¹.

El origen de las células tallo se ha propuesto en varios protocolos, donde se han determinado los antígenos de las células mononucleares de sangre de cordón umbilical y médula ósea CD34, CD133, CD117, CD164, Thy-1 ó CD38 y el antígeno intracelular CD34 por citometría de flujo y microscopía confocal laser dual para la expresión del antígeno en la membrana. Los niveles variables de inmadurez fueron detectados en poblaciones de cordón umbilical y médula, usando el antígeno CD34 interno y externo. El CD34 interno (intCD34+) puede ser detectado en co-expresión con CD133+. Un pequeño grupo de células expresan CD38 y no CD34 externo. Usando CD117, Thy-1, CD164 y CD133 se demostró la presencia de una variable primitiva dentro de las poblaciones CD34- externo. Es decir, se detectó la presencia de células que carecen de CD34 pero que poseen CD133 las cuales tienen importancia clínica en la purificación de las células tallo humanas ⁷².

Las células CD133+ se han utilizado en trasplante hematopoyético y en terapias cardíacas mejorando la perfusión sanguínea. La población CD133+ tiene la capacidad para desarrollarse dentro del linaje endotelial, según se ha descrito mediante inserción cardíaca en las capas dañadas de los capilares, donde estos son regenerados por las células CD133+ que migraron al sitio dañado ⁷².

En la circulación se presentan de 100 a 400 células tallo aproximadamente. Durante la terapia de trasplante, las células se mueven dentro y fuera de los sitios del nicho. El movimiento de CMH de la médula ósea ocurre tempranamente durante la formación del hueso. El cartílago del hueso inicialmente llega a ser infiltrado por vasos, las células fagocíticas consumen el cartílago y son llamados condroclastos. Los osteoblastos llegan, pero las CMH arriban después de la mineralización de la matriz extracelular. Estudios realizados *in vivo* han demostrado la localización endosteal de las CMHs, así como *in vitro* la capacidad de las células osteoblásticas para secretar citocinas y soportar las células primitivas de la sangre. Los componentes del nicho pueden llegar a ser contribuyentes potenciales a los estados de disfunción de las células tallo, lo cual puede ocasionar estados de falla, displasia o neoplasia ⁷³.

La diferenciación de células mesodérmicas a angioblastos y subsecuente diferenciación endotelial, se creía que ocurría exclusivamente en el desarrollo embrionario. Asahara y cols. (1997), purificaron células progenitoras hematopoyéticas CD34+ de adultos pudiendo diferenciarse *ex vivo* a fenotipo endotelial y fueron llamadas **células progenitoras endoteliales (EPCs)**, las cuales se incorporaron a vasos sanguíneos y sitios isquémicos. En otro estudio, se usaron células tallo hematopoyéticas inmaduras con marcador CD133+, y demostraron que éstas pueden diferenciarse a células endoteliales ⁷⁴. Quirici y cols. (2001), reportaron un método para obtener células endoteliales derivadas de células CD133+ de médula ósea. Después de tres semanas de cultivadas, las células formaron monocapas y presentaron morfología endotelial. Todas las células fueron CD45-, CD14- y expresaron marcadores endoteliales (VEA-1, VWF, P1H12, CD105, E-selectina, VCAM-1 y VE-cadherina). Las células endoteliales tienen gran capacidad proliferativa, pueden ser activadas por citocinas inflamatorias y ser superior a fibroblastos que soportan la hematopoyesis. Los progenitores de células endoteliales pueden contribuir a la neo-angiogénesis ⁶⁸.

La médula ósea posnatal contiene EPCs que tienen la capacidad de migrar a la circulación periférica y a diferenciarse a células endoteliales maduras. El aislamiento de las EPCs de la médula ósea, sangre periférica, hígado o cordón umbilical fetal por medio de cultivos de adherencia o microcámaras ya se ha descrito. En general, las EPCs se caracterizan por la expresión de 3 marcadores: CD133, CD34 y el receptor-2 del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR-2). Durante la diferenciación las EPCs pierden CD133 y comienza la expresión de CD31, cadherina vascular endotelial y factor von Willebrand. Al parecer las EPCs participan en la reparación endotelial y neovascularización de órganos isquémicos. ⁷⁵ Estudios clínicos usando EPCs para la neovascularización, inician los mecanismos de estimulación o inhibición de la diferenciación de más EPCs *in vivo*, y las señales producen su migración y "homing" a sitios del endotelio dañados o al tejido extravascular, aunque hasta el presente no son bien conocidos. Se ha reportado la circulación temprana de EPCs CD133+/CD34+/VEGFR-2 en humanos sanos, en el 0.002% del total de las

células mononucleares de sangre periférica, correspondiendo a aproximadamente de 70 a 210 células / mL ^{66, 74}.

Se han aislado células CD34+ de sangre de cordón e inyectado en músculo aductor isquémico de extremidades, dando origen a endotelio y células de músculo esquelético en ratón ⁷⁶.

La evaluación del número de células CD34+ por sí mismo no es un indicador confiable de la eficiencia de la clonación o su potencial de expansión. Sin embargo, la cuantificación de células CD34+CD38- puede ser usado también para predecir el número de CFU's y también la capacidad de expandir CMH's en estroma y libre de suero. El cultivo de células CD34+ de cordón umbilical, es necesario para expandirlas e infundir seleccionadamente éste tipo de células ⁷⁷.

El uso de células progenitoras purificadas ofrece varias ventajas en trasplante autólogo y alogénico. Comúnmente el antígeno CD34+ se usa en la purificación de los progenitores hematopoyéticos. El antígeno CD34 se coexpresa en la leucemia linfoblástica aguda y el antígeno CD133 no lo está en células malignas, por lo que es más útil éste en el trasplante autólogo. Todos los pacientes presentan una rápida y completa reconstitución después de la terapia mieloablativa. Sin embargo, todavía falta evaluar la capacidad de las células CD133+ para inducir hematopoyesis a largo plazo. El uso racional de células tallo en trasplante alogénico se basa en la presencia de linfocitos T y B que conllevan a la enfermedad injerto contra huésped y debido a esto, es más importante la purificación. La recuperación media de células CD133+ después de la selección positiva fue del 69% que es similar a CD34+. En la movilización periférica de células tallo hematopoyéticas de donadores sanos, pueden ser purificadas a gran escala y esto ser útil en el estudio de su función biológica *in vitro* e *in vivo* ⁷⁸.

Como la primera fuente tisular para la obtención de las células madre hematopoyéticas fue la médula ósea (MO), el trasplante de células hematopoyéticas (TCH) fue llamado persistentemente trasplante de médula ósea (TMO); sin embargo,

después de un largo tiempo, el término resultó inadecuado cuando esas células se obtuvieron de otras fuentes, como la sangre periférica (SP) y el cordón umbilical (CU). Con el avance del conocimiento y la purificación de diversos tipos de células madre, ese campo terapéutico creció y se denomina actualmente terapia celular. Esta rama de la medicina comprende, todos aquellos tratamientos que utilizan células madre para la reconstrucción estructural o funcional del organismo afectado, como la terapia celular de la reparación cardíaca, de la isquemia de los miembros inferiores, de la sección medular, etc. La terapia celular ha incorporado otras células, por ejemplo las células madre mesenquimales y otras fuentes como el tejido adiposo⁶.

Las células troncales son un grupo específico de células indiferenciadas que tienen un potencial proliferativo elevado y que presentan dos características fundamentales: son capaces de autorrenovarse, es decir, de formar células idénticas a las de origen, y tienen la capacidad de generar uno o más tipos celulares que desempeñan funciones especializadas en el organismo. Dependiendo de su origen, las células troncales pueden dividirse en células troncales embrionarias y células troncales somáticas. Las **células troncales embrionarias (CTE)** son células pluripotenciales, es decir, cada una de ellas es capaz de generar todos los tipos celulares del organismo. Por otra parte, las **células troncales somáticas** son, en su mayoría, multipotenciales ya que pueden generar una gran variedad de tipos celulares dentro de un tejido específico.

El estudio de las **células troncales mesenquimales (MSC)**, por sus siglas en inglés), comenzó en la década de los 70's y estuvo enfocado primordialmente al conocimiento de su papel en la formación del estroma hematopoyético. Las MSC se localizan principalmente en la médula ósea y tienen la capacidad de dar origen a diversos tipos celulares (plasticidad), como los fibroblastos medulares o células reticulares, adipocitos, mioblastos, osteoblastos y condrocitos.^{4,79}

Las células de médula ósea contienen progenitores de fibroblastos, que pueden ser trasplantados junto con las células hematopoyéticas. Owen y cols. demostraron que

estas células tienen la capacidad de originar tejido óseo, cartilaginoso y conjuntivo y que a partir de una pequeña cantidad de células de médula ósea inoculadas en cámaras de difusión en modelos *in vivo*, se genera una gran cantidad de células estromales, lo que deja claro el gran potencial de proliferación y diferenciación de estas células ⁸⁰.

Las MSC no expresan los antígenos de células hematopoyéticas como: CD11b, CD14, CD31, CD34, CD43, CD45, CD56, CD68 y CD133; siendo positivos únicamente para el marcador de células hematopoyéticas CD90. Las MSC al ser estimuladas con IL-6, IL-11 y LIF producen bajos niveles de G-CSF y GM-CSF.

Las células troncales mesenquimales de humano pueden ser expandidas *in vitro* y trasplantadas en sujetos, sin causar efectos adversos. Se ha utilizado para mejorar el injerto de otras células; en terapia celular para promover la angiogénesis; regeneración del tejido del menisco y una disminución en la destrucción del cartílago; en la osteogénesis imperfecta, el infarto al miocardio y la enfermedad de Parkinson ⁷⁹.

El trasplante de médula ósea (TMO) es el implante de tejido hematopoyético sano en las cavidades de la médula ósea de un receptor, a quien previamente se le ha erradicado su población hematopoyética, mediante la administración de un tratamiento citotóxico con dosis altas de quimioterapia y / o radioterapia, con lo que se intenta erradicar el tumor y tiene como efecto secundario deseado, la destrucción de su médula ósea. La recuperación de la actividad hematopoyética e inmunológica se consigue al suministrar médula ósea de un donador compatible (allogénico) o la del propio paciente (autólogo) previamente extraída. El primer TMO exitoso se realizó en los hospitales de la Universidad de Minnesota, Estados Unidos en 1968, en un niño con inmunodeficiencia combinada grave (IDCG o SCID), y utilizando a un gemelo como donador ⁸¹.

En 1973, en el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de Nueva York, el primer trasplante exitoso de un donador no relacionado, en un niño de 5 años de edad con

síndrome de inmunodeficiencia combinada severa (SCID). Los primeros sobrevivientes a largo plazo se reportaron al final de la década de los sesentas, durante los sesentas se trataban sólo pacientes con leucemias en quienes habían fracasado otros tratamientos y los resultados fueron muy pobres pero hubo algunos pacientes que se curaron. Durante la década de los ochentas mejoró el control de las infecciones, el uso de sangre periférica como fuente de células progenitoras y la habilidad de seleccionar a los donadores, incluso entre personas no relacionadas, lo que resultó en una amplia aplicación del método ⁸¹.

En México en 1980 el Dr. Ricardo Sosa y sus colaboradores hicieron el primer trasplante en el Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán (INNNS), seguido de varios aislados en el Centro Médico Nacional del I.M.S.S., el Hospital Universitario de Nuevo León y en el propio INNSZ y otros sitios con resultados muy pobres, por lo que motivó su suspensión hasta 1995. Las instituciones que trasplantan e informan sus datos en el IBMTR (Internacional Bone Marrow Transplant Registry) y en el ABMTR (American Bone Marrow Transplant Registry) son el Centro Médico del Norte (Monterrey), el Centro Médico “La Raza” (México D.F.), el Hospital Ángeles de las Lomas (Huixquilucan, Méx.), Hospital San José (Monterrey), Instituto Nacional de Cancerología (México D.F.), Hospital Universitario de Monterrey (Monterrey) y Centro de Hematología y Medicina Interna (Puebla). Sin embargo, hay otros equipos de trabajo que no informan sus resultados a los organismos antes mencionados pero tienen un programa de trasplante de médula ósea activo como: Centro Médico Nacional Siglo XXI (México D.F.), Centro M. Ávila Camacho (Puebla), Centro Médico de Occidente (Guadalajara), Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición “Salvador Zubirán” (México D.F.), Hospital “20 de Noviembre” (México D.F.) y Hospital Infantil de México (México D.F.). El sitio que ha sumado mayor número de trasplantes de células hematopoyéticas es el Centro Médico “La Raza” del IMSS ⁶.

El trasplante de células hematopoyéticas en un inicio se desarrolló como tratamiento de “último recurso”, en la terapia efectiva de los pacientes con una variedad de enfermedades hematológicas. Los avances en este campo han reducido

importantemente la morbilidad y mortalidad del trasplante, y esto se evidenció más notablemente cuando se introdujeron las células progenitoras de sangre periférica (CPSP), como una fuente de células progenitoras hematopoyéticas, aunque las complicaciones como la enfermedad del injerto contra huésped (EICH), enfermedad veno-oclusiva (EVO), infección y recaída, siguen siendo los principales retos a vencer en los campos de la biología celular, hematología e inmunología ¹⁹.

Las primeras donaciones de células hematopoyéticas de la médula ósea se realizaron bajo anestesia general; la recolección se hacía puncionando el esternón y las crestas iliacas, siendo mayor la cantidad de células nucleadas obtenidas de la cresta iliaca posterior que de la anterior y que del esternón. La cantidad de células de la sangre periférica que contaminan la médula aspirada se calculó con la cuenta de leucocitos de la sangre periférica, y el volumen conocido del material aspirado, siendo generalmente de 17 a 24×10^9 células ⁸².

En un reporte multicéntrico de 493 donadores de médula ósea bajo anestesia general en el 77.8% de los casos, la espinal en el 7.5% y la epidural en el 14.6%. La mediana de duración de la anestesia fue de 110 minutos con valores extremos de 30 a 355 minutos, la mediana del tiempo para colectar la médula fue de 60 minutos con variación de 8 a 196 minutos. La mediana del volumen extraído fue de 1050 mL con una variación de 180 a 2983 mL. Los donadores fueron transfundidos con una unidad de sangre autóloga en 26.8%, con dos en 51.3% y con tres o más en 11.7%. El tiempo de hospitalización fue menor a 18 horas en 14.8%, de 18-36 horas en 41.1% y mayor de 36 horas en 44.2%. En la encuesta que se realizó después del procedimiento, 28.9% de los donadores admitió haber tenido un efecto secundario o complicación secundaria a la donación de médula ósea. El 80.7% se recuperó de las molestias de la donación en el día 19 después de la donación, pero 12.6% dijo que no se había recuperado completamente en el día 30. Los efectos secundarios medidos 48-72 horas después de la donación de médula ósea fueron los siguientes: cansancio, dolor en el sitio de punción, vómito y hemorragia. La probabilidad de

muerte entre donadores sanos de células hematopoyéticas ha sido estimada en 1:10,000 aunque no ha sido posible confirmar la causa-efecto de donación-muerte ⁸³.

Una colección típica puede requerir de unas 200 a 300 aspiraciones de médula, obtenidas a través de varias punciones e incisiones en hueso y en piel. Se define como una buena colección cuando la cantidad total de células extraídas es igual o superior a 3.6×10^8 /kg de peso del receptor.

Las células progenitoras hematopoyéticas están presentes después del nacimiento en la sangre de las personas con hematopoyesis normal y estable, y existen variaciones diurnas normales, encontrándose en mayor proporción a las 15 horas. Existe solo una octava parte de ellas en sangre comparándolas con las que se encuentran en médula ósea ⁸⁴.

Aunque desde los años 70's se había descubierto que la movilización de progenitores hematopoyéticos hacia la sangre se podía obtener en personas sanas empleando ACTH o endotoxina, también se sabía que ese aumento equivalente a 2-4 veces el nivel basal, era transitorio y también se conocía que la quimioterapia producía un efecto movilizador de células progenitoras hasta de 20 veces el nivel basal, sugiriendo su utilización potencial en trasplante autólogo. En 1980 se logró estandarizar el método de recolección de progenitores hematopoyéticos por aféresis de flujo continuo en 35 voluntarios adultos ^{85, 86}.

En la década de los 90's con la introducción de los factores estimuladores de colonias recombinantes humanos como el G-CSF, se logró aumentar hasta 58 veces la cantidad de precursores ⁸⁷.

El trasplante de células hematopoyéticas es una técnica que puede restablecer la función medular de los pacientes que sufrieron una lesión grave en dicho sitio. Una lesión medular puede suceder debido a una falla medular primaria, a la destrucción de la médula ósea originada por una enfermedad, o a una exposición intensiva a productos químicos o la radiación ¹ (Tabla 1).

Tabla 1. Indicaciones de trasplante de células tallo.

