

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TITULO:

**EXPANSION EX VIVO DE PROGENITORES HEMOPOYETICOS
DE SANGRE DE CORDON UMBILICAL PARA TRASPLANTE**

AUTOR:

**TRABAJO DE TESIS PRESENTADA POR SERGIO QUEROL GINER PARA
OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGIA**

DEDICATORIA:

A mis padres, por su inmensa generosidad.

A Pily, por su suspiro infinito.

A Sergi y Aitana, por su canción.

AGRADECIMIENTOS

Según palabras del profesor Donall Thomas, premio Nobel de Medicina y Fisiología, el año 1990, la investigación clínica es siempre muy compleja, y no puede ser realizada únicamente por una persona. Es obvio, que entre los agradecimientos deberían estar muchas de estas personas, que han ayudado de forma directa e indirecta, a la consecución de este proyecto experimental. Entre ellas, me gustaría citar:

- A mis compañeros en los duros años de Residencia en Bellvitge, donde la formación médica asistencial fue prioritaria, fundamentalmente al equipo de guardia del Dr Corbella.
- A mis colegas y amigos, residentes del Servicio de Hematología del Hospital de Bellvitge, desde la primera generación, encabezada por el Dr Pere Dómenech, mi consejero en aquellos tiempos, hasta las “modernas” generaciones de residentes, todos ellos brillantes médicos y personas.
- A los maestros del Hospital, en mi formación en Hematología y Hemoterapia, Dres. Martínez Brotons, Domingo, Ferrán, Crespo, Reynaldo, Jordan, Clavo, Rubió, Muñoz, en la parte biológica. Y Dres. Fernández de Sevilla, Petit, Berlanga, Boqué y Callís, en la parte clínica.
- Al Profesor Alberto Grañena, por sus consejos, y el seguimiento de mi programa de formación tras la especialidad.
- Al Dr Joan García López, por los constantes consejos, apoyos, y por su fe en mis posibilidades, que le agradezco. Y sobre todo, por su amistad.

- A los compañeros del Departamento de Criobiología del IRO, ya que entre todos hemos participado, codo con codo, en el esfuerzo de tirar de la cuerda de un proyecto nuevo y arriesgado, encaminado a la terapia celular. Especialmente, quiero recordar a las personas que desde su trabajo diario han hecho posible crear el primer Banco de SCU de nuestro país: Carme Azqueta, Montse Gabarró, Núria Rotellà, Magdalena Uribes y Maria Ruz.
- A Gemma Capmany y Neus Franco por acompañarme en el desarrollo experimental.
- De forma especial, quiero recordar y agradecer a la Dra Carmen Canals, el Dr. José Antonio Cancelas, la Dra. Elena Cabezudo y el Dr Gregorio Martín-Henao, el tiempo que me han dedicado, que ha servido para poder conseguir este fruto.
- Al Dr Lluís Amat, por el tiempo y los buenos consejos que me ha dedicado. Al resto de personal del Hospital Universitari Sant Joan de Déu por su esfuerzo, especialmente al Dr Santi González por su dedicación al programa.
- A cuantos directa ó indirectamente, cerca ó lejos de la medicina, en mi Benicarló natal, me han ayudado en esta etapa.
- A las becas FIS 97/210,98/0753, 98 /1130 y 99/0612, DGYCYT PB95-0904, y los proyectos EUROCORD y NETCORD.
- A la *Deutsche José Carreras Leukämie Stiftung*.

El trabajo descrito en la presente Tesis ha sido realizado en el Departamento de Criobiología y Terapia Celular del Institut de Recerca Oncològica, en el Hospital Duràn i Reynals, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona.

INDICE:

1. REFLEXION INICIAL

2. ABREVIATURAS

3. INTRODUCCION GENERAL

4. OBJETIVOS

5. RESULTADOS

5.1. METODO DE CULTIVO:

5.2. DESARROLLO DE UN METODO DE CULTIVO DE CORTA DURACION,
LIBRE DE SUERO, ESTATICO Y APLICABLE A PROCEDIMIENTOS CLINICOS:

5.3. APLICACION CLINICA: METODO DE SELECCION POSITIVA DE SANGRE
DE CORDON UMBILICAL CRIOPRESERVADA Y EXPANSION EN SISTEMAS
ESTATICOS CERRADOS

6. DISCUSION GENERAL

7. CONCLUSIONES

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

INDICE DESGLOSADO:

| | |
|--|----|
| 1. REFLEXION INICIAL | 13 |
| 2. ABREVIATURAS | 19 |
| 3. INTRODUCCION GENERAL | 23 |
| 3.1. AMBITO DE LA TESIS | 25 |
| 3.2. LA SANGRE DE CORDON UMBILICAL (SCU) | 29 |
| 3.2.1. DEFINICION Y FISIOLOGIA | 29 |
| 3.2.2. TECNICA DE RECOGIDA DE LA SCU | 32 |
| 3.2.3. ONTOGENIA DEL SISTEMA HEMOPOYETICO | 35 |
| 3.2.4. CIRCULACION DE PROGENITORES HEMOPOYETICOS | 35 |
| 3.2.5. NACIMIENTO: SANGRE PLACENTARIA Y NEONATAL | 37 |
| 3.2.6. ANALISIS DE LA SCU: DESCRIPCION DEL CONTENIDO..... | 38 |
| 3.2.7. CARACTERIZACION DE LOS PROGENITORES HEMOPOYETICOS DE SCU | 41 |
| 3.2.7.1. ANALISIS CUANTITATIVO | 41 |
| 3.2.7.2. ANALISIS DE LAS CELULAS CD34+ | 53 |