ENFERMEDAD	ALOGÉNICO AUTOLOGO	
Leucemias		
Mieloide aguda	+	+
Linfoblástica aguda	+	+
Mieloide crónica	+	+/-
Linfocítica crónica	+	+/-
Linfomas		
No Hodgkin	+	+
Hodgkin	+/-	+
Desórdenes de células plasmáticas		
Mieloma	+	+
Amiloidosis	-	+
Tumores sólidos		
Cáncer de mama	+/-	+
Cáncer de ovario	-	+
Cáncer testicular	-	+
Cáncer de células renales	+	-
Tumores de cerebro	-	+/-
Neuroblastoma	+/-	+
Sarcoma de Swing	-	+
Desórdenes de médula ósea adquiridos		
Anemia aplásica severa	+	-
Síndrome mielodisplásico	+	+/-
Desórdenes mieloproliferativos	+	-
Desórdenes congénitos		
Inmunodeficiencias	+	-
Wiskott-Aldrich	+	-
Anemia de Fanconi	+	-
Talasemia	+	-
Anemia drepanocítica	+/-	-
Osteopetrosis	+	-
Enfermedades de almacenamiento	+/-	-
Enfermedades autoinmunes		
Esclerodermia	+	+
Artritis reumatoide	+	+
Lupus sistémico	+/-	+
Esclerosis múltiple	-	+

- +: indicación establecida; +/-: usada en pequeño número de pacientes; -: no usada.
- NOTA: Se hace referencia a esta tabla para ver las múltiples aplicaciones del trasplante de células progenitoras y no sólo en padecimientos hematológicos.¹

El trasplante de médula ósea desde el punto de vista terapéutico tiene la finalidad de: a) aportar células con capacidad de auto renovación, como en la aplasia medular, las inmunodeficiencias severas y en las alteraciones de células fagocíticas; b) eliminar la población tumoral o con alteración genética y sustituirla por médula ósea normal.

Las células tallo hematopoyéticas que normalmente circulan en la sangre periférica en muy bajas concentraciones, se pueden incrementar con factor estimulante de colonias y/o quimioterapia. A las células tallo obtenidas después de la aplicación del factor estimulante de colonias se les ha llamado **células progenitoras de sangre periférica**. En la actualidad el tipo de trasplante que se realiza con mayor frecuencia es el de cosecha de células mononucleares de sangre periférica (TCMNSP) autólogo o alogénico.

Existe una variedad de factores estimulantes de colonias que son efectivos como agentes movilizadores: el factor estimulante de colonias-granulocíticas, el factor estimulante de colonias granulocito-monocito, interleucina-3 (IL-3) y trombopoyetina (TPO). El régimen más común de movilización consiste en la administración de G-CSF a 10 µg/kg/día, seguida por aféresis en el 4° y 5° día. Se han estudiado una variedad de dosis y esquemas de administración de CSF solo o en combinación con quimioterapia. El principal efecto secundario es el dolor óseo relacionado con la aplicación del medicamento, que se resuelve al suspender éste y que se controla con acetaminofén o antiinflamatorios no esteroideos. Los efectos secundarios graves son raros y los más frecuentes han sido: mialgia, cefalea, malestar físico, insomnio, náusea, sudoración, síntomas gripales, anorexia, fiebre, escalofrío y vómito ⁸⁸.

La cantidad de células mononucleares y de células progenitoras hematopoyéticas que se recomienda administrar para asegurar un injerto estable, es mayor que cuando se utiliza médula ósea, siendo de más de 7×10^8 células mononucleares por kg de peso, y más de 2×10^6 células CD34⁺/ kg de peso del paciente respectivamente.

Las ventajas potenciales del trasplante de células mononucleares de sangre periférica son principalmente dos: a) las células mononucleares de sangre periférica se pueden obtener sin el requisito de punciones múltiples de médula ósea (m.o.) bajo anestesia general en un quirófano, y b) la recuperación hematológica es más rápida que cuando se utiliza médula ósea lo cual se traduce en menores problemas infecciosos, menor necesidad y duración de la hospitalización y menor requerimiento transfusional. Las desventajas son mínimas para el donador como el dolor óseo, malestar general, cefalea y tendencia a la trombosis, todo ello ocasionado por la administración del G-CSF ⁸⁹.

En el caso del trasplante autólogo las células mononucleares de sangre periférica se someten al proceso de criopreservación utilizando dimetilsulfóxido (DMSO), con la finalidad de mantener la viabilidad de las células progenitoras hematopoyéticas a temperatura de -180°C (en nitrógeno líquido), después de un proceso de congelación progresivo, para poder conservarse durante varios años, ya que se detienen todas las reacciones metabólicas. La descongelación de las células mononucleares se realiza en forma rápida entre $37 - 40^{\circ}\text{C}$ y se administran inmediatamente al paciente ⁹⁰. En el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional "La Raza", para el trasplante alogénico no se practica la criopreservación de las cosechas ya que se transfunde inmediatamente al paciente y solo en caso de que la cantidad de células mononucleares sea muy elevado, se criopreserva una parte a criterio del médico tratante para que en caso de recaída o falla de injerto, sea descongelada y aplicada posteriormente.

La terapia de acondicionamiento tiene dos funciones: a) producir la inmunosupresión necesaria del huésped para que injerte la médula ósea parcial o totalmente compatible con los antígenos de histocompatibilidad (HLA); b) la destrucción de la clona celular tumoral que permita la erradicación de la enfermedad, y c) la implantación de la médula ósea normal en un espacio libre de células tumorales.

La radioterapia se administra en varias dosis diarias más pequeñas. Esta técnica se denomina fraccionamiento de la dosis. Los fármacos y la radioterapia se administran

durante la semana anterior al trasplante. La cantidad de días de tratamiento y la secuencia de administración dependen del régimen de acondicionamiento específico.

La obtención de células madre de la médula ósea para un trasplante requiere que el donante adecuado sea sometido a un examen de salud minucioso, que incluye electrocardiograma, radiografía torácica, química sanguínea y la confirmación de que los conteos sanguíneos son normales. Se realizan análisis de sangre al donante para asegurarse de que no sea portador de los virus de la hepatitis B, C, inmunodeficiencia humana (VIH), ni citomegalovirus (CMV); así como pruebas de histocompatibilidad con 6/6 haplotipos ¹. El programa Nacional de Donantes de los Estados Unidos de América (NMDP), recomienda que debe haber histocompatibilidad alélica para HLA-A, -B, -C, y -DRB1 aunque ello no contraindica un trasplante en aquél caso donde sólo hay histocompatibilidad parcial ⁹¹.

El trasplante alogénico de células tallo (SCT) es más complejo. La sangre periférica contiene más linfocitos T que la médula ósea, lo cual incrementa el riesgo de enfermedad injerto contra huésped después de SCT alogénicas. Los linfocitos T de la médula ósea o de la sangre de un donante causan la reacción injerto contra huésped. El reconocimiento del sistema inmune de los polimorfismos codificados genéticamente entre miembros de la misma especie, se define como alo-reconocimiento mientras que alo-respuesta define a los mecanismos efectores del sistema inmune que participan en la reacción en contra de esos polimorfismos. Estos dos conceptos tienen su fundamento en las diferencias que existen entre antigenicidad (antígeno capaz de ser reconocido por el sistema inmune), e inmunogenicidad (antígeno capaz de evocar una respuesta inmune). De tal manera que la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa participan en la alo-respuesta pero son los linfocitos T, las principales células involucradas en este tipo de respuesta, por lo tanto, el alo-reconocimiento implica que las células T de un individuo reconocen como extrañas a las moléculas del MHC de un segundo individuo (alogénico), y la alo-respuesta incluye la activación de las células T con la subsiguiente respuesta efectora, liberación de citocinas por parte de los linfocitos T

CD4 y la actividad citotóxica por parte de los linfocitos T CD8 que van a eliminar a aquella célula, tejido u órgano que exprese las moléculas MHC-I y MHC-II alogénicas ⁹².

Se considera que hasta 90% de las células T involucradas en la alo-respuesta se activan como resultado del reconocimiento directo de los complejos MHC-alogénico/péptido, y son las responsables de la EICH aguda. Con el tiempo, esta respuesta disminuye debido a la muerte natural (apoptosis) de células dendríticas alogénicas; entonces estas células apoptóticas son fagocitadas por las células dendríticas propias, las cuales van a presentar péptidos provenientes del procesamiento de las moléculas MHC alogénicas, de tal manera que el alo-reconocimiento indirecto está involucrado en el establecimiento de la EICH crónica. El alo-reconocimiento indirecto y el alo-reconocimiento de antígenos menores también participan en la EICH crónica. Para el primer caso, las MHC alogénicas se pueden transferir de las células dendríticas propias durante el contacto celular o bien mediante exosomas, que son pequeñas vesículas que acarrean moléculas del MHC y son liberadas por las células dendríticas alogénicas. Los antígenos menores de histocompatibilidad son proteínas codificadas por genes mitocondriales, o codificadas en el cromosoma Y o bien por cualquier cromosoma autosómico. La importancia clínica del alo-reconocimiento de estos antígenos polimórficos no solamente se ha puesto de manifiesto durante la EICH crónica, observada en un paciente que recibió un alo-trasplante sino también, en aquellos casos de EICH en individuos que recibieron un trasplante HLA genotípicamente idéntico ⁹³.

A fin de reducir esta reacción, las células recolectadas de médula ósea o de sangre periférica que se usará para un trasplante, puede ser tratada con agentes que disminuyen la cantidad de linfocitos T trasfundidos con las células madre. Esta técnica disminuye la incidencia y la gravedad de la reacción injerto contra huésped ^{1, 50, 94}.

La alo-respuesta puede tener efectos benéficos cuando contribuye a eliminar las células tumorales mediante una respuesta conocida injerto contra leucemia (GVL);

así, la quimioterapia y/o radioterapia reducen el número de células malignas, y después del trasplante los linfocitos T del donador se van a encargar de eliminar células malignas residuales. Las siguientes observaciones apoyan el fenómeno GVL: 1. El riesgo de recaída es menor en aquéllos pacientes que desarrollan EICH, 2. Las recaídas son mayores en aquellos pacientes que recibieron el trasplante de su hermano gemelo, 3. La incidencia de recaídas se asocia con la administración de linfocitos T provenientes del donador original ⁹⁵.

Se considera que los antígenos menores de histocompatibilidad son los blancos de la respuesta GVL toda vez que con frecuencia esos antígenos se expresan preferentemente en células hematopoyéticas, de tal manera que se han descrito células T aloreactivas que reconocen específicamente antígenos de leucemia expresados en células hematopoyéticas, entre los que se encuentran el factor transcripcional 1 de Wilms, la molécula CD45, ciclina D1 y melan-A. Estas moléculas también se expresan en células normales, pero los estudios *in vitro* señalan que de manera selectiva, las células T sólo reconocen a células tumorales, tal vez porque estas células expresan elevados niveles de la proteína blanco de la respuesta ⁹⁶.

De dos a cinco semanas después del trasplante, el injerto de las células donadas se hace evidente por la aparición de leucocitos normales en la sangre del paciente, se hacen transfusiones de glóbulos rojos y plaquetas periódicamente hasta que las células madre trasplantadas restablecen la función medular.

La valoración del éxito del injerto se realiza después de un periodo de neutropenia, trombocitopenia y ausencia de reticulocitos; la recuperación de la hematopoyesis requiere de la administración de una cantidad adecuada de células progenitoras hematopoyéticas, y el fracaso de ésta puede depender de la administración de un número reducido de dichas células, o por un tratamiento de acondicionamiento insuficiente. De acuerdo con el criterio internacional de TMO, se considera que el injerto tuvo éxito cuando la cifra de neutrófilos totales (Nt) es mayor de $500 \times 10^6/L$, la de plaquetas (Pq) mayor de $50,000 \times 10^6/L$; que haya presencia y aumento de reticulocitos; además de que las cifras correspondientes a estas tres series deben

estar presentes y aumentar durante tres días, con el incremento consecutivo de ellas hasta lograr los valores normales en la sangre periférica (SP). La recuperación habitual de la hematopoyesis con GM-CSF se inicia con la aparición progresiva de monocitos, granulocitos, reticulocitos y plaquetas en la sangre periférica y ésta puede ser después del día 10-12 posterior a la infusión de las células mononucleares, dependiendo de la cantidad de éstas, mientras que en la médula ósea se adquiere mayor celularidad hasta los días 15 y 30 ^{97, 98, 99}.

La EICH aguda puede ocurrir poco después de que las células trasplantadas comiencen a aparecer en el receptor y comienza durante los primeros 90 días posteriores al trasplante.

La EICH crónica generalmente ocurre después del tercer mes posterior al trasplante y puede que no se desarrolle hasta un año o más después del trasplante. Tal como es el caso con la reacción aguda, los pacientes de edad avanzada son más propensos a padecer EICH crónica. Es más probable que ocurra en pacientes que previamente sufrieron una EICH aguda. ¹

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Cuál es la cantidad de células progenitoras CD133+ requeridas para un trasplante alogénico exitoso?

La cantidad de células progenitoras CD133+ requeridas para un injerto exitoso aún no se conoce pero se tiene referencia de la cantidad de células CD34+ que debe estar entre 2.0 a 6.0 céls x 10⁶/kg de peso del paciente para asegurar un injerto.

Las células CD133+ son de gran importancia debido a que se han relacionado con la supervivencia libre de enfermedad a largo plazo.

JUSTIFICACIÓN

- Cada año más de 30,000 personas son diagnosticadas de enfermedades hematológicas y el trasplante de células tallo puede ser la única oportunidad de vida.
- Las leucemias se presentan en 3 a 6 pacientes por cada 100,000 habitantes por año.
- Sólo 25% de la población tiene un familiar compatible como posible donador de células tallo.
- Por ello se requiere conocer de manera precisa, la cantidad de células progenitoras requeridas para un injerto exitoso particularmente en el caso de células CD133+.

HIPÓTESIS:

- Un trasplante alogénico exitoso depende de la cantidad de células progenitoras CD133+ infundidas al paciente.

OBJETIVO GENERAL:

- Determinar y relacionar la cantidad de células CD133+ requeridas para el injerto exitoso en el trasplante alogénico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar si el G-CSF es capaz de movilizar células CD133+ a sangre periférica.
- Determinar la cantidad y viabilidad de las células progenitoras hematopoyéticas CD133+ y CD34+ en las bolsas de cosecha de aféresis provenientes de donadores sanos estimulados con G-CSF, antes de la infusión.
- Realizar el seguimiento de la cantidad de neutrófilos, plaquetas y reticulocitos desde el acondicionamiento del paciente hasta el injerto del trasplante.
- Correlacionar la dosis de células CD133+ y CD34+ infundidas, con la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global.

II. MATERIALES Y MÉTODOS.

TIPO DE ESTUDIO:

Experimental, prospectivo, longitudinal.

MATERIAL BIOLÓGICO:

- Unidades de células mononucleares proporcionadas por el Departamento de Aféresis del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional “La Raza”, de individuos sanos (donadores) tratados con factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Se incluyeron 26 pacientes con diversos diagnósticos hematooncológicos a saber: Leucemia Mieloide Crónica (LMC, 8), Leucemia Mieloide Aguda (LMA, 6), Anemia Aplásica (AA, 5), Leucemia de Células Plasmáticas (LCP, 1), Linfoma no Hodgkin (LNH, 5) y Linfoma de Hodgkin (LH, 1) y sus donadores a los cuales se les realizó un trasplante alogénico de células tallo de sangre periférica, previa aprobación del Comité Multidisciplinario de T.M.O. del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional “La Raza” .
- Contar con el consentimiento informado por escrito y la autorización para la realización del trasplante. El presente estudio se apegó a todas las normas éticas nacionales e internacionales derivadas de la Declaración de Helsinki promulgada por la Asociación Médica Mundial (AMM) como una propuesta de principios éticos que sirven para orientar a los médicos y a otras personas que realizan investigación médica en seres humanos. Anexo I y II.
- Edad mayor de 18 y menor de 60 años.
- Pruebas para VIH, Hepatitis B y C, CMV negativos.
- Pacientes con estado de salud en remisión completa con una expectativa de vida mayor a 4 meses.

- Donadores sanos con venas de extremidades superiores en buen estado para la realización de aféresis.
- Estudios de laboratorio y de gabinete como: biometría hemática, química sanguínea, pruebas de función hepática, examen general de orina, biopsia de médula ósea.
- Los donadores y pacientes presentaron estudio de compatibilidad HLA (6/6 haplotipos- A, B, DR-).

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Que el paciente se encuentre en recaída.
- Que el paciente decida abandonar el programa de trasplante.
- Embarazo.

METODOLOGÍA.

Pacientes: Una vez que se autorizó por el Comité Multidisciplinario de Trasplante del HECMN “La Raza”, se tomó una muestra sanguínea basal en tubo Vacutainer con EDTA tanto en los pacientes como en los donadores histocompatibles y se determinó la expresión de los marcadores CD34, CD38, CD133 utilizando anticuerpos monoclonales CD34 acoplado a ficoeritrina (PE), CD38 acoplado a isotiocianato de fluoresceína, CD133/1-APC y analizando en citómetro de flujo modelo FACScalibur de Beckton Dickinson (BD) con el programa Cell Quest Pro versión 5.1.1. Apple System 7.6.1.; posteriormente, los donadores sanos se sometieron a la movilización de las células progenitoras de médula ósea a sangre periférica mediante la administración de G-CSF (Filgrastim), a una dosis de 10 µg/kg de peso durante 5 días. Al quinto día se volvió a medir la cantidad de células tallo CD34+, CD38+, CD133+ y si la cantidad de células CD34+ era $> 2 \times 10^6$ /kg se sometieron a cosecha. Posteriormente de las bolsas de cosecha se determinaron estos marcadores celulares y se realizaron los cálculos requeridos para conocer la cantidad de células progenitoras infundidas.

Métodos.

1. Cuenta de células nucleadas: Se obtuvo la cuenta de células nucleadas ($\times 10^9 / L$) en el equipo Sysmex XT-2000i ajustando la concentración de células nucleadas a 10^6 cel / $100\mu L$ en PBS de acuerdo con la fórmula:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2; \text{ para obtener } V_2 = (C_1 V_1) / C_2.$$

Donde:

C_1 = Concentración de células nucleadas contadas en el equipo Sysmex XT-2000i

V_1 = Volumen inicial de la alícuota de células.

C_2 = Concentración final de células a la que se quiere llegar.

V_2 = Volumen final al que se aforó.

2. Cálculo de células mononucleares viables obtenidas en la unidad de cosecha.

$$CMNX10^6/mL = (\text{mL de la unidad}) (\text{células nucleadas } \times 10^6/mL) (|\text{linfoc}|)$$

Donde:

$|\text{linfoc}|$ = número absoluto del porcentaje de linfocitos

3. Determinación de los diferentes marcadores de superficie de las células mononucleares por citometría de flujo en el FACSCalibur.

Preparación de las muestras para el análisis:

- Tinción: Se colocaron en un tubo Falcon 2052, 10^6 células mononucleares en $100\mu L$ de amortiguador de fosfatos BD (pH 7.35), se adicionaron $20\mu L$ de anticuerpo CD38 marcado con isotiocianato de fluoresceína, CD34 con ficoeritrina, $20\mu L$ de

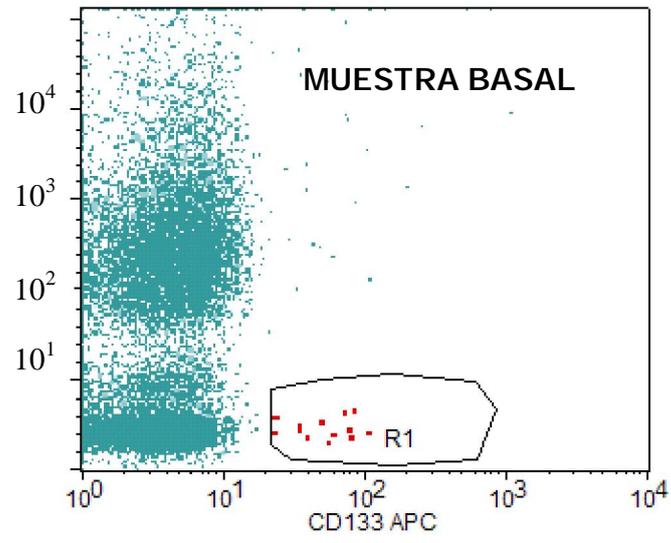
7AAD y CD133 con APC. Se mezcló e incubó durante 20 minutos a 4°C en la oscuridad. Transcurrido el tiempo, se adicionó 1 mL de solución de lisis BD (1: 10) y se mezcló e incubó durante 10 minutos a 4°C en la oscuridad; una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, se decantó y se adicionaron 2 mL de amortiguador de fosfatos y se resuspendió, se volvió a centrifugar a 3000 rpm durante otros 5 minutos, transcurrido el tiempo se eliminó el sobrenadante y se adicionó 0.8 mL de amortiguador de fosfatos más 0.2 mL de paraformaldehído al 1% en solución salina isotónica. Se resuspendió con vortex a baja velocidad y finalmente con el tubo en esas condiciones se adquirieron los datos.

- Adquisición de datos.

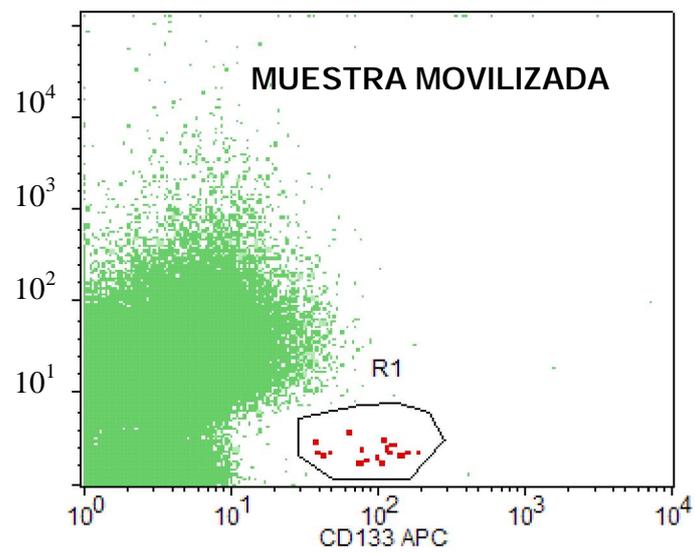
- Se adquirió en el programa de “Cell QuestPro” versión 5.1.1 “Apple System” 7.6.1, 100,000 eventos y se seleccionó la región para linfocitos de acuerdo al tamaño y complejidad de la célula progenitora hematopoyética que es similar a este*, haciendo esto con el tubo marcado como control de isotipo (autofluorescencia)

*Dichas características fueron observadas previamente cuando se cuantificó en el laboratorio de hematología la célula CD34⁺ con el método de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP).

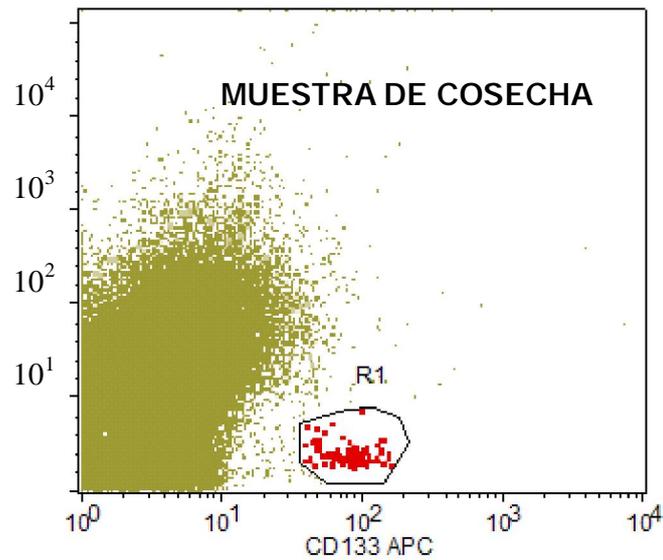
Se adquirió toda la población celular y se seleccionó la región negativa en el gráfico de puntos utilizando FL4 vs FL3 para 7AAD y positiva para CD133; realizando lo mismo para CD34. A partir de la región CD133+/7AAD-, se cuantificó el porcentaje de CD133 viable (Figura 2).



A) Muestra basal de donador sano.



B) Muestra movilizada de donador sano.



C) Muestra de bolsa de cosecha.

Figura No. 2. Gráficas de puntos de células CD133+ viables, en A) muestra basal de donador sano, B) muestra movilizada de donador sano, C) muestra de bolsa de cosecha.

Análisis.

- Se calculó la cantidad de células viables positivas para los diferentes antígenos CD34⁺, CD133⁺ y CD38⁺ x 10⁶ cel / kg de peso de la siguiente manera:

Cálculo:

$$\text{Céls X } 10^6/\text{mL} = (\text{Leucocitos X } 10^6/\text{L})(|\text{CD}|)(|\text{R}|)$$

- Se calcularon en las muestras de cosechas, las dosis de células viables que presentaron positividad para los antígenos CD34, CD133 X 10⁶ por kg de peso del donador sano, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Céls. X } 10^6/\text{kg} = [(\text{CMN X } 10^6/\text{mL})(|\text{CD}|)(|\text{R}|)(\text{Vol.}) \div \text{Peso(kg)}]$$

Donde:

| CMN | = Células mononucleares cuantificadas en biometría hemática.

|CD| = Número absoluto del porcentaje obtenido para cada antígeno de superficie.

| R | = Valor absoluto del porcentaje de la región.

Vol = Volumen de la bolsa de cosecha en mL

Peso = peso del paciente en kg.

Análisis estadístico. Se determinaron los valores absolutos de las poblaciones celulares CD34+38-, 34+38+, 34+133-, 133+38-, 133+38+, 133+34-, 133+34+ en las muestras basales de paciente y donadores, movilizada y cosecha de donadores. Se compararon los valores promedios de las muestras basal del paciente y donador utilizando la prueba “t de student” para muestras independientes, así como la muestra basal con la movilizada del donador (prueba “t pareada”) para obtener el valor de P y determinar la existencia de diferencias significativas.

Se determinaron las dosis promedio de CD34+ y CD133+ infundidas a los pacientes y se calculó el intervalo de confianza al 95%. Posterior al trasplante se hizo un seguimiento de los pacientes para determinar el día de injerto de las líneas celulares.

Se efectuó una correlación del tiempo de injerto de las series granulocítica, eritroide y plaquetaria con las diferentes dosis de células infundidas. Se hizo el seguimiento de los pacientes postrasplantados para evaluar la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global a largo plazo.

Se evaluó la presencia y tipo de EICH agudo respecto a las dosis infundidas y su frecuencia.

Mediante gráficas de Kaplan-Meier se determinó la mediana de la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad.

Se utilizaron los programas estadísticos de Sigma STAT y Sigma PLOT versión 10 para realizar las pruebas y gráficas.

Las gráficas de Kaplan-Meier fueron hechas en el programa estadístico SPSS version 10 (Chicago,ILL).

III. RESULTADOS.

Se estudiaron 26 pacientes (17 hombres y 9 mujeres) con un intervalo de edad de 17 a 52 años y una media de 37 años, como se muestra en la figura 3.



Figura No. 3.- Distribución de la muestra estudiada por género y edad.

Los pacientes presentaron diferentes padecimientos hematológicos como: Leucemia Mieloide Crónica (LMC, 8), Anemia Aplásica (AA, 5), Leucemia Mieloide Aguda (LMA, 6), Leucemia de Células Plasmáticas (LCP, 1), Linfoma No Hodgkin (LNH, 5), Linfoma de Hodgkin (LH, 1), los resultados se resumen en la figura 4.

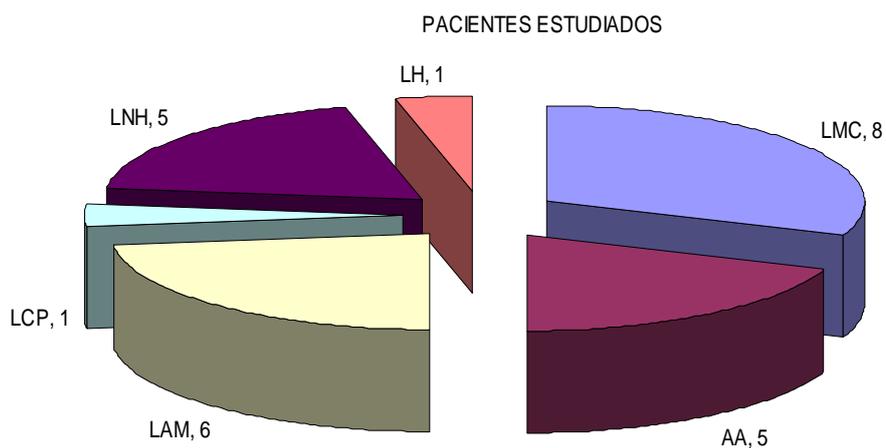


Figura 4.- Distribución de la muestra estudiada por padecimiento.

La población estudiada, se dividió por género y padecimiento como se muestra en la figura 5, observando que estas enfermedades hematológicas fueron más frecuentes en hombres que en mujeres.

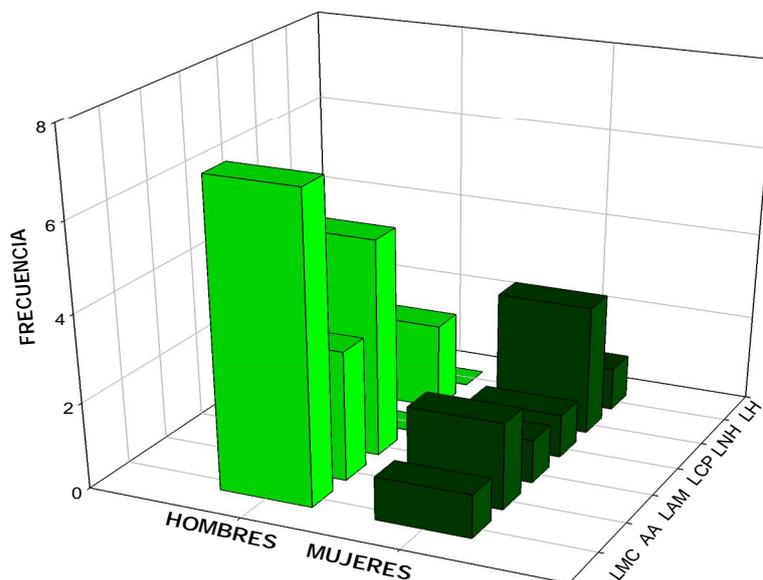


Figura 5. Distribución de la muestra estudiada por tipo de enfermedad y género.

Los pacientes también se distribuyeron por padecimiento y edad, obteniendo que en promedio tenían 37 años de edad, siendo los más jóvenes los de linfoma de Hodgkin y de mayor edad, el de leucemia de células plasmáticas (Figura 6).

EDAD PROMEDIO 37 AÑOS (17 A 62)

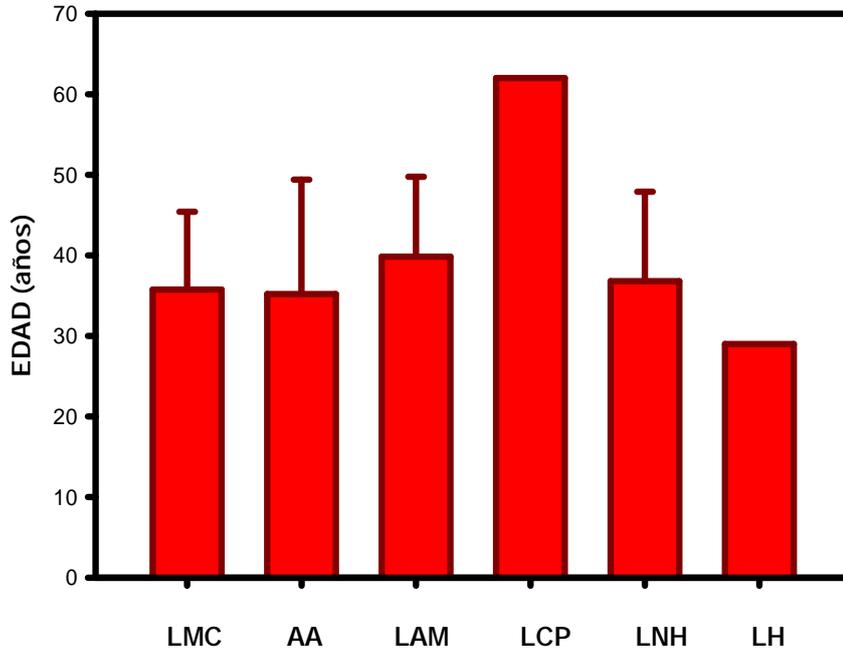


Figura No. 6.- Distribución de los pacientes por padecimiento y edad.

Se determinaron los valores absolutos de las poblaciones celulares estudiadas CD34+38-, 34+38+, 34+133-, 133+38-, 133+38+, 133+34-, 133+34+ en las muestras basales de paciente y donadores histocompatibles. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla No. 2.

En esta tabla se muestra que al comparar los valores promedio de las diferentes poblaciones analizadas en las muestras basales de pacientes y donadores, no se encontró diferencia significativa en la cantidad de células, excepto para aquellas con marcador CD133+38-, en las que hay una tendencia importante.

Al graficar los resultados de la tabla anterior, se observa que hay una cantidad más elevada de células progenitoras entre los donadores que en los pacientes, como se muestra en las figuras No. 7 y 8, pero sin significancia estadística.

Tabla No. 2. Valores de las medias obtenidas para las poblaciones CD34, CD38 y CD133 en las muestras basales de donador y paciente.

POBLACION CELULAR	BASAL PACIENTE 10e6/L	BASAL DONADOR 10e6/L	VALOR DE P
34+38-	0.75	1.71	1
34+38+	2.183	3.043	0.431
34+133-	1.8	3.62	0.213
133+38-	0.912	2.098	0.068
133+38+	0.56	1.119	0.507
133+34-	0.882	1.542	0.455
133+34+	0.853	2.46	0.184

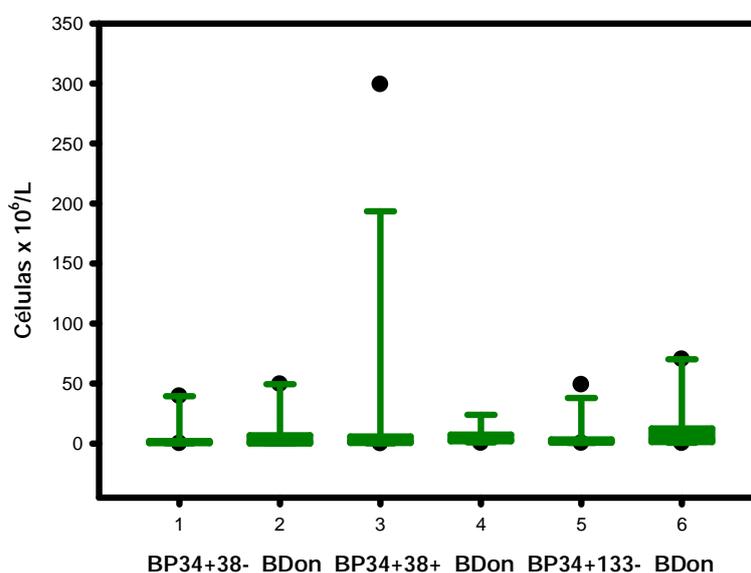


Fig. No. 7.- Comparación de las medias obtenidas de las muestras basales de pacientes y donadores sanos para el antígeno CD34+.