| | | |
|----------|--|----|
| 3.2.7.3. | ESTUDIO IN VIVO SOBRE EL POTENCIAL DE INJERTO DE LA SCU | 62 |
| 3.2.8. | POTENCIAL HEMOPOYETICO COMPARADO DE MEDULA OSEA, SANGRE PERIFERICA MOVILIZADA Y SANGRE DE CORDON UMBILICAL | 63 |
| 3.2.9. | RESULTADOS CLINICOS INICIALES DEL TRASPLANTE DE SCU | 67 |
| 3.3. | EXPANSION DE CELULAS HEMATOPOYETICAS | 71 |
| 3.3.1. | EL SISTEMA HEMOPOYETICO | 72 |
| 3.3.1.1. | LAS CELULAS HEMOPOYETICAS | 72 |
| 3.3.1.2. | LOS FACTORES DE CRECIMIENTO HEMOPOYETICO | 75 |
| 3.3.1.3. | LOS RECEPTORES CELULARES DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO HEMOPOYETICO | 79 |
| 3.3.1.4. | REGULACION DE LA HEMOPOYESIS | 80 |
| 3.3.2. | LA HEMOPOYESIS IN VITRO | 85 |
| 3.3.2.1. | CULTIVOS TIPO DEXTER | 85 |
| 3.3.2.2. | CULTIVOS DEPENDIENTES DE SUERO Y CITOQUINAS | 87 |
| 3.3.2.3. | CULTIVOS EN MEDIOS LIBRES DE SUERO | 91 |
| 3.3.3. | MODELOS ANIMALES DE APLICACIÓN DE LA EXPANSION EX VIVO | 91 |
| 3.3.4. | EXPANSION EX VIVO EN CLINICA: OBJETIVOS | 94 |
| 3.3.5. | METODOS DE EXPANSION DE USO CLINICO | 95 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 3.3.5.1. | CULTIVOS ESTATICOS | 96 |
| 3.3.5.2. | CULTIVOS DE PERFUSION | 99 |
| 3.3.6. | SELECCION POSITIVA DE CELULAS CD34 Y EXPANSION | 102 |
| 3.4. | INTRODUCCION AL TRABAJO EXPERIMENTAL | 105 |
| 4. | OBJETIVOS | 107 |
| 5. | RESULTADOS | 111 |
| 5.1. | METODO DE CULTIVO | 113 |
| | Presentado como publicación en Haematologica 1999; 84: 493-98. Título: Effect of glycosylation of recombinant human granulocytic colony-stimulating factor on expansion cultures of umbilical cord blood CD34+ cells | |
| 5.2. | DESARROLLO DE UN METODO DE CULTIVO DE CORTA DURACION, LIBRE DE SUERO, ESTATICO Y APLICABLE A PROCEDIMIENTOS CLINICOS | 115 |
| | Presentado como publicación en Haematologica 1999; 84: 675-82. Título: Short-term, serum-free, static culture of cord blood-derived CD34+ cells: effects of FLT3-L and MIP-1-alfa on in vitro expansion of hematopoietic progenitor cells | |

| | |
|---|-----|
| 5.3. APLICACION CLINICA: METODO DE SELECCION POSITIVA DE SANGRE DE CORDON UMBILICAL CRIOPRESERVADA Y EXPANSION EN SISTEMAS ESTATICOS CERRADOS | 117 |
| Presentado como publicación en Transfusion 2000; 40: 625-31. | |
| Título: Direct immunomagnetic CD34+ cell selection method from cryopreserved cord blood grafts for ex vivo expansion protocols | |
| 6. DISCUSION GENERAL..... | 119 |
| 6.1. INTRODUCCION | 121 |
| 6.2. DESARROLLO TECNOLOGICO DE UN CULTIVO A CORTO TERMINO, LIBRE DE SUERO: ESTUDIOS FENOTIPICOS Y FUNCIONALES | 125 |
| 6.3. DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA BIOTECNOLOGICA PARA LA APLICACIÓN CLINICA DE LA EXPANSION..... | 129 |
| 6.4. EXPERIENCIA CLINICA DE 5 TRASPLANTES DE SCU EXPANDIDA..... | 135 |
| 6.5. JUSTIFICACION TEORICA DE UN NUEVO PROTOCOLO DE EXPANSION EX VIVO PARA REDUCIR LOS DIAS DE APLASIA MIELOIDE | 139 |
| 7. CONCLUSIONES | 141 |
| 8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 145 |

1. REFLEXION INICIAL

Quizás mis ideales adolescentes motivaron mi interés por la investigación biomédica. Sin prácticamente antecedentes familiares, realicé mis estudios de medicina al amparo de la ciudad de Valencia, junto con una generación de brillantes compañeros.

Los vaivenes de la vida me llevaron a Barcelona, interesado por la Hematología, una especialidad que permite el estudio clínico-biológico de la fisiología y las enfermedades. Cuatro años de formación médica en la Ciudad Sanitaria y Universitaria de Bellvitge, me llevaron al conocimiento de la parte asistencial de la Medicina y de los límites de las terapias actuales para muchas de las enfermedades que se diagnosticaban.

La Hematología Clínica se enfrenta, entre otras, con enfermedades neoplásicas del árbol hemopoyético. Su tratamiento actual depende del éxito en la erradicación de las clonas tumorales por medio de la quimioterapia y la radioterapia. La capacidad de curación, sin embargo, se muestra limitada, a pesar de la utilización de esquemas de poliquimioterapia y dosis elevadas. La posibilidad de curación de la enfermedad, pasa en muchos casos por la substitución de la función medular dañada por una nueva hemopoyesis sana, en un procedimiento conocido como trasplante del sistema hemopoyético. El trasplante de MO constituye una forma de una nueva area terapéutica que con el tiempo se ha bautizado como Terapia Celular.

Corría el año 1993, cuando recomendado por el Profesor Alberto Grañena, llegué al Departamento de Criobiología y Terapia Celular, dónde el Dr Joan García López se adelantó a su tiempo, al definir en nuestro entorno, las bases de un Servicio de Citoterapia, basado en la capacidad de las células de promover efectos terapéuticos. Esta nueva forma de terapia, motivó en mi las ansias de la investigación, que tanto influyeron en mi juventud, para dedicarme al estudio de la Medicina.

Con la ayuda de la beca de la CSUB para residentes que finalizaban su formación, durante 1 año me dedique a formarme en Terapia Celular y a desarrollar técnicas de manipulación ex vivo de células hemopoyéticas. Un año antes, la Dra Joanne Kurtzberg, había realizado en Duke, Carolina del Norte, USA, el primer trasplante de SCU de origen no emparentado, criopreservado en el Banco de Sangre de Cordón de Nueva York, en un programa pionero diseñado por el Dr Pablo Rubinstein. Gracias a la capacidad de anticipación del futuro, cualidad destacada del Dr García, ese mismo año, me dedique al estudio de las características biológicas de la SCU, secuestrada en la placenta después del nacimiento del recién nacido.

Creo que mi vinculación desde un principio con esta nueva tecnología me ha permitido vivir y descubrir como se consolidan los nuevos avances en Medicina, y como se adquieren los conocimientos necesarios para optimizar el resultado clínico de una nueva esperanza.

Cuando en 1958, el Pr. Donnall Thomas, realizó el primer trasplante de MO, y se desarrolló toda una nueva era de estudio que llevó al conocimiento del sistema de histocompatibilidad, y al conocimiento de la arquitectura del sistema hemopoyético, yo no había nacido. Con el trasplante de la SCU, el estudio de la hemopoyesis fetal y neonatal, y la evaluación clínica de los resultados, he podido vivir 30 años después el origen de una nueva estrategia terapéutica y los esfuerzos colaterales enfocados al conocimiento de los factores que influyen en el éxito del tratamiento.