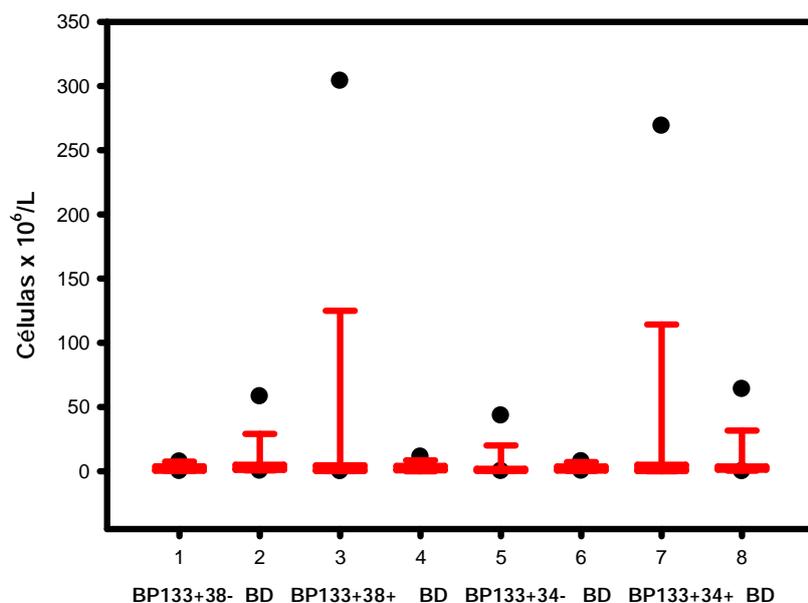


Figura No 8.- Comparación de medias entre las muestras basales de pacientes y donadores para el antígeno CD133+.

Posterior a la movilización de las células progenitoras (5^o día) se volvió a medir la cantidad de las diferentes poblaciones de células tallo CD34+, CD38+, CD133+ (muestra previa a cosecha). Los resultados obtenidos de esta cuantificación se resumen en la tabla No. 3, en donde como se muestra, en todos los casos se obtuvo diferencia significativa entre la muestra basal y la movilizada ($P < 0.001$ para todas las poblaciones estudiadas). Para el caso de las células progenitoras pluripotentes CD133+38- y CD133+34- con el G-CSF (filgrastim) la movilización fue de 8 a 10.8 veces mayor respectivamente; aunque también se movilizaron significativamente las células CD133+38+, CD34+38+, CD133+34+, CD34+38- y CD34+133-.

Tabla No 3. Comparación entre cantidades de células progenitoras viables en estado basal y movilizada en el donador.

POBLACION CELULAR	BASAL DONADOR 10 ⁶ /L	MOVILIZADA DONADOR 10 ⁶ /L	INDICE DE MOVILIZACION	VALOR DE P
34+38-	4.549	20.801	4.5X	<0.001
34+38+	1.99	22.779	11.4X	<0.001
34+133-	5.929	24.118	4X	0.002
133+38-	1.975	15.795	8X	<0.001
133+38+	2.251	27.038	12X	<0.001
133+34-	1.331	14.375	10.8X	<0.001
133+34+	2.25	15.008	6.6X	<0.001

En la representación gráfica de los datos se observa una diferencia importante entre la cantidad de células basal y después de administrar el G-CSF a los donadores (figuras No.9 y 10).

* $p < 0.001$

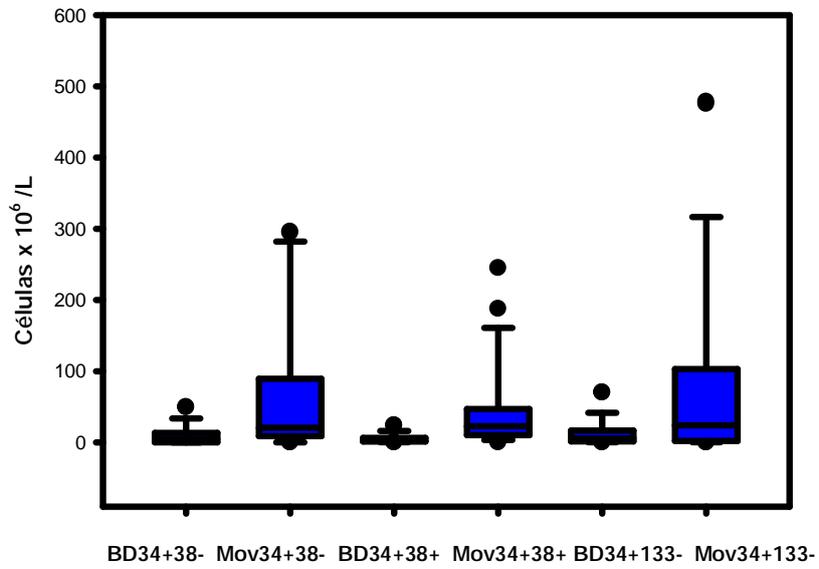
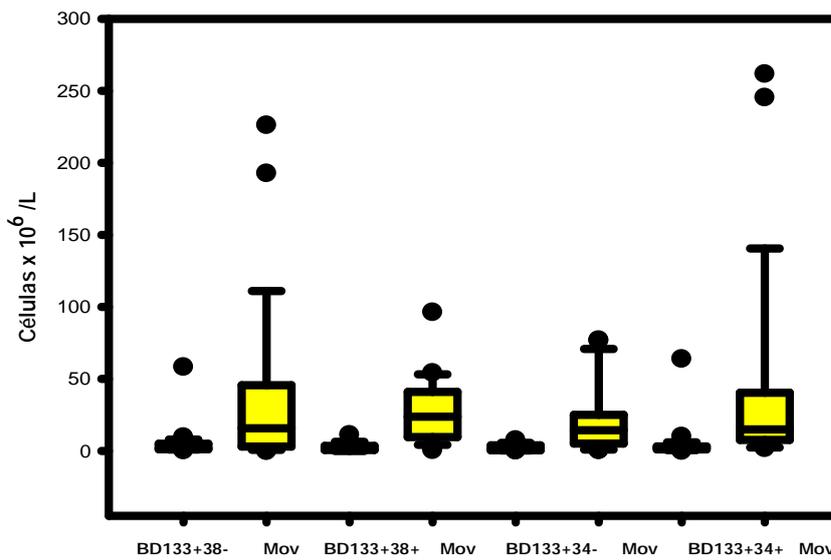


Figura No. 9.- Comparación entre las muestras basal y movilizada del donador sano para las células CD34+.

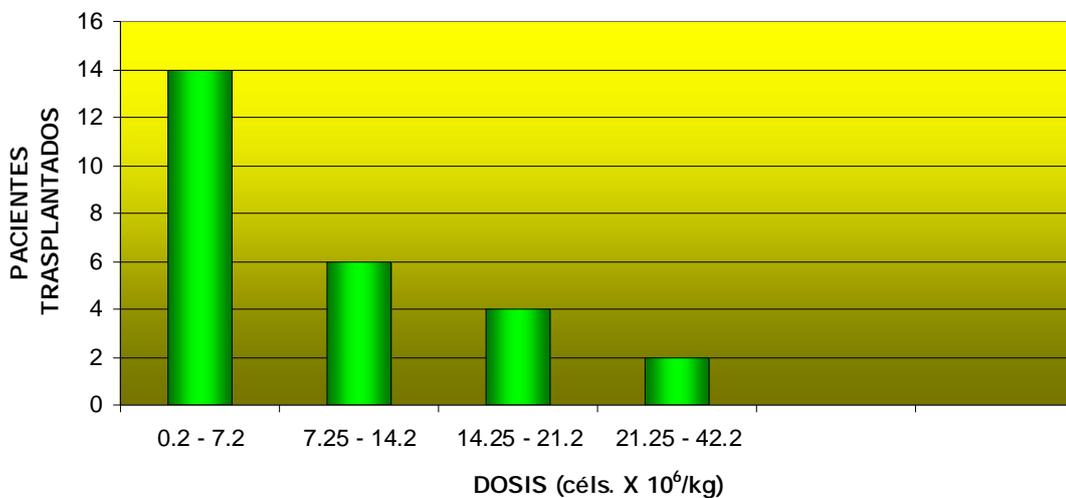


* $P < 0.001$

Figura No. 10.- Comparación entre las muestras basal y movilizada del donador sano para las células CD133+.

La dosis promedio de CD34+ infundida fue de 8.966 céls. X 10⁶/kg y para CD133+ de 5.885 céls. X 10⁶/kg.

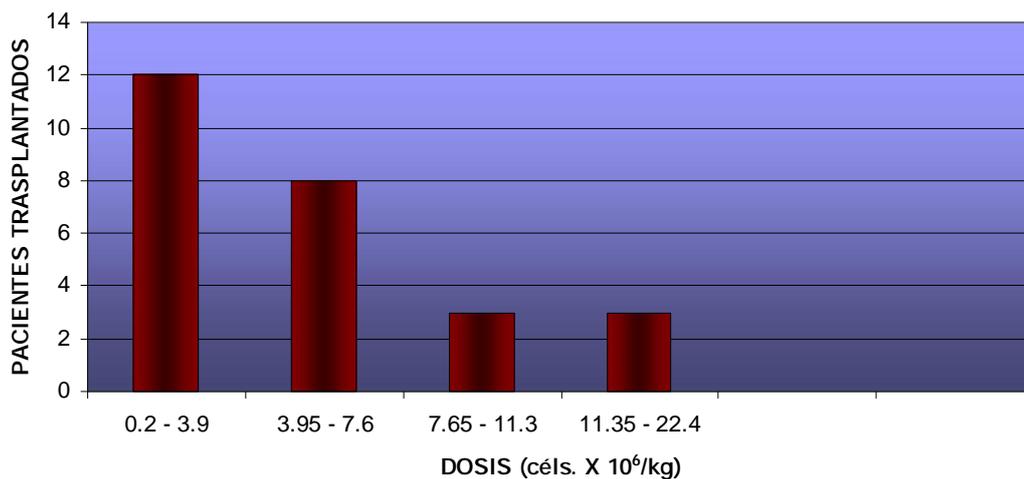
A)



$\mu = 8.966$ céls. X 10⁶/kg

I. C.95% CD34+ = 5.32 – 12.61 céls. X 10⁶/kg

B)



$\mu = 5.885$ céls. X 10⁶/L

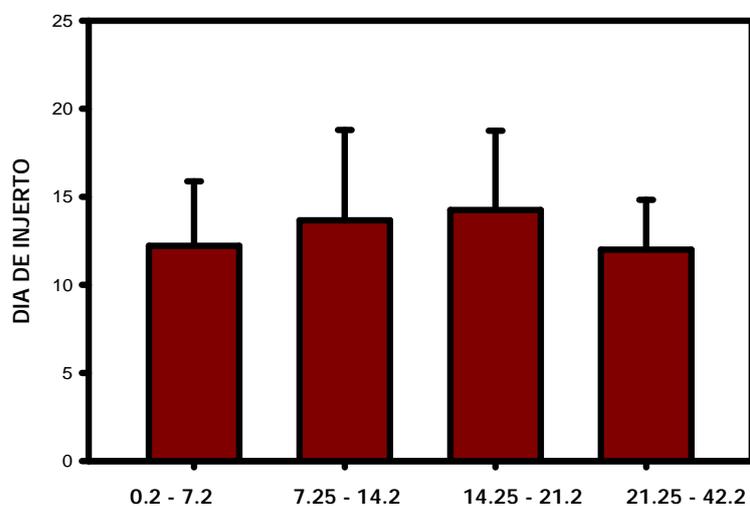
I. C.95% CD133+ = 3.71 – 8.06 céls. X 10⁶/L

Figura No. 11.- Dosis de células tallo CD34+ (A) y CD133+ (B) infundidas a los pacientes.

Posterior al trasplante se hizo un seguimiento de los pacientes para determinar el día de injerto de las líneas celulares. Con las dosis de CD34+ antes mencionada se logró

el injerto de neutrófilos al día 12, de plaquetas y reticulocitos al día 13. Con la dosis de CD133+ injertaron neutrófilos al día 13, plaquetas y reticulocitos al día 14. Como se observa en las figuras 12, 13 y 14.

A)



B)

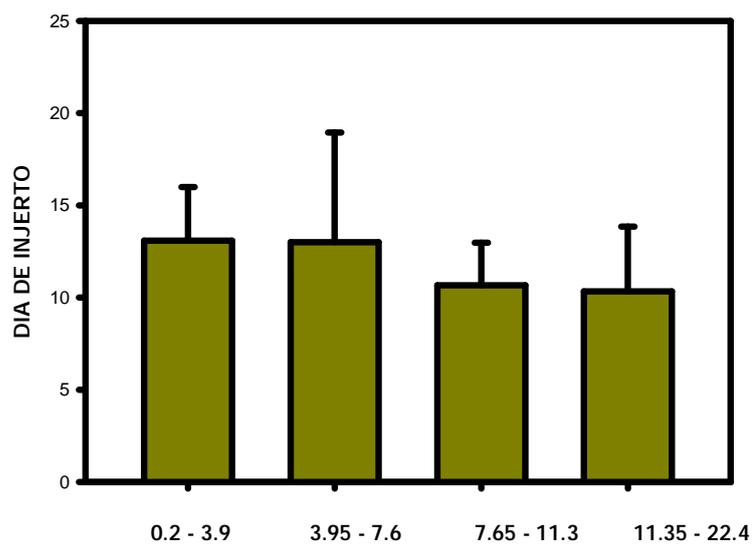
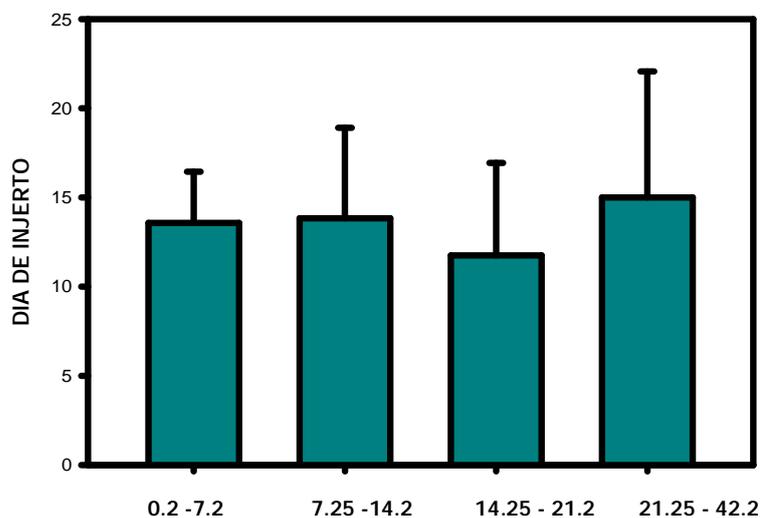


Figura No. 12.- Dosis de células tallo CD34+ (A) y CD133+ (B) infundida respecto al día de injerto de neutrófilos.

Como se observa en la figura, a dosis bajas (0.2-7.2 céls. X 10⁶/L) de CD34+el injerto de neutrófilos ocurrió al día 12, no así a dosis bajas de CD133+ (0.2-3.9 céls. X 10⁶/L) que ocurrió más tardíamente, en el día 13, mientras que a dosis mayores de 7.2 de estas células ocurre tempranamente, en el día 10.

A)



B)

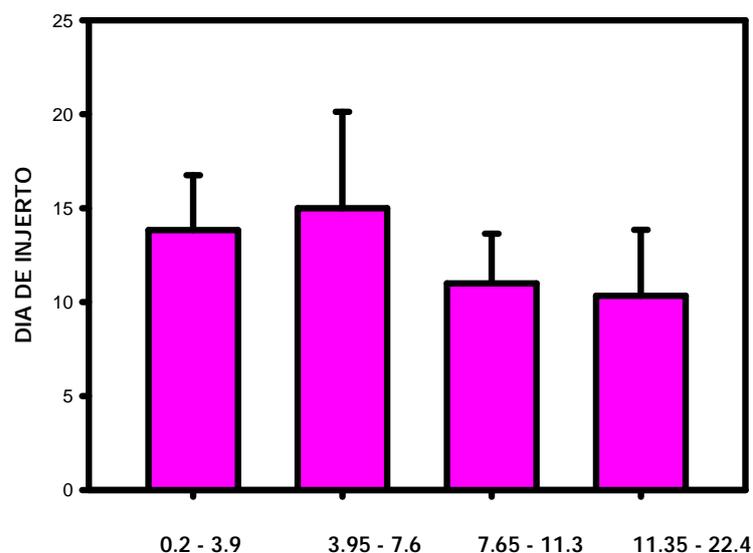
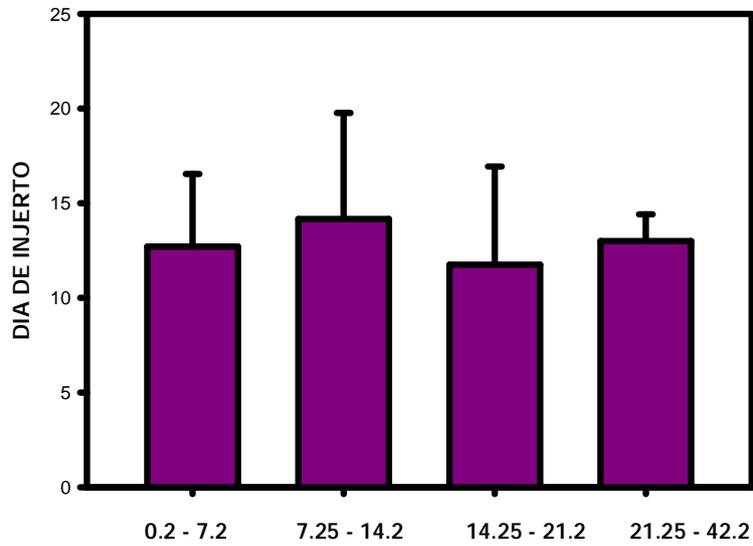


Fig. No. 13.- Dosis de células tallo CD34+ (A) y CD133+ (B) infundida al paciente respecto al día de injerto de plaquetas.

Se observa que la dosis entre 7.65 a 11.3 céls. X 10⁶/L de células CD133+ es la ideal para que el injerto de plaquetas ocurra en 11 días.

A)



B)

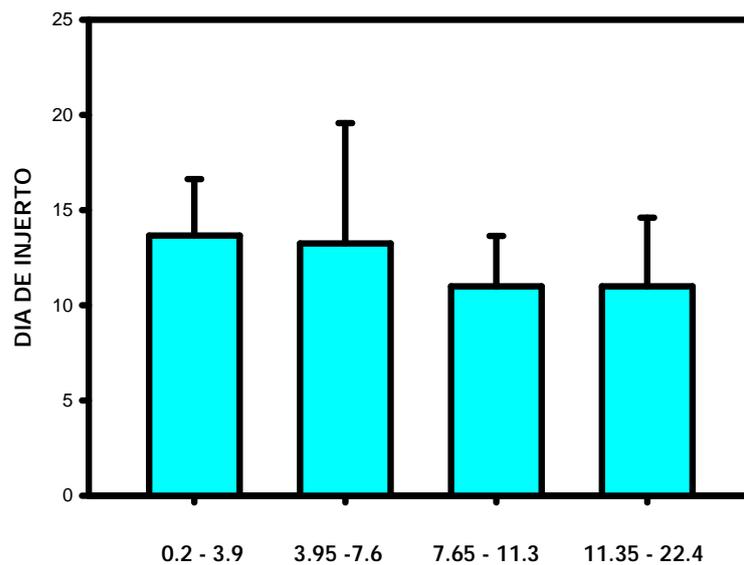


Fig. No. 14.- Dosis de células tallo CD34+ (A) y CD133+ (B) infundida al paciente respecto al día de injerto de eritrocitos.

Se realizó la comparación entre las dosis de CD34+ y CD133+ infundidas al paciente y los días de injerto de las tres líneas celulares. No encontrando diferencia significativa, como se muestra en las tablas 4 y 5.

Tabla No. 4.- Comparación de la dosis de células tallo CD34+ infundida respecto a los días de injerto de neutrófilos, plaquetas y eritrocitos.

DOSIS CD 34+					
DIA INJERTO	I	II	III	IV	P
NEUTRÓFILOS	12.21	13.66	14.25	12	0.775
PLAQUETAS	13.57	13.83	11.75	15	0.79
ERITROCITOS	12.71	14.16	11.75	13	0.852

*ANOVA

** I: 0.2 - 7.2, II: 7.25 - 14.2, III: 14.25 - 21.2, IV: 21.25 - 42.2 células x 10⁶/kg

Tabla No. 5.- Comparación de la dosis célula tallo CD133+ infundida y días de injerto de neutrófilos, plaquetas y eritrocitos.

DOSIS CD 133+					
DIA INJERTO	I	II	III	IV	P
NEUTRÓFILOS	13.08	13	10.66	10.33	0.629
PLAQUETAS	13.83	15	11	10.33	0.223
ERITROCITOS	13.66	13.25	11	11	0.699

*ANOVA

**I: 0.2 – 3.9, II: 3.95 – 7.6, III: 7.65 – 11.3, IV: 11.35 - 22.4 células x 10⁶/kg

Con el fin de determinar si existía algún tipo de relación entre la dosis infundida de células progenitoras con la presencia de muerte, así como en la presencia de EICH o la posible relación entre la muerte de los pacientes y su diagnóstico, se elaboraron tablas de contingencia con χ^2 , los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 6.

Tabla No. 6.- Asociación entre muerte, presencia de EICH y diagnóstico en pacientes trasplantados respecto a la dosis de células progenitoras infundida.

TABLA DE CONTINGENCIA			
ASOCIACIÓN	χ^2	G.L.	P
MUERTE y DOSIS 34+	6.839	3	0.077
MUERTE y DOSIS 133+	1.354	3	0.716
EICH y DOSIS 34+	1.857	3	0.603
EICH y DOSIS 133+	7.59	3	0.055
MUERTE y DIAGNOSTICO	10.575	6	0.102

* χ^2

Los resultados obtenidos muestran que hay tendencia a que los pacientes que recibieron una dosis de 8.966×10^6 céls./kg de CD34+ presenten muerte (P= 0.077), así mismo, que los pacientes que recibieron una dosis de CD133+ de 5.885×10^6 céls./kg presenten EICH (P=0.055).

Se evaluó la presencia de EICH de acuerdo a la dosis infundida de células progenitoras obteniendo los resultados que se muestran en las figuras No. 15 y 16, donde como se muestra en ambas figuras, la mayor cantidad de pacientes no presentaron EICH y en los que se presentó, ésta fue en su mayoría de grados 1 y 2.

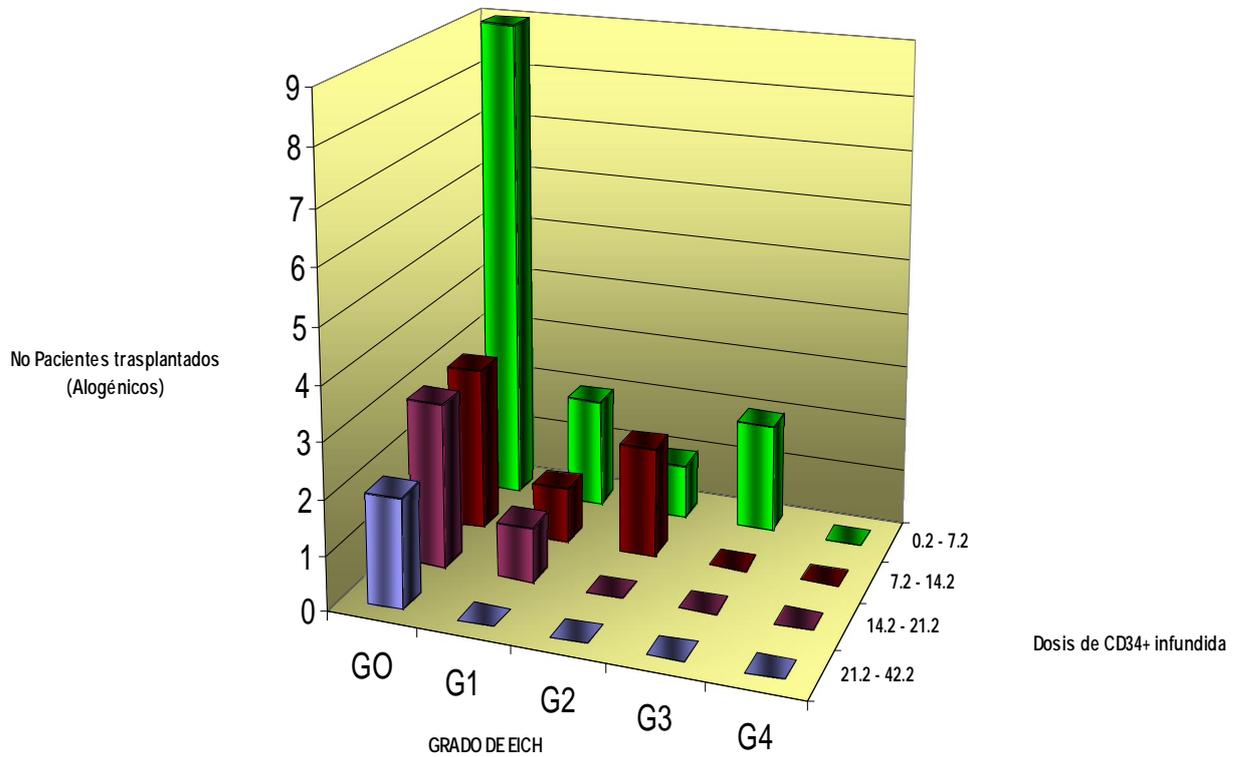


Figura No. 15.- Distribución de pacientes con TACTSP de acuerdo con la dosis de células CD34+ infundida y presencia y tipo de EICH.

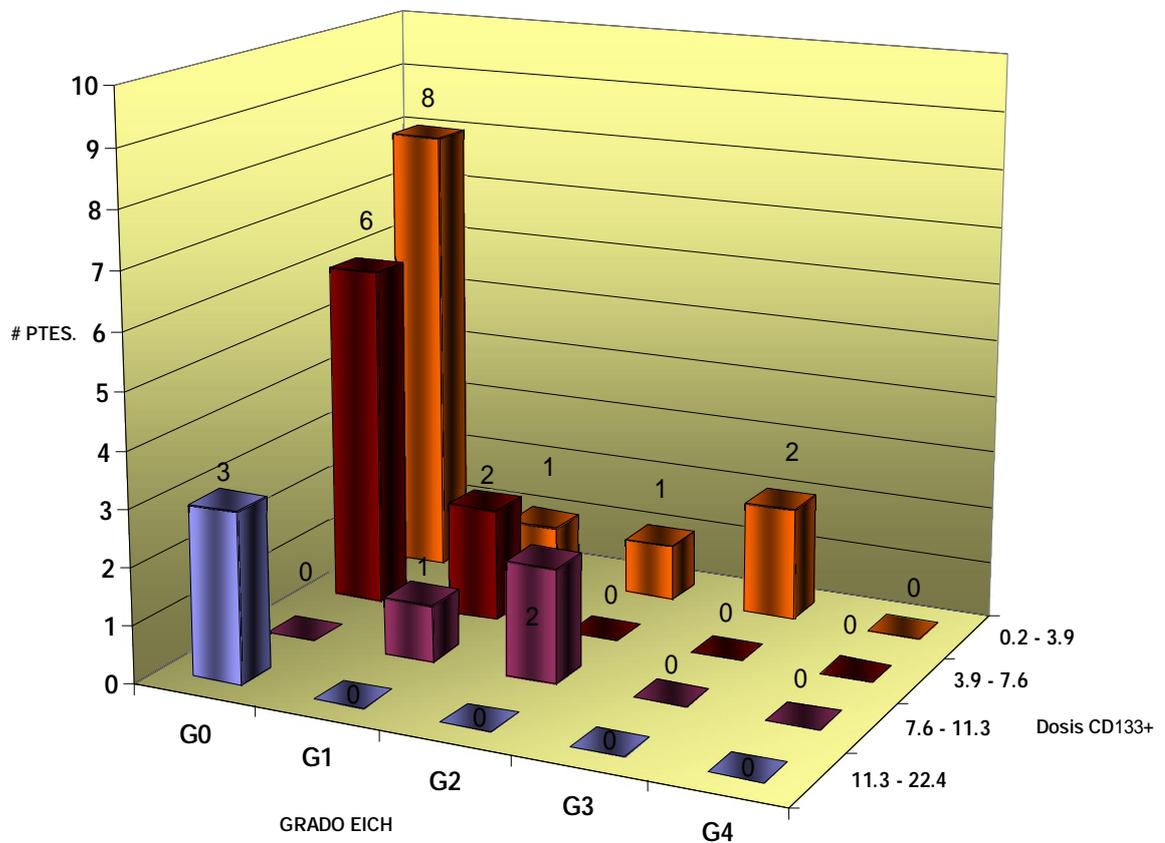


Figura No. 16.- Distribución de pacientes con TACTSP de acuerdo con la dosis de células CD133+ infundida con la presencia y tipo de EICH.

La mayoría de los pacientes no presentó EICH (G0). La presencia de enfermedad injerto contra huésped (EICH) fue menor a mayor dosis de células tallo infundidas. La EICH tipo I y II fueron los más frecuentes presentándose en el 35% de los pacientes.

Se obtuvo la supervivencia global y la libre de enfermedad utilizando las curvas de Kaplan-Meier, donde como se muestra en la figura 17, la mediana de la supervivencia global fue de 363 días postrasplante en promedio y la supervivencia libre de enfermedad de 295 días (figura 18).

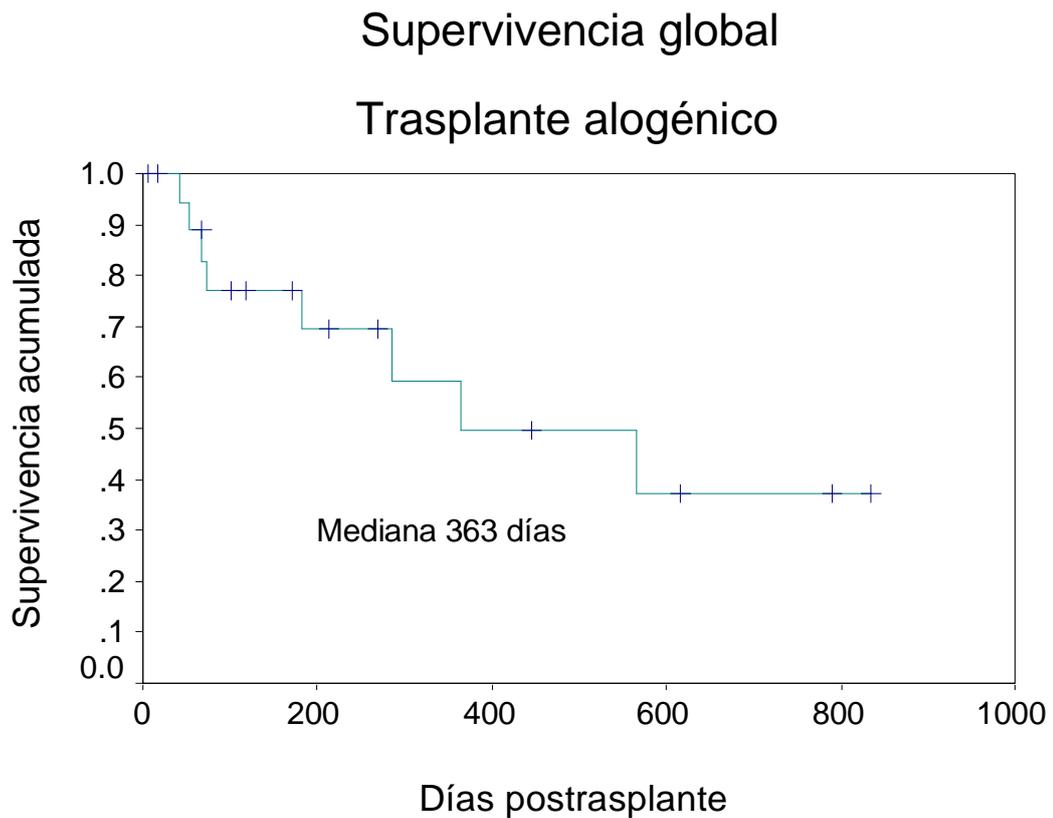


Figura No.17.- Supervivencia global de los pacientes sometidos a trasplante alogénico de células tallo.