Un laboratorio de Terapia Celular debe tener por objetivo, el desarrollo de productos terapéuticos basados en los efectos beneficiosos de las células obtenidas y/o manipuladas de los diferentes tejidos. El modelo de trasplante de SCU ofrece la posibilidad de estudiar y desarrollar estrategias encaminadas a la implementación

clínica de nuevas técnicas de terapia celular como la terapia génica y el trasplante de células madre, en otras áreas de la medicina.

El estudio y desarrollo de esta Tesis, en paralelo con el Banco de SCU de Barcelona, que se constituyó en Octubre de 1995, se circunscribe en el ámbito del la I+D del proyecto, encaminado a mejorar los resultados clínicos actuales y fomentar su utilización segura y adecuada para los pacientes. El hecho de que la SCU sea un producto habitualmente desechado, la facilidad de su recolección, la fuente “ilimitada” de donantes, la calidad biológica de sus células, cercanas a la época embrionaria y fetal del desarrollo, y la posibilidad de un uso amplio en diferentes estrategias de terapia celular, han hecho de esta iniciativa un campo de gran interés científico y que se encuentra en la actualidad en plena expansión.

Durante este tiempo y gracias a la aportación de diversas ayudas del FIS y de la Deutsche José Carreras Leukämie Stiftung, se ha podido desarrollar el trabajo experimental en cultivos celulares de expansión, que son la base de la presente Tesis Doctoral.

Finalmente, después de casi 7 años de trabajo en Terapia Celular y trasplante hemopoyético, he podido reunir la información suficiente para presentar el presente Trabajo, que encuadraría en el ámbito de investigación aplicada ó desarrollo tecnológico. Fundamentalmente, el contenido explica las características biológicas de la SCU como fuente de progenitores para trasplante, incide en sus limitaciones y propone la posibilidad de generar ex vivo células del sistema hemopoyético para modular el injerto. El producto que sea infundido, con sus nuevas características, deberá desde un punto de vista teórico servir para mejorar los resultados del trasplante de SCU.

Una vez desarrollada esta fase experimental, la tecnología descrita está disponible para su utilización en clínica, en programas y protocolos controlados que persigan la mejora de los resultados de esta modalidad de trasplante no emparentado.

Quizás después de 7 años en el Institut de Recerca Oncològica, conociendo las dificultades de la investigación en nuestro entorno, haya podido pagar a mi espíritu adolescente sus ansias de dedicación a un proyecto de investigación, a la Ciencia en definitiva. Pero tal vez, mi formación médica, adquirida en los periodos duros de formación y residencia, quieran en estos momentos hacer útil todo este esfuerzo y poder ofrecer con determinación, a esos pacientes que siguen acudiendo a las consultas del Hospital Oncológico, la posibilidad de alternativas terapéuticas que puedan llevar a la curación de sus enfermedades.

2. ABREVIATURAS

BFU-E: (Unidad formadora de colonias en estallido eritroides)

BFU-Mk: (Unidad formadora de colonias en estallido megacariocíticas)

CAFC: (Células formadoras de áreas en empedrado)

CFU: (unidad formadora de colonias)

CFU-Blast: (Unidades formadoras de colonias blásticas)

CFU-E: (Unidad formadora de colonias eritroides)

CFU-Eo: (Unidad formadora de colonias de eosinófilos)

CFU-G: (Unidad formadora de colonias granulocíticas)

CFU-GEMM: (Unidad formadora de colonias granulocíticas, macrofágicas, eritroides, monocíticas y megacariocíticas)

CFU-GM: (Unidad formadora de colonias granulocíticas y macrofágicas)

CFU-M: (Unidad formadora de colonias monocíticas)

CFU-Mix: (Unidad formadora de colonias mieloeritroides)

CFU-Mk: (Unidad formadora de colonias megacariocíticas)

CLONE: (Eficiencia clonogénica de las células CD34+)

CMH: (Célula madre hemopoyética)

CMN: (Células mononucleadas)

CN: (células nucleadas)

CRU: (unidad de repoblación competitiva)

EICH: (Enfermedad injerto contra huésped)

EPO: (Eritropoyetina)

FCH: (factores de crecimiento hemopoyético)

FLT3-L: (Ligando de la tirosina-kinasa 3 de hígado fetal)

G-CSF: (factor estimulante de colonias granulocíticas)

GM-CSF: (factor estimulante de colonias gránulo-monocíticas)

GMP: (*Good manufacturing practice*)

HPP-CFC: (Células formadoras de colonias de alto poder proliferante)

IL: (interleukina)

Kg: (kilogramo)

mL: (mililitro)

μL : (microlitro)

MGDF: (*Megakaryocytic growth and development factor*)

MIP-1α: (Proteína inhibidora de macrófacos-1α)

MO: (Médula Ósea)

Ng: (nanogramos)

PH: (Progenitores hemopoyéticos)

SCF: Stem cell factor

SCU: (Sangre de Cordón Umbilical)

SP: (Sangre periférica)

SPM: (Sangre periférica movilizada)

SRC: (*SCID repopulating cells*)

TBI: (Irradiación corporal total)

TPO: (Trombopoyetina)

3. INTRODUCCION GENERAL

3.1. AMBITO DE LA TESIS

El trasplante de SCU se ha convertido en una alternativa al trasplante de MO ó SP. La demostración de su capacidad de implante ha permitido desarrollar protocolos clínicos, que han servido para analizar las particularidades de esta nueva fuente de progenitores. Los primeros resultados del análisis de diferentes series, que en su totalidad conforman más de 1000 trasplantes realizados, han sido recientemente publicadas (1, 2). La conclusión más importante es la confirmación de la transplantabilidad del inóculo, aunque la cinética del injerto conlleve a un periodo de aplasia más prolongado. Estos trabajos sugieren una menor incidencia de la EICH, lo que compensaría la mayor tasa de morbilidad relacionada con el retraso del injerto mieloide. Esta diferencia se mantiene cuando se comparan la incidencia y severidad de la EICH crónica, mucho mayor en los trasplantes de SPM y MO (3). Esta disminución de la EICH, no parece influir en el efecto injerto contra leucemia, por cuanto las tasas de recaída no son superiores a las observadas con MO en una comparación de series de trasplantes alogénicos emparentados HLA-idénticos .