Supervivencia libre de enfermedad

Trasplante alogénico

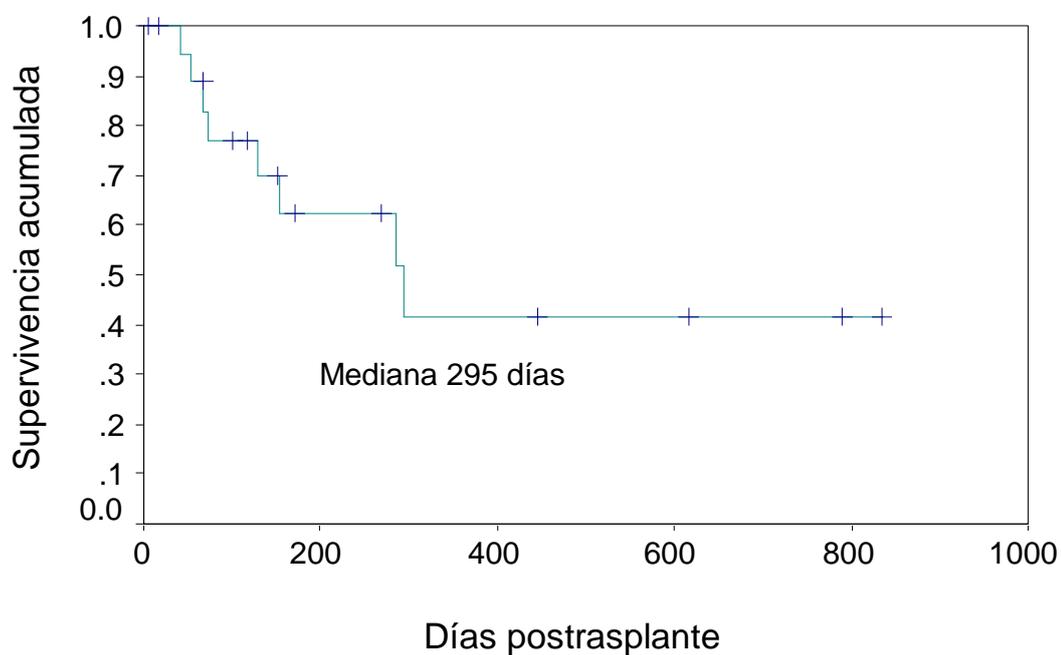


Figura No.18.- Supervivencia libre de enfermedad en pacientes sometidos a trasplante alogénico de células tallo.

Los pacientes estudiados se subdividieron de acuerdo a la patología que presentaban en patologías linfoides, mieloides y anemia aplásica y se determinó la supervivencia global y libre de enfermedad. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 19 y 20.

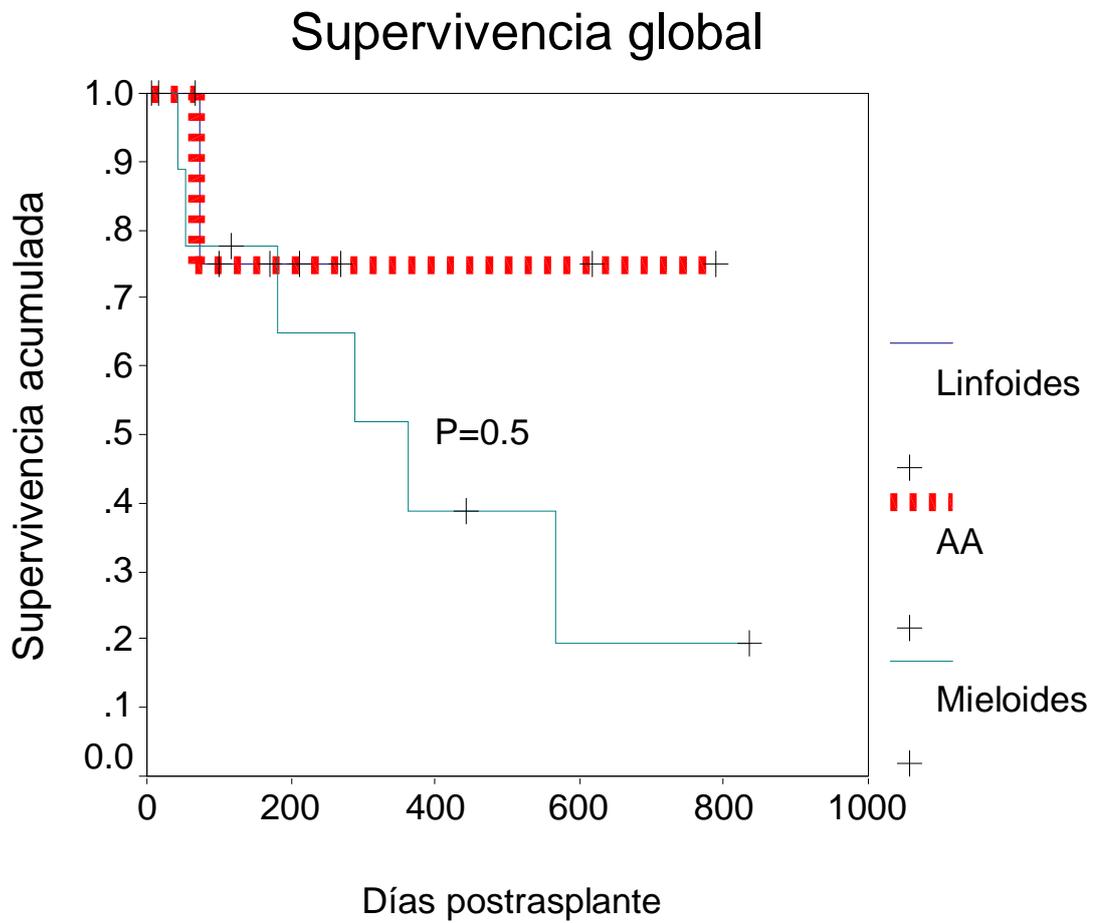


Figura No.19.- Comparación de la supervivencia global de los pacientes distribuidos por patología.

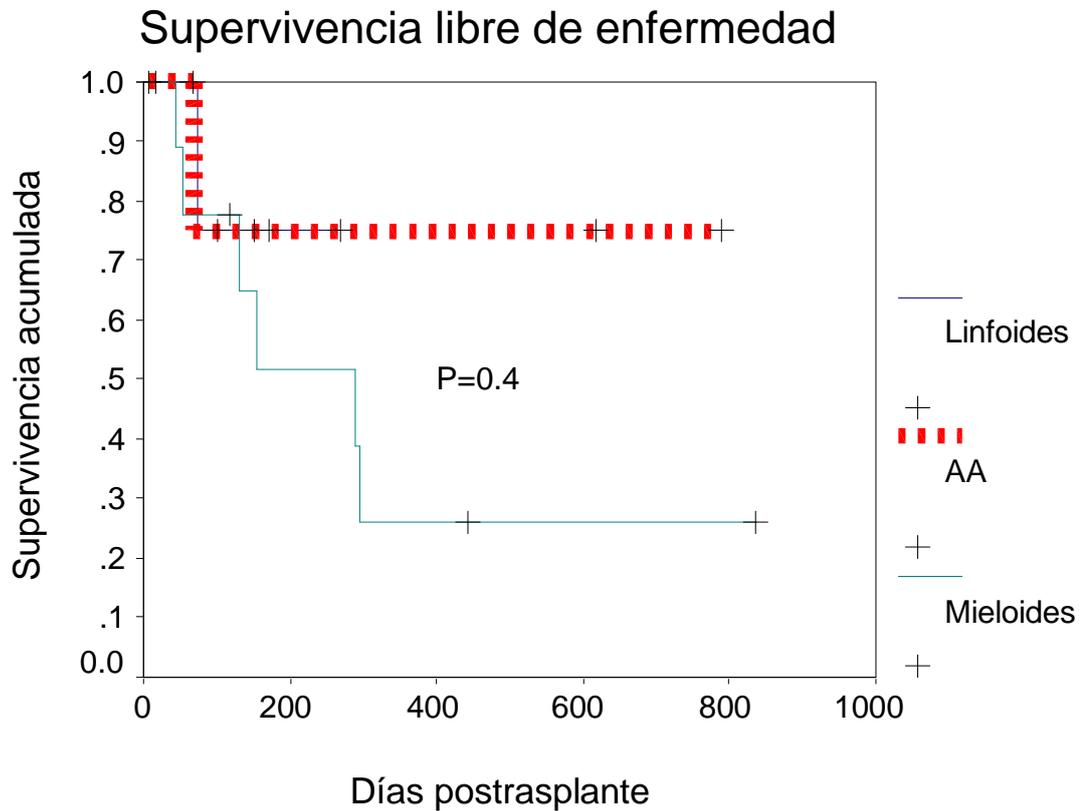


Figura No. 20.- Comparación de la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes sometidos a trasplante alogénico de células tallo distribuidos por patología.

En ambas figuras se muestra que los pacientes con anemia aplásica son los que presentan una mayor supervivencia global y libre de enfermedad, respecto a las otras patologías, aunque no se obtuvieron diferencias significativas.

IV. DISCUSIÓN.

En relación con la población estudiada, la proporción entre género femenino y masculino por padecimiento, se encontró predominio en el sexo masculino y como se informa en países desarrollados¹⁰⁰ y en nuestro país¹⁰¹, la incidencia de leucemia es mayor en hombres que en mujeres en una relación de 2:1.

Se determinó la cantidad de células progenitoras presentes en estado basal tanto en donadores sanos como en pacientes, encontrando que no existe diferencia significativa en la cantidad entre ambos grupos, aunque esta es mayor en los donadores sanos.

La movilización celular a sangre periférica se hizo con G-CSF (filgrastim) a 10µg /kg una vez al día durante 5 días, con donadores histocompatibles en 6/6 haplotipos.

Se han hecho estimaciones sobre las dosis más adecuadas del factor como se hizo en un estudio al administrar G-CSF (filgrastim) a una dosis de 5 µg /kg 2 veces al día obteniendo que ésta lleva a generar una dosis de 5.5×10^6 células CD34+ /kg y requiere menos procedimientos de aféresis lo cual disminuye los costos y toxicidad¹⁰². La dosis utilizada de G-CSF en el centro hospitalario donde se realizó el trabajo, ha dado buenos resultados de movilización de células tallo como se pudo observar en los donadores sanos al comparar las cantidades de células en estado basal y después de la movilización, encontrándose diferencia significativa en todas las poblaciones estudiadas ($P < 0.001$).

La intención de movilizar las células tallo hematopoyéticas a la circulación ha mejorado la eficiencia de su colección. El trasplante de CTH movilizadas para pacientes con aplasia medular resulta en una recuperación hematopoyética rápida de la médula. El TCTH autólogo o alogénico lleva a cabo un incremento de células tallo derivadas de la sangre. Los donadores no siempre responden bien a la terapia

designada para la movilización. Los mecanismos del proceso de movilización son poco comprendidos y se han dilucidado por la experiencia en el procedimiento¹⁰³.

La metodología apropiada para movilizar células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica ya ha sido establecida, y cuantificar el número de células CD34+ / kg de peso del receptor, es un método práctico para determinar la cantidad necesaria de células tallo a infundir. La mayoría de los laboratorios miden el contenido de las células CD34+ por FACS ("fluorescence-activated cell sorter") y esta determinación es la que actualmente se practica en todos los centros que pertenecen al Registro Internacional de Trasplante de Médula Ósea, como es el caso del centro donde se realizó este trabajo. En la actualidad, se ha empezado a utilizar el marcador de las células tallo de estadio más temprano, como CD133+, el cual todavía no se implementa de forma rutinaria, porque no se conoce mucho al respecto y no está aún justificado en términos de costo-beneficio, de acuerdo a los protocolos comunes de trasplante.

El anticuerpo que se utilizó para la cuantificación de las células tallo de sangre periférica fue antiCD34, ausente en todas las células diferenciadas y maduras. Es fuertemente positivo en población mononuclear, incluidas las células con características *in vitro* de célula B y granulocitos. Es clave en el estudio de progenitores con capacidad de autorenovación y reconstitución hematopoyética. El marcador CD34+ se presenta en el 1.1% de las células de médula ósea normal y en células nucleadas de sangre periférica sólo se expresa en el 0.06% del total. Este antígeno es el estándar de laboratorio para cuantificar CTH humana de médula, sangre periférica y cordón umbilical.

También se determinó la viabilidad celular en todas las muestras siendo cercana al 100% en la mayoría, asegurando que la cantidad de células progenitoras infundidas fueran viables y por tanto, potencialmente capaces de repoblar la médula ósea.

La dosis óptima de células a infundir en la mayoría de los centros de trasplante es de 2×10^6 células CD34+/kg de peso del paciente, con lo que se garantiza la regeneración hematopoyética, por lo que a mayor cantidad de células tallo infundidas, se permitirá una recuperación hematológica mas rápida. Sutherland y cols.²¹, recomiendan que para un injerto a largo plazo se debe utilizar un intervalo de 2 a 5×10^6 células CD34+/kg de peso; sin embargo, en este estudio se encontró que también hubo pacientes que injertaron con dosis bajas de células CD34+ así como con dosis mayores de 21.0×10^6 células CD34+/kg, cantidad con la que no se modifica el tiempo de injerto. La dosis de células requeridas para el injerto hematopoyético no ha sido definida con certeza; sin embargo, se ha sugerido que dosis por debajo de 1×10^6 células CD34+/kg son inadecuadas ²¹.

Se ha intentado infundir megadosis en niños con el fin de asegurar el injerto tal como se hizo en tres niños que recibieron después de leucaféresis y selección por separación magnética, 14.3×10^6 células CD34+ /kg y 1.3×10^4 células CD3+ /kg. Uno presentó EICH agudo grado III-IV en piel, hígado, tracto gastrointestinal bajo y muerte al día +238. Los otros dos sobrevivieron y recuperaron linfocitos B y T a los tres meses postrasplante ¹⁰⁴.

En otro estudio realizado en 39 niños que recibieron dosis de $20.7 \pm 9.8 \times 10^6$ células CD34+ /kg purificadas y un promedio de $15.5 \pm 20.4 \times 10^3$ células CD3+ /kg. Los primeros 7 pacientes recibieron dosis pequeñas de ciclosporina como profilaxis de EICH. Los otros 32 pacientes no tuvieron profilaxis. En 38 pacientes evaluados, 5 tuvieron EICH aguda grado I y II. De 39 pacientes, 15 están vivos y sanos, 13 murieron por recaída y 10 por muerte relacionada a trasplante ¹⁰⁵.

Las células CD34⁺/CD133⁺ tienen mayor capacidad de clonación *in vivo* e *in vitro* que las CD34⁺/CD133⁻. En cultivo, el porcentaje de células CD34+ que coexpresan el antígeno CD133+ es de 80%¹⁰⁶.

Respecto a la determinación de las células progenitoras CD34+, a principios de 1995, la Sociedad Internacional de Hematoterapia e Ingeniería del Injerto (ISHAGE) estableció un comité para normar los procedimientos para la realización de la cuantificación de las células tallo, estableciéndose de manera sencilla y rápida este procedimiento para sangre periférica y productos de aféresis, mismo que se aplicó en la realización de este trabajo²¹.

La dosis promedio de CD34+ infundida fue de 8.966 céls. X10⁶/kg y para CD133+ de 5.885 céls. X10⁶/kg. Con las dosis de CD34+ antes mencionada se logró el injerto de neutrófilos al día 12, de plaquetas y reticulocitos al día 13. Con la dosis de CD133+ injertaron neutrófilos al día 13, plaquetas y reticulocitos al día 14. Aunque el número adecuado de células CD133+ x kg para lograr el injerto no ha sido bien establecido, sí concuerda el tiempo de injerto reportado para neutrófilos de 14 y 13 días y para plaquetas de 14 a 16 días con respecto a nuestro trabajo.¹⁰⁶

Se han realizado estudios con el fin de predecir la recuperación hematopoyética. Por ejemplo, se ha comparado desde la fuente de células tallo, médula ósea y sangre periférica, encontrando que el trasplante de células tallo de sangre periférica conduce a una colecta elevada de células CD34+ y CD3+ en comparación con el de médula ósea. El injerto de leucocitos ocurre en el día 14 con células tallo de sangre periférica (6 a 26 días) y con médula ósea el día 19 (9 a 29 días) aunque el injerto de plaquetas no difiere. El trasplante alogénico de célula tallo movilizada tiene una rápida recuperación de leucocitos pero una pronta y elevada incidencia de EICH aguda¹⁰⁷.

En otros estudios se ha investigado el subgrupo inmaduro de células como son CD34+/CD90+, CD34+/CD133+, CD34+/CD38- y CD34+/HLA-DR- que pueden ser más predictiva de la recuperación hematopoyética tardía, (3-12 meses) estudiando

25 pacientes con enfermedades hematológicas malignas y tumores sólidos. La infusión de células CD34+/CD90+ es la mejor para predecir la recuperación de plaquetas durante los primeros 12 meses postrasplante ($P < 0.0238$). La dosis de células CD34+/CD133+ también correlacionó con la cuenta de leucocitos a los 3 meses postrasplante. Los pacientes recibieron más de 80×10^4 células CD34+/CD90+ /kg y presentaron cuentas de plaquetas mayores de 100×10^9 /L, sugiriendo que este valor es la dosis umbral para predecir un injerto hematopoyético más durable.¹⁰⁸

Más recientemente se estudió la relación existente entre la cantidad de subgrupos maduros de células CD34+ (CD34+/CD133+, CD34+/CD38+, CD34+/DR+ y CD34+/CD133-) y subgrupos inmaduros (CD34+/CD133-, CD34+/CD38-, CD34+/DR- y CD34+/CD133+) y el injerto temprano de neutrófilos y plaquetas en series homogéneas (por enfermedad, quimioterapia pretrasplante, régimen de acondicionamiento y profilaxis de EICH), en 30 pacientes con LMA después de trasplante alogénico y HLA idéntico. La cantidad total de células CD34+/CD133+ correlacionó inversamente con los días requeridos para la recuperación de 0.5×10^9 neutrófilos /L ($r = -0.82$, $P = 0.02$) y plaquetas de 20×10^9 /L ($r = -0.60$, $P = 0.06$). Esta correlación fue la mejor en la dosis total de CD34+, neutrófilos ($r = -0.70$, $P = 0.04$) y el injerto de plaquetas ($r = -0.56$, $P = 0.07$). Sugiriendo que el número elevado de CD34+/CD133+ puede estar asociado con una rápida recuperación de neutrófilos y plaquetas.¹⁰⁹

En el presente trabajo se demostró que con una dosis $>$ de 21.2×10^6 células CD34+/kg se logra el injerto de neutrófilos los 12 días y a dosis $> 11.3 \times 10^6$ /kg de CD133+ se establece el injerto de neutrófilos a los 10 días. En el caso de las plaquetas la dosis $> 14.2 \times 10^6$ /kg de CD34+ se logra el injerto a los 12 días y a dosis de CD133+ $> 7.6 \times 10^6$ /kg se logra a los 10 y 11 días, sin embargo; existe el riesgo de EICH al infundir dosis tan altas de progenitores hematopoyéticos.