A la vista de estos resultados esperanzadores, en este estudio se propone desarrollar técnicas de terapia celular encaminadas a dar soporte hemopoyético y celular que permitan un injerto mieloide rápido y funcional. El objetivo es mejorar la supervivencia, eliminando los eventos relacionados con la neutropenia y plaquetopenia prolongadas, y facilitar su utilización en adultos. Para ello, se ha desarrollado un sistema de cultivo ex vivo, encaminado a la amplificación de los PH con capacidad de repoblación a corto plazo. En todo momento, el objetivo es proponer un sistema

reproducibile, estándar y fácilmente aplicable a un laboratorio clínico. Este sistema está basado en la expansión en un soporte estático (bolsas semipermeables), utilizando productos elaborados con estándares farmacéuticos (citoquinas y medios libres de suero). El producto obtenido ha sido sometido a controles de calidad funcional para soportar su utilización clínica.

Como justificación de este Trabajo, en la introducción se revisa la SCU como inóculo transplantable. Se define, y se explica, la razón de su riqueza en PH, se compara con la de otras fuentes como MO ó SPM, y se evalúa la calidad de los mismos, en función de ensayos fenotípicos y funcionales, tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos datos se presentan como revisión de la literatura, y al mismo tiempo se confrontan con datos propios, obtenidos paralelamente al desarrollo experimental de la presente Tesis. Finalmente, se analiza desde una perspectiva clínica, el contenido de CMH comparando las fuentes habituales de trasplante alogénico, y se repasan las series más largas de trasplante de SCU que han sido publicadas. Con ello, se presenta un nuevo tejido hemopoyético transplantable, cuya particularidad mayor es la reducida incidencia de la EICH con mantenimiento del efecto contra tumor, que debería conducir a la disminución de la morbimortalidad del procedimiento.

Como se comentará más tarde, el contenido de progenitores es limitado, por lo que el prendimiento es pobre en ocasiones. Las características biológicas de estos progenitores, con gran capacidad de proliferación, permiten utilizarlos como plataforma para el desarrollo de técnicas de terapia celular encaminadas a promover una mejor tolerancia del trasplante. En la segunda parte de la Introducción, se repasan los principios de la expansión, basados en la arquitectura funcional de la hemopoyesis y sus factores reguladores. Con esta base, se han desarrollado cultivos *in vitro* que reproducen las condiciones de la hemopoyesis *in vivo*, que sirven para generar

diferentes subtipos celulares con finalidad terapéutica. Se repasan los resultados publicados sobre expansión de PH, y mantenimiento de CMH. Finalmente, se incide en la producción de PH de línea mieloide. La diferenciación linfoide se escapa del ámbito de la presente Tesis.

3.2. SANGRE DE CORDON UMBILICAL.

La SCU es un tejido, habitualmente desechado, que queda secuestrado en la placenta tras el nacimiento. Tras su recogida, se convierte en un tejido hemopoyético, con capacidad de ser utilizado para la regeneración de la función medular en individuos sometidos a mieloablación. A continuación se define el producto y la fisiología de la circulación feto-placentaria tras el nacimiento, y se describen las características del producto como tejido hemopoyético.

3.2.1 DEFINICION Y FISIOLOGIA

En el momento del nacimiento, el volumen sanguíneo del niño podría aumentar hasta un 60% si los vasos placentarios se vaciaran completamente en el torrente vascular del neonato, antes del clampaje del cordón. Se ha estimado que los vasos placentarios contienen entre 75 y 125 mL de sangre, lo que equivale, aproximadamente, a una tercera parte de la volemia del neonato (4). En condiciones normales, una cuarta parte de la transfusión placentaria tiene lugar durante los primeros 15 segundos tras el nacimiento, y la mitad al finalizar el primer minuto. En un estudio clásico (5), se encontró una media de distribución de la volemia total en porcentaje de 67:33 al nacimiento, 80:20 al minuto de vida, y 87:13 a la finalización de la transfusión placentaria.

Las arterias umbilicales se constriñen rápidamente después del nacimiento, evitando el flujo desde el feto hacia la madre; sin embargo, la vena umbilical permanece dilatada, permitiendo que la sangre placentaria circule en la dirección marcada por la

gravedad. De esta manera, los neonatos situados por debajo del nivel de la placenta continúan ganando sangre, pero los situados por arriba de ese nivel pueden sangrar hacia ella.

Los efectos de la transfusión placentaria sobre la volemia son muy variables. Esto es debido a la variabilidad de las técnicas empleadas para su medida y al tiempo en que las muestras han sido tomadas. Durante las primeras horas posteriores al nacimiento, el plasma, aparentemente, deja la circulación. Parece que cuanto mayor es la transfusión placentaria, mayor es la pérdida plasmática. De hecho, en el tercer día de vida no hay prácticamente diferencias en el volumen total de sangre, dependiendo del método de clampaje elegido. Usher y cols (6) encontraron que los recién nacidos con clampaje retardado tenían una volemia de 93 mL/kg a las 72 horas, mientras que los neonatos sometidos a clampaje precoz la tenían de 82 mL/kg. Sin embargo, en el estudio si que se obtuvieron diferencias más llamativas en la masa de células rojas y en la concentración de hemoglobina: a las 72 horas el volumen de hematíes era de 49 *versus* 31 mL/kg, respectivamente.

Estos datos indican que los neonatos sometidos a clampaje tardío, tienen una mayor tasa de hemoglobina durante la primera semana de vida, en comparación a aquellos sometidos a clampaje precoz. Un volumen reducido de masa eritrocitaria se asocia a un aumento de la mortalidad en prematuros afectados por distress respiratorio (6). Esto aconseja la realización de un clampaje tardío en prematuros. También se ha visto que el retraso del clampaje en prematuros, se asocia con una menor incidencia de transfusiones y mejor supervivencia (7, 8). En el caso contrario, en neonatos con clampaje tardío, se ha descrito sobrecarga circulatoria e insuficiencia cardiaca congestiva (9, 10). En las cesáreas se recomienda un clampaje precoz debido a que en clampajes tardíos se han asociado casos de acidosis metabólica y respiratoria (11).

Como se puede comprobar la conducta obstétrica puede determinar un menor ó mayor volumen retenido en la placenta, lo que comporta una gran variabilidad en los volúmenes sanguíneos obtenidos en la recolección de SCU. La conducta obstétrica en las maternidades participantes en programas de recogida de SCU, deberá ser coherente con su actitud habitual, y bajo ningún concepto se modificará por el hecho de estar delante de una donación de SCU. Esta conducta obstétrica no está totalmente definida. En una reciente revisión de Prendiville et al.(12), se concluye que una actitud activa en el tercer estadio del parto es más adecuada, ya que produce menos complicaciones maternas, sin detectarse desventajas para el neonato. Esta actitud incluye administración de oxitocina profiláctica después del nacimiento, clampaje y sección precoz del cordón, y tracción controlada del cordón umbilical. Las complicaciones que se previenen con esta conducta son las hemorragias postparto, y otras complicaciones importantes del tercer estadio del parto. En esta línea se manifiestan otros obstetras de nuestro entorno (13), que apuntan que las ventajas que se aducían en favor del clampaje tardío, se han mostrado poco útiles, y además retrasan las maniobras de reanimación del recién nacido.

Si es así, delante de una parto a término al que se le somete a clampaje precoz, la proporción de sangre retenida en la placenta es un 33% de la volemia total. Considerando una volemia total de 85 mL/kg de media, y un peso medio de 3,3 kg, la volemia resultante en un neonato oscila alrededor de 280 mL. Aplicando los porcentajes calculados por Yao y cols (14), si el clampaje se realiza en los primeros 15 segundos, el promedio de volumen de sangre contenido en la placenta sería de 92 mL. Si se realizara el clampaje un minuto después del nacimiento esta cifra sería de 56 mL, y si se realizara al final de la transfusión placentaria, el volumen residual medio sería de 36 mL.

3.2.2. TECNICA DE RECOGIDA DE LA SCU

Tras el clampaje del cordón umbilical, el volumen sanguíneo atrapado en la placenta, pasa a ser un producto de desecho, si no es recuperado adecuadamente. Existen dos grandes técnicas de recogida: una, que se realiza cuando la placenta está todavía in útero, y una segunda, que trata de recuperar la sangre placentaria después del alumbramiento de la misma. Desde un plano teórico, las ventajas de la primera son mayores por cuanto se puede iniciar la recogida de forma precoz, con posibilidad de recoger un mayor volumen, y un menor riesgo de contaminación bacteriana. La desventaja fundamental es que la práctica de esta actividad conlleva un acto médico externo durante la asistencia del periodo de alumbramiento. Esto origina la necesidad de obtener un consentimiento informado previo de la madre, para que acepte la donación de la SCU, como queda reflejado en nuestra regulación legal ordenada en el Real Decreto 411/1996.

La correcta asistencia en el periodo de alumbramiento, previene el riesgo de graves complicaciones hemorrágicas. La conducta en este periodo es activa: alumbramiento dirigido. Durante el periodo expulsivo se recomienda la administración profiláctica de oxitocina para acelerar el periodo de alumbramiento. Una vez evidenciado el desprendimiento de la placenta (observación de la salida del hematoma retroplacentario, descenso del cordón umbilical, e inmovilidad del cordón al ascender el útero a través de las paredes abdominales), se efectúa una ligera presión sobre el fondo uterino, y una ligera tracción del cordón umbilical para favorecer su salida.

En el primer método de recogida presentado, un personal exclusivo para la recogida de la SCU punciona la vena umbilical distalmente, inmediatamente tras el clampaje

del cordón. Por gravedad se rellena una bolsa de plástico con 21 mL de anticoagulante (CPD), agitando para evitar la formación de coágulos. El drenaje de la sangre placentaria se produce en una media de 3 minutos. Tras ello, se ayuda mediante expresión del cordón a la salida de la sangre residual. Incluso, se puede efectuar una segunda punción, cerca de la inserción del cordón en la placenta, para recoger la sangre exprimida por las últimas contracciones uterinas. En un estudio australiano, se comprobó que el drenaje de la sangre retenida en la placenta comportaba ratios de placentas retenidas, hemorragias maternas postparto, y transfusión similares al grupo de madres control (15), no evidenciándose efectos indeseables por la aplicación de esta técnica. En todo caso, parece que se produce una aceleración en el alumbramiento, que sería beneficioso para prevenir eventos hemorrágicos de la madre.

Existe una técnica alternativa, que no necesita en principio autorización materna previa a la obtención de la sangre placentaria. Esta técnica recoge la SCU una vez alumbrada la placenta. En una sala adjunta, se cuelga la placenta en un dispositivo que permite la accesibilidad a la parte distal del cordón y se punciona la vena umbilical. Se obtiene la sangre por gravedad. Este método tiene más riesgo de contaminación bacteriana, y permite obtener un menor volumen de sangre, por cuanto muchos territorios de la microcirculación han iniciado los fenómenos de coagulación, con el correspondiente bloqueo en el drenaje de la sangre arterial. Aproximadamente, se cifra en un 20% el volumen de sangre, que se deja de obtener, mediante esta segunda técnica (16). Su utilización se recomienda en las situaciones donde no sea posible la dedicación de personal externo en la atención del parto y no se haya podido realizar un programa de información preparto adecuado, que incluya el consentimiento firmado de la madre para la donación.

En nuestra experiencia particular, desarrollada en el banco de SCU de Barcelona, las maternidades que colaboran, realizan la recogida de la SCU con la técnica de la placenta in útero. En el Hospital de Sant Joan de Déu de Barcelona, la media de volumen obtenido es de 79 mL. Esto supone un aprovechamiento del 85%, respecto al volumen teórico contenido en la placenta.

La SCU recogida, es conservada a temperatura ambiente, y enviada al laboratorio de procesamiento y almacenamiento del banco de cordón, dentro de las 24 horas siguientes a su recogida. De hecho, el tiempo medio desde la recogida a la criopreservación del producto, es de 21 hora, en nuestro banco.

Por lo tanto, la recogida de la SCU como tal, no tiene ningún riesgo para el recién nacido, y en todo caso, puede tener efectos beneficiosos para la madre, por cuanto puede disminuir el riesgo de hemorragias (cuando se realice la técnica in útero). El volumen de SCU obtenido para trasplante depende principalmente de la política de clampaje del centro obstétrico. Parecen existir datos que sugieren realizar un clampaje precoz, en embarazos a término, sin riesgo obstétrico, por cuanto no han demostrado efectos perjudiciales para el neonato y si beneficiosos para la madre. Esta política beneficiaría la posibilidad de obtener mejores volúmenes de SCU. Otros factores obstétricos, como el peso del recién nacido, el peso de la placenta, el trabajo de parto, el tipo de maniobra del recién nacido tras el nacimiento, etc, pueden condicionar el volumen residual de sangre placentaria (17). La técnica de recogida es el factor final que condiciona un mayor rendimiento en la obtención de la SCU. Como se ha comentado previamente, la técnica intraútero tiene un aprovechamiento medio del 85%, mientras que la técnica extraútero lo tiene del 65%.