La relación entre dosis de CD34+ y tiempo de injerto de plaquetas no es lineal. Varios investigadores han tratado de definir el umbral en el cual ocurre el injerto. Ellos encontraron que el umbral es de 10×10^6 células CD34+ /kg, el cual es el más alto encontrado. En dos estudios, el umbral obtenido fue de 5×10^6 células CD34+ /kg, 4 y 3×10^6 células CD34+ /kg.

Existe una correlación inversa entre la cantidad de CD34+CD38- y el tiempo de injerto de plaquetas; lo que observamos es que aquellos pacientes a quienes se les infundió más CD34+CD38- el tiempo de injerto demoró hasta el día 20. El antígeno CD38 está expresado en células más diferenciadas y no en progenitores primitivos. La población CD34+CD38- produce colonias tardías más que las células maduras y diferenciadas CD34+CD38+. Las células CD34+CD38+ son altamente responsables de señales de proliferación, no así CD34+CD38- la cual permanece relativamente activa después que se expone a citocinas. Las células tallo hematopoyéticas responsables de un rápido injerto son altamente proliferativas y de vida corta, que son capaces de producir injertos a largo plazo. La subpoblación CD34+CD38+ puede ser responsable de un rápido injerto, mientras que CD34+CD38- de un injerto a largo plazo en humanos, como se ha presentado en un pequeño modelo. Consecuentemente la reinfusión de células tallo con alta cantidad de CD34+CD38- podría ser esperada una demora en el injerto ¹¹⁰.

El trasplante alogénico de células tallo tiene una rápida recuperación de leucocitos pero una elevada incidencia de enfermedad injerto contra huésped. En el presente estudio hubo tendencia ($P= 0.077$) a que los pacientes que recibieron dosis de 8.966 céls. $\times 10^6$ /kg o mayores de CD34+ presenten muerte. La presencia de enfermedad injerto contra huésped (EICH) fue más alta a mayor dosis de células tallo infundidas.

Blau y cols. obtuvieron una incidencia de 35% en EICH agudo tipo II-IV. La supervivencia libre de enfermedad fue de 51% con una mediana de 352 días y 59% con una mediana de 760 días en el trasplante de células tallo de sangre periférica y médula ósea, respectivamente ¹⁰⁷.

En un estudio de 100 pacientes con leucemias mieloide crónica y aguda, al incrementar la dosis de célula tallo CD34+, ésta se asoció con una rápida recuperación de neutrófilos y plaquetas. 60% de los pacientes desarrolló EICH extenso. La probabilidad de EICH extenso a 4 años fue de 34% en pacientes que recibieron dosis bajas de células CD34+ ($< 8.3 \times 10^6$ /kg) comparado con 62% en pacientes que recibieron dosis altas de CD34+ ($> 8.3 \times 10^6$ /kg). La SLE fue alta en pacientes que recibieron dosis bajas de CD34+ comparada con los que recibieron dosis altas. Esta diferencia fue principalmente porque hay elevada significancia de EICH crónico con mortalidad (P= 0.01). Esfuerzos por acelerar el injerto incrementando las dosis de CD34+ podría ser contraproducente al aumentar con el riesgo de EICH crónico ¹¹¹.

Körbling y cols. criopreservaron 41 bolsas de donadores de células tallo y recuperaron 86.6% de CD34+ y el 100% de subgrupos de linfocitos CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ y CD56+CD3- . No encontraron correlación entre el número de CD3+, CD4+ CD8+ infundidas con el desarrollo de EICH. La probabilidad de desarrollar EICH agudo fue del 48% y la de EICH crónico de 66% a 264 días de seguimiento ¹¹².

Urbano y cols. han recuperado células CD34+ y ha eliminado las células T usando los métodos de inmunoadsorción e inmunomagnético, efectuando la cinética de injerto e incidencia y severidad de EICH postrasplante de células CD34+ seleccionadas en 62 pacientes con enfermedad hematológica maligna, que fueron

acondicionados con ciclofosfamida e irradiación total corporal (n=43) o busulfan y ciclofosfamida (n=19). La profilaxis de EICH consistió en CsA y prednisona (n=48). Sólo CsA (n=11) y CsA y metrotexato (n=3). La mediana de CD34+ purificada fue 65 y 66% con inmunoadsorción y 48 y 86% con método inmunomagnético respectivamente. La mediana de CD34+ infundido a los pacientes fue 3.5×10^6 céls/kg (1-9.6). La mediana de CD3+ infundida fue 0.4×10^6 céls/kg (0.01-2) usando inmunoadsorción y 0.14×10^6 céls/kg (0.03-2.5) usando el método inmunomagnético. La recuperación de neutrófilos y de plaquetas fue en 13 días. Dos pacientes desarrollaron falla de injerto, EICH agudo grado 0 (n=43), I (n=8), II (n=4) y III (n=1). Ningún paciente desarrolló grado 4. La EICH crónica estuvo limitada a 2 casos y extenso en 4 casos. La probabilidad de EICH agudo II – IV fue de 10% (95% CI, 1-19%) y EICH crónico extenso 12% (95% CI, 11-13%). La incidencia acumulada de mortalidad relacionada al trasplante fue 12.6% y 9% a 6 meses. Concluyen que con el método inmunomagnético, hay una baja recuperación y alta pureza de células CD34+ y una muy alta eliminación de células T comparada con el método de inmunoadsorción (P=0.008; P<0.0001 y P=0.0002), respectivamente. Los resultados indican que el trasplante alogénico con selección de CD34+ está asociado con un injerto muy rápido y baja incidencia de EICH severo ¹¹³.

En el presente trabajo, la mediana de la supervivencia global fue de 363 días postrasplante en promedio y la supervivencia libre de enfermedad de 295 días. Podemos decir que existieron múltiples factores que pueden afectar el éxito del trasplante, tales como la dosis de células CD34+ trasplantadas, el periodo de aplasia, la presencia de infecciones y sangrados. La morbilidad y mortalidad dependen principalmente de la incidencia de sangrado e infección secundaria, durante el periodo de aplasia después del trasplante. Nuestra población fue muy heterogénea y tuvo estos factores que influyeron en la supervivencia. Si el periodo de neutropenia y plaquetopenia, pueden ser acortados, la morbilidad del trasplante puede reducirse, disminuyendo también el tiempo de hospitalización.

V. CONCLUSIONES.

- Se obtuvo movilización significativa a sangre periférica de todas las poblaciones analizadas, utilizando G-CSF a dosis de 10 µg/kg de peso durante 5 días.
- Con la dosis promedio infundida de CD34+= 8.966 céls. X10⁶/kg y de CD133+ = 5.885 céls. X10⁶/kg; se logró que el injerto para las series mieloide, plaquetaria y eritroide fuera entre los días 12 y 14 para ambas dosis.
- A dosis menores de 7.2 céls. X10⁶/kg de CD34+, 64% de los pacientes no presentaron EICH y el 36% restante la presentaron solamente de tipo I y II. Con dosis menores a 3.9 céls. X10⁶/kg de CD133+ se encontró que 67% de los pacientes no presenta EICH y el 33% restante la presenta de tipos I, II y III.
- Existe una tendencia que al infundir dosis de CD34+ de 8.966 céls. X10⁶/kg, la vida del paciente se vea limitada, así mismo que con dosis de CD133+ de 5.885 céls. X10⁶/kg se presente la EICH.
- No se obtuvo relación significativa entre las dosis recibidas de progenitores y la supervivencia global y libre de enfermedad

VI. EXPECTATIVAS PARA FUTUROS TRABAJOS.

- Separar las células tallo hematopoyéticas (CTH) a través de equipo como el CLINIMACS y realizar estudios clonogénicos para elevar el número de éstas y una vez purificadas infundirlas al paciente con la supervisión y autorización del Comité de Ética del Hospital.
- Separar linfocitos de los productos de aféresis para trasplante y evaluar si el abatimiento de ellos evita el EICH.

VI. BIBLIOGRAFÍA.

1. Adams W. 2004. The Leukemia & Lymphoma Society. Trasplante de células madre sanguíneas y de médula ósea. AMGEN Oncology. 5: 1-52.
2. Hodgson G. S. and Bradley T.R. 1979. Properties of haematopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: evidence for a pre-CFU-S cell? Nature. 281: 381-382.
3. Nakahata T. and Ogawa M. 1982. Identification in culture of a class of hemopoietic colony-forming units with extensive capability to self-renew and generate multipotential hemopoietic colonies. Proc Natl Acad Sci USA: 79: 3843-3847.
4. Nakahata T., Gross A.J., and Ogawa M. 1982. A stochastic model of self-renewal and commitment to differentiation of the primitive hemopoietic stem cells in culture. J Cell Physiol. 113: 455-458.
5. Graf T. 2002. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. Blood. 99: 3089-3101.
6. Vela OJ, García REM, Borbolla EJ. 2008. Trasplante de células hematopoyéticas. Ed. Prado. México; 737 págs.
7. Morrison SJ, Weissman IL. 1994. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. Immunity. 1: 661-673.
8. Muller-Sieburg CE, Whitlock CA, Weissman IL. 1986. Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: a committed pre-pre-B cell and a clonogenic Thy-1^{lo} hematopoietic stem cell. Cell. 44: 653-662.
9. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. 1977. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. J Cell Physiol. 91: 335-344.
10. Eaves C.J., Cashman JD, Eaves AC. 1991. Methodology of long-term culture of human hemopoietic cells. J Tissue Cult Methods 13: 55-61.
11. Lapidot T, Petit I. 2002. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines and stromal cells. Exp Hematol. 30: 973-981.

12. Malcolm A., Moore S, Metcalf D.1970. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of *in vivo* and *in vitro* colony forming cells in the developing mouse embryo. Br J Haematol. 18: 279-296.
13. Nakano T, Kodama H, Honjo T. 1996. *In vitro* development of primitive and definitive erythrocytes from different precursors. Science. 272: 722-724.
14. Dieterlen-Lievre F, Martin C. 1981. Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. Dev Biol. 88: 180-191.
15. Keller GM, Phillips RA .1982. Detection *in vitro* of a unique, multipotent hemopoietic progenitor. J Cell Physiol Suppl 1: 31-36.
16. Ogawa M, Porter PN, Nakahata T. 1983. Renewal and commitment to differentiation of hemopoietic stem cells (An interpretive review). Blood. 61: 823-829.
17. Szilvassy SJ, Cory S. 1993. Phenotypic and functional characterization of competitive long term repopulating hematopoietic stem cells enriched from 5-fluorouracil-treated murine marrow. Blood. 81: 2310-2320.
18. Cashman J., Eaves AC, Eaves CJ. 1985. Regulated proliferation of primitive hematopoietic progenitor cells in long-term human marrow cultures. Blood. 66: 1002-1005.
19. Udomsakdi C, Lansdorp PM, Hogge DE, Reid DS, Eaves AC, Eaves CJ. 1992. Characterization of primitive hematopoietic cells in normal human peripheral blood. Blood. 80: 2513-2521.
20. Li CL, Johnson GR. 1995. Murine hematopoietic stem and progenitor cells: I. Enrichment and biologic characterization. Blood. 85: 1472-1479.
21. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. 1996. The ISHAGE guidelines for CD34⁺ cell determination by flow cytometry. J Haematother. 5: 213-226.
22. Li CL, Johnson GR. 1992. Long-term hemopoietic repopulation by thy-1 lo, Lin⁻, Ly6A/E⁺ cells. Exp Hematol. 20: 1309-1315.
23. McKinstry W. J., Li C-L., Rasko JEJ, Nicola NA, Johnson GR, Metcalf D. 1997. Cytokine receptor expression on hematopoietic stem and progenitor cells. Blood. 89: 65-71.

24. Szilvassy SJ, Weller KP, Chen B, Juttner CA, Tsukamoto A, Hoffman R. 1996. Partially differentiated *ex vivo* expanded cells accelerate hematologic recovery in myeloablated mice transplanted with highly enriched long-term repopulating stem cells. *Blood*. 88: 3642-3653.
25. Chevernick PA, Boggs DR, Marsh JC, Cartwright GE, Wintrobe MM. 1968. Quantitative studies of blood and bone marrow neutrophils in normal mice. *Am J Physiol*. 215: 353-360.
26. Coulombel L, Eaves AC, Eaves CJ. 1983. Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive hemopoietic progenitors in the adherent layer. *Blood*. 62: 291-297.
27. Clark BR, Gallagher JT, Dexter TM. 1992. Cell adhesion in the stromal regulation of haemopoiesis. *Bailliere's Clin Haematol*. 5: 619-652.
28. Stein J, Borzillo GV, Rettenmier CW. 1990. Direct stimulation of cells expressing receptors for macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) by a plasma membrane-bound precursor of human CSF-1. *Blood*. 76: 1308-1314.
29. Toksoz D, Zsebo KM, Smith KA, Hu S, Brankow D, Suggs SV, Martin FH, Williams DA. 1992. Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci*. 89: 7350-7354.
30. Broudy VC, Zuckerman KS, Jetmalani S, Fitchen JH, Bagby GC Jr. 1986. Monocytes stimulate fibroblastoid bone marrow stromal cells to produce multilineage hematopoietic growth factors. *Blood*. 68: 530-534.
31. Rennick D, Yang G, Gemmell L, Lee F. 1987. Control hemopoiesis by a bone marrow stromal cell clone: lipopolysaccharide- and interleukin-1-inducible production of colony-stimulating factors. *Blood*. 69: 682-691.
32. Lanotte M, Metcalf D, Dexter TM. 1982. Production of monocyte/macrophage colony-stimulating factor by preadipocyte cell lines derived from murine marrow stroma. *J Cell Physiol*. 112: 123-127.
33. Migliaccio AR, Migliaccio G, Adamson JW, Torok-Storb B. 1992. Production of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte/macrophage-colony-stimulating

factor after interleukin-1 stimulation of marrow stromal cell cultures from normal or aplastic anemia donors. *J Cell Physiol.* 152: 199-206.

34. Gordon MY, Riley GP, Watt SM, Greaves MF. 1987. Compartmentalization of a haematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. *Nature* . 326: 403-405.

35. Metcalf D. 1999. Mechanisms of human hematopoiesis. In *Hematopoietic cell transplantation*. E.Donald Thomas, Karl G Blume, Stephen J. Forman (ed). Blackwell. Science, Inc. Massachusetts, USA. pp 48-57.

36. Metcalf D, Burgess AW. 1982. Clonal analysis of progenitor cell commitment to granulocyte or macrophage production. *J Cell Physiol.* 111: 275-283.

37. Fukunaga R, Ishizaka-Ikeda E, Nagata S. 1993. Growth and differentiation signals mediated by different regions in the cytoplasmic domain of granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Cell.* 74: 1079-1087.

38. Whetton AD, Dexter TM. 1983. Effect of haematopoietic cell growth factor on intracellular ATP levels. *Nature.* 303: 629-631.

39. Metcalf D, Merchav S. 1982. Effects of GM-CSF deprivation on precursors of granulocytes and macrophages. *J Cell Physiol.* 112: 411-418.

40. Williams GT, Smith GA, Spooncer E, Dexter TM, Taylor DR. 1990. Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature.* 343: 76-79.

41. Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. 2001. Can stem cells cross lineage boundaries ? *Nat Med*; 7: 393-395.

42. Metcalf D. 1977. *In vitro* cloning techniques for hemopoietic cells: Clinical applications. *Ann Intern Med.* 87: 483-488.

43. Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH.1990. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87: 3584-3588.

44. Zandstra PW, Lauffenburger DA, Eaves CJ. 2000. A ligand-receptor signaling threshold model of stem cell differentiation control: A biologically conserved mechanism applicable to hematopoiesis. *Blood.* 96: 1215-1222.

45. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 418: 41- 49.
46. Okada S, Nakauchi H, Nagayosi K, Nishikawa S-I, Miura Y, Suda T. 1992. *In vivo* and *in vitro* stem cell function of *c-kit* and *Sca-1*-positive murine hematopoietic cells. *Blood*. 80: 3044-3050.
47. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 241: 58-62.
48. Alison MR, Poulsom R, Jeffery R. 2000. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*. 406: 257.
49. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP. 2002. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*. 346: 5-15.
50. Assmus B, Schachinger V, Teupe C. 2002. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 106: 3009-3017.
51. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T. 2002. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: A pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 360: 427-435.
52. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF. 2003. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors : Implications for clinical application . *Ann Rev Immunol*. 21: 759-806.
53. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. 1984. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol*. 133: 157-165.
54. Di Giusto D, Chen S, Combs J, Webb S, Namikawa R, Tsukamoto A, Chen BP, Galy AHM. 1994. Human fetal bone marrow early progenitors for T, B, and myeloid cells are found exclusively in the population expressing high levels of CD34. *Blood*. 84: 421-432.
55. Galy AHM, Webb S, Cen D, Murray LJ, Condino J, Negrin RS, Chen BP. 1994. Generation of T cells from cytokine-mobilized peripheral blood and adult bone marrow CD 34⁺ cells. *Blood*. 84: 104-110.