3.2.3. ONTOGENIA DEL SISTEMA HEMOPOYETICO

Ontogénicamente, la hemopoyesis se origina extraembrionariamente en el saco vitelino hacia los 17 días post-fecundación, en los islotes sanguíneos (18, 19). Es una hemopoyesis exclusivamente eritroide. La hemopoyesis intraembrionaria se ha observado hacia la segunda decena de días a partir de la diferenciación de las células mesodérmicas en la zona medial del esbozo aórtico y la esplacnopleura, y en las células del órgano aorta-gónada-mesonefros. A partir de los 30 días, la diferenciación del tejido hemopoyético se sitúa en la cara ventral de la aorta descendente, fundamentalmente en el lugar de nacimiento de la arteria vitelina. A este nivel existen unos progenitores mesodérmicos (hemangioblastos) precursores de las CMH y de las células endoteliales vasculares. Durante la diferenciación atraviesan la íntima vascular y protuyen en el lumen vascular. Estas CMH se desprenden y colonizan el hígado fetal donde se sitúa la hemopoyesis hacia la semana 10 de gestación. La hemopoyesis sigue siendo eritropoyética. A partir de la semana 16, la MO fetal se coloniza y también el timo, apareciendo la hemopoyesis mieloide y linfoide, que se hace mayoritaria (20, 21).

3.2.4. CIRCULACION DE PROGENITORES HEMOPOYETICOS

Durante la edad embrionaria y fetal, existe una circulación fisiológica de PH por el torrente sanguíneo desde los distintos nichos hemopoyéticos. En un estudio realizado en fetos de 10 semanas, se ha podido determinar que un $5,1\% \pm 1$ de las células CD45+ expresan el antígeno CD34. Esto supone 66 ± 24 células CD34/ μ l. Esta concentración, por volumen de sangre, es similar a la encontrada en la SCU en este mismo estudio

($56 \pm 39/\mu\text{l}$). Las CMN de la SP fetal en el primer trimestre de gestación, sembradas en cultivos clonogénicos, son capaces de desarrollar progenitores de todos los linajes: CFU-GEMM, BFU-E, CFU-GM y CFU-Mk. Estas células presentaban un gran potencial de expansión *ex vivo* tanto del linaje mixto como del eritroide. Estos datos sugieren que existe un número significativo de progenitores circulantes comprometidos y multipotentes en el primer trimestre de gestación, con gran capacidad de proliferación (22). El porcentaje de células CD34+ circulantes respecto a las CMN disminuye durante la gestación: persiste elevado a las 17-21 semanas (6,4% de las CMN), pero ya es sólo del 1,2% a la semana 37-41 de gestación. La disminución porcentual se inicia a partir de la semana 28, lo que indicaría un incremento de células maduras circulantes a partir de esa edad. La clonogenicidad de las células CD34+ en etapas precoces es parecida a los fetos a término, aunque existe una mayor número de BFU-E (23). En definitiva, prácticamente desde el establecimiento de la circulación en el embrión se pueden detectar progenitores circulantes. La capacidad proliferativa de los mismos es mayor en edades más tempranas, presentando mayor porcentaje de colonias mixtas, y mayor tamaño, en los ensayos clonogénicos. Este porcentaje disminuye, a partir de la semana 28 por la presencia de un mayor número de células maduras en SP. Sin embargo, la concentración de progenitores circulantes por unidad de volumen, se mantiene fija durante toda la época embrionaria y fetal, indicando un estado de movilización mantenido durante todo este periodo. Este proceso de movilización, garantizaría la repoblación de los nuevos nichos de CMH formados durante el desarrollo fetal, y supondría una amplificación máxima del *pool* de CMH, que acabaría justamente en el momento del nacimiento.

3.2.5. NACIMIENTO: SANGRE PLACENTARIA Y SANGRE NEONATAL

La circulación elevada de los PH por la SP del feto (movilización) se mantiene hasta el momento del nacimiento, pudiéndose detectar y obtener importantes cantidades de CMH en la sangre retenida en el cordón umbilical/placenta tras el clampaje. Esta sangre como se ha discutido anteriormente tiene unas características funcionales parecidas a la de la SP fetal obtenida por funiculocentesis durante la gestación (24).

Tras el nacimiento, la circulación neonatal experimenta una drástica disminución de PH circulantes (Broxmeyer y cols calcularon una disminución media de 54-70% del nivel de la SCU a las 24 horas) (25), acercándose a los valores del adulto a partir de la 1ª semana de vida extrauterina (anidación), aunque algunos autores han encontrado valores circulantes ligeramente superiores a los basales del adulto semanas después del nacimiento (26).

Estas afirmaciones han sido comprobadas por diferentes autores. En el artículo descriptivo inicial, Broxmeyer y cols (27) demuestran una disminución notable de los PH circulantes, hasta que prácticamente llegan a nivel basal, a partir de la semana de vida. Estos datos son coherentes con los estudios iniciales sobre la transplantabilidad de la SP de ratones recién nacidos, y el fallo de injerto que se observa tras la infusión de la SP de ratones de 1 semana de vida (28). Recientemente, otros autores han estudiado la cinética de desaparición de estos progenitores desde el nacimiento (29). Las células CD34+ disminuyen rápidamente después del nacimiento, hasta un 30% del valor inicial a las 48 horas. La velocidad de disminución es máxima en las primeras 4 horas de vida.

Estos datos son coherentes con los obtenidos por nuestro grupo (manuscrito en preparación). En nuestro laboratorio, hemos realizado un estudio en colaboración con

el Hospital Universitari Sant Joan de Déu, con el ánimo de monitorizar en un mismo individuo dicha cinética de desaparición y poder cuantificarla en función de las horas posteriores al nacimiento. En la tabla 3.1, se muestran las cifras de CD34 y colonias según el tiempo transcurrido desde el nacimiento, en una serie de 30 neonatos.

3.2.6. ANALISIS DE LA SCU: DESCRIPCION DE SU CONTENIDO

La SCU es SP fetal secuestrada en el territorio placentario en el momento del clampaje del cordón. Como hemos indicado, la media de sangre neta recuperada mediante la técnica intraútero con clampaje precoz es de alrededor de 80 mL.

El análisis de la SCU por medio de un contador automático muestra un hematocrito de $49\% \pm 5$. La serie roja presenta los siguientes parámetros: hemoglobina $15,3 \pm 1,3$ g/dl, hematias $4,3 \times 10^6 \pm 0,4$ /mL, VCM 112 ± 6 fl, HCM $36,2 \pm 2,2$ pg, CHCM $30,9 \pm 1,3$ g/dl, y MCHC $30,4 \pm 1,2$ g/dl. Los hematíes nucleados presentes son muy variables pero de media son el $3,13\% \pm 1,11$ de las CN. La media de células blancas es de $16,2 \pm 4,7 \times 10^6$ /mL. La fórmula leucocitaria es: granulocitos ($51 \pm 8\%$), linfocitos ($40 \pm 7\%$), monocitos ($5 \pm 4\%$), y un 4% de otros tipos celulares, fundamentalmente eritroblastos, eosinófilos y algunas formas blancas inmaduras (4). En cantidades menores existen otros tipos celulares como células CD34+ ($0,30 \pm 0,17\%$), células dendríticas y probablemente, células madre mesenquimales, y otros grupos celulares de creciente interés. También en cantidades variables, puede existir una contaminación potencial de células de origen materno, fruto de la comunicación feto-materna que acontece en el momento del parto. En estudios utilizando técnicas de alta sensibilidad, se ha podido encontrar rastros significativos de ADN materno en el 25-30% de las unidades de SCU (30, 31).

Tabla 3.1. Cinética de desaparición de PH de SP tras el nacimiento

| N=30 | %CD34 | CFU-GM/ 10 ⁵ CN | BFU-E/ 10 ⁵ CN | CFU-Mix/ 10 ⁵ CN |
|---------------------------------------|-----------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Sangre de cordón (0 horas) | 0,25±0,13 | 75±37 | 23±15 | 49±32 |
| Neonato (3 horas) | 0,19±0,12 | 51±31 | 16±13 | 34±20 |
| Neonato (12 horas) | 0,11±0,07 | 28±17 | 10±13 | 23±18 |
| Neonato (30 horas) | 0,06±0,04 | 21±15 | 9±12 | 17±18 |
| Neonato (60 horas) | 0,05±0,03 | 15±16 | 8±8 | 13±12 |

Resultados expresados como media y desviación estándar de 30 determinaciones realizadas a un mismo individuo a tiempos sucesivos (0, 3, 12, 30 y 60 horas de vida).

3.2.7. CARACTERIZACION DE LOS PROGENITORES HEMOPOYETICOS

En este apartado, se comentan las características particulares de los PH presentes en la SCU. Primero, se describe el contenido global medio de una unidad de SCU. A continuación, se describen las características de los PH CD34+, atendiendo a su fenotipo y a ensayos funcionales *in vitro*.

3.2.7.1. ANALISIS CUANTITATIVO:

La SCU contiene PH circulantes que son los responsables de la reconstitución medular tras trasplante. El análisis de las células CD45+ de la SCU muestra que un $0,30\% \pm 0,17$ de ellas coexpresan el antígeno CD34, característico de los PH. El fenotipo de la CMH responsable de la recuperación medular a corto y largo plazo no ha sido completamente definido, pero probablemente sea heterogéneo, respondiendo a diversos estadios funcionales de la CMH. Experiencias en trasplante han demostrado, que la capacidad de repoblación medular, se encuentra circunscrita a los progenitores CD34+ (32), aunque, recientemente, se han publicado evidencias de CMH repobladoras en fracciones que no expresan CD34, en modelos murinos (33, 34). Al mismo tiempo, se ha podido objetivar implantes hemopoyéticos, tras infusión de células seleccionadas por la expresión de CDw90 (35) y KDR (36). En todo caso, aunque no exista un ensayo cuantitativo directo sobre las CMH presentes en un injerto, la expresión de CD34 se ha utilizado con éxito como indicador válido de la capacidad de prendimiento. También, otros ensayos funcionales, como la cuantificación de células clonogénicas (CFU de distintos linajes) , se ha utilizado como exponente del *pool* de progenitores presentes en un inóculo hemopoyético (37-

39). Evaluando funcionalmente estos PH, Broxmeyer y cols (25, 27) propusieron la SCU como fuente de CMH, con capacidad de ser utilizada para trasplante.

En nuestro laboratorio, hemos realizado estudios de caracterización de PH de una unidad típica de SCU, con el fin de evaluar su potencial hemopoyético. En la tabla 3.2, se muestran los resultados de la cuantía de PH por unidad de volumen, comparándolos con diferentes fuentes alternativas de PH.

Como se puede comprobar ante el análisis de los presentes resultados, el tejido utilizado como inóculo hemopoyético con mayor riqueza en progenitores es la MO. En cierta manera, la SCU se comporta como una SPM de forma fisiológica. La concentración de progenitores circulantes encontrada en la SCU y en la SPM de un donante sano tras administración de G-CSF es similar. Obviamente, el potencial de obtención de material de cada producto marca la diferencia. Mientras que la SCU es un producto limitado, con un volumen de alrededor de 80 mL, la SPM puede obtenerse procesando usualmente hasta 15 litros de sangre. Dado que el rendimiento de las máquinas de aféresis suele estar alrededor del 50% (datos propios no publicados), la capacidad volumétrica de la SPM como tejido hemopoyético es casi 100 veces mayor que la SCU.

Para que la SCU pueda ser una alternativa para el trasplante, debe suplir esta carencia relativa en progenitores mediante propiedades biológicas que le confieran una gran calidad hemopoyética. Así, en la tabla 3.3 se muestra el fenotipo de las células CD34+ según tejido y se puede apreciar una expresión diferente de marcadores de inmadurez. Esta diferencia en el contenido relativo de células inmaduras también se ha podido demostrar en pruebas funcionales, como el ensayo CAFC de 5 semanas sobre estroma humano alogénico irradiado (Figura 3.1). Este experimento está realizado con la cuantificación a dilución límite de área de empedrado de más de 5 células, de

Tabla 3.2.

a) Contenido comparado de las células CD34+ y de las colonias de estirpe mieloeritroide en diferentes tejidos hemopoyéticos

| N=20 | MO | SPM | SCU | SPA |
|----------------------|-------------|-------------|------------|------------|
| %CD34 | 1.28±0.55 | 0.19±0.10 | 0.30±0.21 | 0.02±0.02 |
| CN/μl | 29600±12000 | 43500±21000 | 16300±6200 | 7000±3000 |
| CD34/μl | 378±162 | 82±43 | 49±32 | 1.4±1.4 |
| CFU-GM/μl | 39±23 | 18±10 | 16±11 | 0.2±0.1 |
| BFU-E/μl | 29±17 | 11±9 | 5±4 | 0.2±0.1 |
| CFU-Mix/μl | 9±8 | 5±5 | 6±4 | 0.1±0.1 |
| CLONE-CFU (%) | 20±6 | 41±14 | 55±22 | 36±30 |

b) Contenido comparado de colonias de estirpe megacariocítica según fuente de progenitores

| N=20 | MO | SPM | SCU |
|---------------------|-----------|------------|------------|
| CFU-Mk/μl | 15±6 | 2±2 | 2±1 |
| BFU-Mk/μl | 6±4 | 0.5±0.7 | 2±2 |
| CFU-GEMM/μl | 2±2 | 2±2 | 2±2 |
| CLONE-Mk (%) | 6±2 | 6±3 | 12±5 |

Los datos muestran el contenido absoluto de cada tipo de progenitor por μl de producto y están representados como la media y la desviación estándar de 20 muestras consecutivas analizadas de cada uno de los productos