56. Krause DS, Fackler MJ, Civil CI, May WS. 1996. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 87:1-13.
57. Dao MA, Nolta JA. 2007. Cytokine and integrin stimulation synergize to promote higher levels of GATA-2, c-myb, and CD34 protein in primary human hematopoietic progenitors from bone marrow. *Blood*. 109: 2373-2379.
58. Manfredini R, Zini R, Salati S, Siena M, Tenedini E, Tagliafico E, Montanari M, Zanocco-Marani T, Gemelli C, Vignudelli T, Grande A, Fogli M, Rossi L, Fagioli ME, Catani L, Lemoli RM, Ferrari S. 2005. The kinetic status of hematopoietic stem cell subpopulations underlies a differential expression of genes involved in self-renewal, commitment, and engraftment. *Stem Cells*. 23: 496-506.
59. Guenechea G, Gan OI, Dorrell C, Dick JE. 2001. Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential. *Nat Immunol*. 2: 75-82.
60. Summers YJ, Heyworth CM, de Wynter EA, Hart CA, Chang J, Testa NG. 2004. AC133+ G0 cells from cord blood show a high incidence of long-term culture-initiating cells and a capacity for more than 100 million-fold amplification of colony-forming cells in vitro. *Stem cells*. 22: 704-715.
61. Engelhardt M, Lubbert M, Guo Y. 2002. CD34(+) or CD34(-): which is the more primitive ?. *Leukemia*. 16: 1603-1608.
62. Hess DA, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Hohm SA, Lahey R, Eades WC, Creer MH, Nolta JA. 2006. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood*. 107: 2162-2169.
63. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 404: 193-197.
64. Pomyje J, Zivny J, Sefc L, Plasilova M, Pytlik R, Necas E. 2003. Expression of genes regulating angiogenesis in human circulating hematopoietic cord blood CD34+/CD133+ cells. *Eur J Haematol*. 70:143-150.
65. Yin - AH, Miraglia S, Zanjani - ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary-AG. 1997. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 90: 5002-5012.

66. Hristov M, Erl W, Weber PC. 2003. Endothelial Progenitor Cells; Mobilization, Differentiation, and Homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23: 1185-1189.
67. Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE. 2003. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res.* 34: 461-475.
68. Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Lambertenghi G. 2001. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133+ cells. *Brit J Haem.* 115: 186-194.
69. Cutler C, Antin-JH. 2001. Peripheral Blood Stem Cells for Allogenic Transplantation. *A Rev Stem Cells.* 19: 108-117.
70. Jansen J, Thompson JM, Dugan MJ, Nolan P, Wiemann MC, Birhiray R. 2002. Peripheral blood progenitor cell transplantation. *Therap Apheresis.* 6: 5-14
71. Hess D, Wirthlin L. 2006. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood.* 107: 2162-2169.
72. McGuckin CP, Pearce D, Forraz N, Tooze JA, Watt SM, Pettengell R. 2003. Multiparametric analysis of immature cell populations in umbilical cord blood and bone marrow. *Eur J Haematol.* 71: 341-350.
73. Adams G, Scadden DT. 2006. The hematopoietic stem cell in its place. *Nat Immunol Publish.* 7: 331-337.
74. Urbich C, Dimmeler S. 2004. Endothelial progenitor cells. Characterization and role in vascular biology. *Circ Res.* 95: 343-353.
75. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM. 2001. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation.* 103: 2885-2890.
76. Pesce M, Orlandi A, Iachininoto MG, Straino S, Torella AR, Rizzuti V. 2003. Myoendothelial differentiation of human umbilical cord blood-derived stem cells in ischemic limb tissues. *Circ Res.* 93: e51-e62.
77. Encabo A, Mateu E, Carbonell-Uberos F, Minana MD. 2003. CD34+CD38- is good predictive marker of cloning ability and expansion potential of CD34+ cord blood cells. *Transfusion.* 43: 383-389.

78. Gordon PR, Leimig T, Babarin-Dorner A, Houston J, Holladay M, Mueller I. 2003. Progenitor cell mobilization. Large scale isolation of CD133+ progenitor cells from G-CSF mobilized peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Trans.* 31: 17-22.
79. Flores FE, Montesinos JJ, Mayani H. 2006. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Rev Inv Clín.* 58: 498-511.
80. Owen M, Friedenstein AJ. 1988. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Foundation Symposium.* 136: 42-60.
81. Thomas ED. 2000. Landmarks in the development of hematopoietic cell transplantation. *World J Surg.* 24: 815-818.
82. Thomas ED, Storb R. 1970. Technique for human marrow grafting. *Blood.* 36: 507-515.
83. Confer DL. 2004. Hematopoietic cell donors. En: Thomas' Stem cell transplantation. Blume KG, Forman SJ, Applebaum FR editors. 3th ed Blackwell Publishing Ltd Malden, Mass. pp. 542-543.
84. Verma DS, Fisher R, Spitzer G, Zander AR, McCredie KB, Dicke KA. 1980. Diurnal changes in circulating myeloid progenitor cells in man. *Am J Hematol.* 9: 185-192.
85. Juttner CA, To LB, Haylock DN, Branford A, Kimber RJ. 1985. Circulating autologous stem cells collected in very early remission from acute non-lymphoblastic leukaemia produce prompt but incomplete haemopoietic reconstitution after high dose melphalan or supralethal chemoradiotherapy. *Br J Haematol.* 61: 739-745.
86. Korbling M, Dorken B, Ho AD, Pezzutto A, Hunstein W, Fliedner TM. 1986. Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood.* 67: 529-532.
87. Sheridan WP, Begley CG, Juttner CA, Szer J, To LB, Maher D, McGrath KM, Morstyn G, Fox RM. 1992. Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilized by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Lancet.* 339 :640-644.
88. Horowitz MM, Confer DL. 2005. Evaluation of hematopoietic stem cell donors. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 5: 469-475.

89. Majolino I, Aversa F, Bacigalupo A, Bandini G, Arcese W, Reali G. 1995. Allogenic transplants of rhG-CSF-mobilized peripheral blood stem cells (PBSC) from normal donors. *GITMO. Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo. Haematologica.* 80: 40-43.
90. Feugier P, Bensoussan D, Girard F, Alla F, Schuhmacher A, Latger-Cannard V. 2003. Hematologic recovery after autologous PBPC transplantation: importance of the number of post thaw CD34+ cells. *Transfusion.* 43: 878-884.
91. Hurley CK, Baxter Lowe LA, Logan B, Karanes C, Anasetti C, Weisdorf D, Confer DL. 2003. National Marrow Donor Program HLA-matching guidelines for unrelated marrow transplants. *Biol Blood Marrow Transplant .* 9: 610-615.
92. Whitelegg A, Barber LD. 2004. The structural basis of T-cell allorecognition. *Tissue Antigens.* 63: 101-108.
93. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. 2007. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol.* 25: 139-170.
94. Jansen J, Hanks S, Thompson JM, Dugan MJ, Akard LP. 2005. Transplantation of Hematopoietic stem cells from the peripheral blood. *J Cell Moll Med.* 9: 37-50.
95. Barret AJ, Rezvani K, Solomon S, Dickinson AM, Wang XN, Stark G, Cullup H, Jarvis M, Middleton PG, Chao N. 2003. New developments in allotransplant immunology. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 6: 350-371.
96. Barber LD, Madrigal JA. 2006. Exploiting beneficial alloreactive T cells. *Vox Sang.* 91: 20-27.
97. Zubair A, Zahrieh D, Daley H, Schott D, Griben JG, Freedman A. 2003. Early neutrophil engraftment following autologous BMT provides a functional predictor of long-term hematopoietic reconstitution. *Transf.* 43: 614-621.
98. Körbling M, Dörken B, Ho AD, Pezzutto A, Hunstein W, Fliedner TM. 1986. Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood.* 67: 529-532.
99. Chao NJ, Schriber JR, Grimes K, Long GD, Negrin RS, Raimondi C. 1993. Granulocyte colony-stimulating factor "mobilized" peripheral blood progenitor cells accelerate granulocyte and platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Blood.* 81: 2031-2035.

100. Faderl S, Talpaz M, Estrou Z. 1999. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 341: 164.
101. Duque RJ. 2002. Factores ambientales, neoplasias hematológicas y mecanismos moleculares. *Gac Méd Méx.* 138: S13-S14.
102. Kröger N, Renges H, Krüger W, Gutensohn K, Löliger C, Carrero I, Cortes L, Zander AR. 2000. A randomized comparison of once versus twice daily recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) for stem cell mobilization in healthy donors for allogeneic transplantation. *British J Haematology.* 111: 761-765.
103. Kessinger A, Sharp JG. 2003. The whys and hows of hematopoietic progenitor and stem cell mobilization. *Bone Marrow Transplantation.* 31: 319-329.
104. Schwinger W, Urban Ch, Lackner H, Kerbl R, Benesch M, Dornbusch HJ, Sovinz P, Schauenstein K, Schumm M, Handgretinger R. 2000. Unrelated peripheral blood stem cell transplantation with "megadoses" of purified CD34+ cells in three children with refractory severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplantation.* 25: 513-517.
105. Handgretinger R, Klingebiel T, Leng P, Schumm M, Neu S, Geiselhart A, Bader P, Schlegel PG, Greil J, Stachel D, Herzog RJ, Niethammer. 2001. Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34+ progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplantation.* 27: 777-783.
106. Jaime PJC, Hernández AAE, Mendez RN, Vázquez GE, Cantú ROG, Gómez AD. 2009. Mobilization kinetics of CD133+ hematopoietic progenitor cells for hematopoietic grafting. *Transfusión.* 49: 532-535.
107. Blau IW, Basara N, Lentini G, Guenzelmann S, Kirsten D, Schmetzer B, Bischoff M, Roemer E, Kiehl MG, Fauser AA. 2001. Feasibility and safety of peripheral blood stem cell transplantation from unrelated donors: results of a single-center study. *Bone Marrow Transplantation.* 27: 27-33.
108. Sumikuma T, Shimazaki C, Inaba T, Ochiai N, Okano A, Hatsuse M, Ashihara E, Nakagawa M. 2002. CD34+/CD90+ cells infused best predict late haematopoietic

reconstitution following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 117: 238-44.

109. Pastore D, Mestice A, Perrone T, Gaudio F, Delia M, Albano F, Russo RA, Carluccio P, Leo M, Liso V, Specchia G. 2008. Subsets of CD34+ and early engraftment kinetics in allogeneic peripheral SCT for AML. *Bone Marrow Transplant.* 41: 977-81.

110. Knudsen LM, Jensen L, Jarlback L, Hansen PG, Hunsen SW, Drivsholm L, Nikolaisen K, Gaarsdal E, Johnsen HE. 1999. Subsets of CD34+ hematopoietic progenitors and platelet recovery after high dose chemotherapy and peripheral blood stem cell transplantation. *Hematologica.* 84: 517-524.

111. Mohty M, Bilger K, Jourdan E, Kuentz M, Michallet M, Bourhis JH, Milpied N, Sutton L, Jouet JP, Attal M, Bordignon P, Cahn JY, Sadoun A, Ifrah N, Guyotat D, Faucher C, Fegueux N, Reiffers J, Maraninchi D, Blaise D. 2003. Higher doses of CD34+ peripheral blood stem cells are associated with increased mortality from chronic graft-versus-host disease after allogeneic HLA-identical sibling transplantation. *Leukemia.* 17: 869-75.

112. Körbling M, Huh YO, Durett A, Mirza N, Millar P, Ángel H, Anderlini P, van Besien K, Andreeff M, Przepiorka D, Deisseroth AB, Champlin RE. 1995. Allogeneic blood stem cell transplantation: peripheralization and yield of donor-derived primitive hematopoietic progenitor cells (CD34+ Thy-1dim) and lymphoid subsets, and possible predictors of engraftment and graft-versus-host disease. *Blood.* 86: 2842-8

113. Urbano I A, Solano C, Brunet S, Rubia J, Odriozola J, Zuazu J, Figueroa A, Caballero D, Martínez C, García J, Sanz G, Torradella M, Alegre A, Pérez OJ, Jurado M, Oyonarte S, Sierra J, García CJ, Rozman C. 1999. Allogeneic transplantation of selected CD34+ cells from peripheral blood experience of 62 cases using immunoadsorption or immunomagnetic technique. *Spanish Group of Allo-PBT. Bone Marrow Transplant.* 24: 225-7.

ANEXO I.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA. (DONADOR)

Lugar y Fecha: _____

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado: "RELACIÓN ENTRE LA CANTIDAD DE CÉLULAS PROGENITORAS CD133+ CON EL TIEMPO DE INJERTO EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO".

Registrado ante el Comité Local de Investigación en Salud o la CNIC número: _____
R-2008-3501-85

El objetivo del Estudio es: "Determinar el número de células progenitoras CD133+ requeridas para un trasplante alogénico exitoso".

Se me ha explicado que mi participación consistirá en:

Acudir a consulta médica en 3 ocasiones y toma de muestras de sangre para ser analizadas. En cada muestra se efectuará una punción en alguno de los brazos. Será necesario administrar un medicamento por vía subcutánea llamado Filgrastim durante cinco días cuyo efecto será sobre la médula de los huesos para que cierto tipo de células salgan al torrente sanguíneo y puedan ser cosechadas a través de una máquina de aféresis. Para poder extraer estas células se realizará una punción en ambos brazos con una aguja especial que se conectará a una máquina de aféresis, la cual seleccionará únicamente las células de interés y regresará el resto de los componentes sanguíneos a su cuerpo.

La cosecha celular después de la aféresis será de aproximadamente 60 ml, de los cuales se obtendrá una muestra de 5 ml para ser procesada en el laboratorio.

Las muestras de sangre tendrán un volumen aproximado de 5 ml.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son las siguientes:

El medicamento administrado previo a la donación de células, puede ocasionar dolores en huesos, músculos, problemas para orinar y disminución de la presión arterial.

Durante el procedimiento de aféresis puede sentir mareo, dolor de cabeza, disminución de la presión arterial y calambres. Durante todo el procedimiento un médico y una enfermera vigilarán la aparición de éstos síntomas y aplicarán el tratamiento adecuado.

En caso necesario y para aclarar cualquier duda podrá comunicarse con los médicos responsables de este proyecto: Dr. Jorge Vela Ojeda y Dr. Francisco Tripp Villanueva al teléfono 57-24-59-00 ext. 23213 y 23162.

Entiendo que conservo el derecho a retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el instituto.

El investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial.

Nombre y firma del paciente

Nombre y firma del Investigador principal:

DR. JORGE VELA OJEDA

Investigadores Asociados:

DRA. LAURA MONTIEL C.

Q. ROSA MA. MARTINEZ RDZ.

Testigo 1 _____

Testigo 2 _____

ANEXO II.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA. (PACIENTE)

Lugar y Fecha: _____

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado: "RELACIÓN ENTRE LA CANTIDAD DE CÉLULAS PROGENITORAS CD133+ CON EL TIEMPO DE INJERTO EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO".

Registrado ante el Comité Local de Investigación en Salud o la CNIC número:

____ R-2008-3501-85 _____

El objetivo del Estudio es: "Determinar el número de células progenitoras CD133+ requeridas para un trasplante alogénico exitoso".

Se me ha explicado que mi participación consistirá en:

Proporcionar una muestra de sangre previa al procedimiento de Trasplante una vez que se ha terminado con las dosis de quimioterapia (la quimioterapia ayudará a quitar las células cancerosas de su sangre con el fin de que las células sanas donadas puedan repoblar la médula de los huesos y proliferar logrando la curación de su enfermedad).

Posterior al trasplante se le tomarán muestras de sangre (para biometría hemática) diariamente para valorar si la sangre vuelve a tener células normales y con ello conocer si el procedimiento fue exitoso.

Acudirá a consulta Médica a los 100 días y los 6 meses posteriores al trasplante con el fin de tomarle muestras de sangre para exámenes generales de laboratorio que indicarán su estado de salud después del trasplante.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son las siguientes:

La toma de muestras sanguíneas originará dolor como cualquier punción para extraer sangre de una vena en los brazos.

En caso necesario y para aclarar cualquier duda podrá comunicarse con los médicos responsables de este proyecto: Dr. Jorge Vela Ojeda y Dr. Francisco Tripp Villanueva al teléfono 57-24-59-00 ext. 23213 y 23162.

Entiendo que conservo el derecho a retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el instituto.

El investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial.

Nombre y firma del paciente

Nombre y firma del Investigador principal:

DR. JORGE VELA OJEDA

Investigadores Asociados:

DRA. LAURA MONTIEL C.

Q. ROSA MA. MARTINEZ RDZ.

Testigo 1 _____

Testigo 2 _____