MO= Aspirado de médula ósea de donante alogénico

SPM= Sangre periférica movilizada, obtenida por venopunción directa, de doanantes sanos tras 5 días de rhG-CSF

SCU= Sangre de cordón umbilical

SPA= Sangre periférica basal del adulto

Tabla 3.3

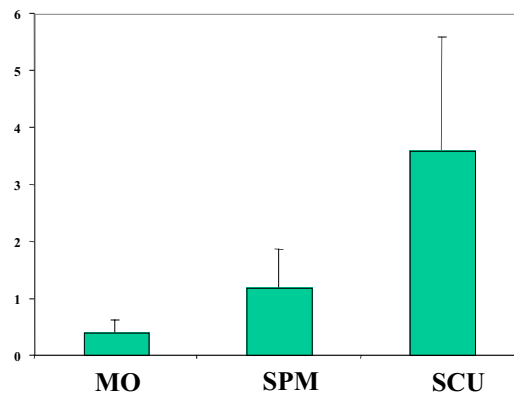
Coexpresión de antígenos de inmadurez entre células CD34+ de distintas fuentes de progenitores

| Subpoblaciones CD34+ | MO | SPM | SCU |
|---------------------------------|-----------|------------|------------|
| HLA-DR+ | 98±1 | 97±1 | 91±7 |
| CD38+ | 94±3 | 95±3 | 81±12 |
| CD117+ | 57±13 | 37±25 | 77±8 |
| CD33+ | 57±12 | 42±28 | 84±8 |
| CD90+ | 18±12 | 52±35 | 30±12 |

Coexpresión de diferentes antígenos de diferenciación de células CD34+ obtenidas mediante inmunoselección magnética. Los resultados muestran la media y desviación estándar de 10 muestras consecutivas de cada tejido.

Figura 3.1.

Comparación del contenido de CAFC de 5 semanas entre células CD34+ seleccionadas entre diferentes fuentes de progenitores (MO, SPM y SCU)



Porcentaje de células CAFC de 5 semanas entre las células CD34+ según fuentes de progenitores. Los cálculos se han realizado tras cuantificar el contenido de CAFC, por dilución límite, tras la siembra de células CD34+ seleccionadas por un método inmunomagnético de MO, SPM y SCU procedente de individuos sanos. El ensayo CAFC se ha realizado sembrando las células problemas sobre estroma humano preformado, irradiado a 15 Gy.

contraste de fase oscuro. Este tipo celular se ha correlacionado con la capacidad de prendimiento a largo término de los injertos hemopoyéticos, y se considera un candidato a CMH *in vitro* (40, 41). En la figura 3.1, se muestra el porcentaje de células CAFC de 5 semanas presentes entre células CD34+ seleccionadas de MO, SPM y SCU.

Teniendo en cuenta estas diferencias en cuanto a la calidad de las células, la riqueza hemopoyética de un inóculo, puede compensarse en función de la capacidad de obtención que se tenga en cada uno de ellos. En la tabla 3.4, se comparan estas 3 fuentes de progenitores en función de esta aproximación.

Los resultados muestran el volumen requerido de SPM y SCU necesario para obtener la misma cantidad absoluta de cada progenitor, que el disponible en un aspirado de MO. Se ha utilizado la media del volumen normalmente obtenido en una colección típica de cada tejido. El volumen de SPM se ha calculado dividiendo la volemia de SPM procesada por una máquina de aféresis (una media de 15 litros por sesión), por el rendimiento de la misma para recuperar las células hemopoyéticas (alrededor del 50%). Nótese que tanto la MO como la SPM, podrían, en su caso, repetir nuevas extracciones en días diferidos, si fuera necesario. Esta posibilidad está excluida en el caso de la SCU.

A pesar de la compensación cuantitativa que se produce al comparar CFU ó CAFC de 5 semanas, la diferencia entre los progenitores obtenidos en una colecta de SCU y en colectas de SPM ó MO, continua siendo importante. Oscila, por ejemplo, entre 10 veces más CAFC de 5 semanas y 77 veces más CD34+ en un harvest de MO, comparado con uno de SCU. Las diferencias son mayores si lo comparamos con SPM. Es por ello, que probablemente, existan factores adicionales, como la capacidad proliferativa de las CMH (no hay que olvidar que tras el injerto se deben expandir *in*

Tabla 3.4.

Comparación del contenido global de diferentes PH en los tejidos hemopoyéticos enunciados, en base a su contenido por unidad de volumen.

| | MO | SPM | SCU |
|-----------------------|-----------|------------|------------|
| CD34 | 1 | 4.5 | 7.7 |
| CFU-GM | 1 | 2.2 | 2.4 |
| CFU-Mix | 1 | 2.3 | 2.9 |
| CFU-Mk | 1 | 5.3 | 3.8 |
| CAFC 5 semanas | 1 | 2.4 | 1.1 |
| CD34+38- | 1 | 5.7 | 2.0 |
| Volumen (mL) | 1232 (1) | 7500* (6) | 89 (0.1) |

Los valores indicados se corresponden al volumen necesario de cada una de las fuentes de progenitores para igualar el contenido absoluto de los distintos PH presentados, en una unidad de volumen de un aspirado de MO, en un donante sano.

La fila *volumen* indica el volumen medio en mL, obtenido en la colecta de cada una de las fuentes de PH presentadas. Entre paréntesis se señala el factor de multiplicación respecto a un *harvest* de MO convencional.

(* Se ha tomado como volumen en SPM, la aféresis realizada a 15 litros de volumen, considerando una eficiencia de captura de PH del 50%, con un nivel mantenido de PH movilizados).

vivo de forma importante para poder regenerar la mayor parte de los nichos hemopoyéticos vacíos). Esta capacidad proliferativa, también conocida como capacidad de expansión, se ha demostrado muy superior en los progenitores procedentes de SCU respecto a los de otras fuentes de progenitores (42-46).

3.2.7.2. ANALISIS DE LAS CELULAS CD34+ DE SCU

Como se ha demostrado en otras publicaciones, la capacidad de repoblación a corto y largo plazo, reside en un subgrupo de células de aspecto linfoide, que expresan el antígeno CD34 en su membrana (47-49). Aunque algunos autores han publicado la existencia de células con capacidad stem hemopoyética que no expresan CD34 (CD34 negativas) (50-52), esta población, no reconocida previamente, adquiere la capacidad de formar colonias *in vitro*, ó después de cultivos a largo plazo, cuando inicia la expresión del antígeno CD34. Por ello, actualmente, la expresión de CD34 continúa siendo el marcador más utilizado para evaluar la calidad hemopoyética de un inóculo. A continuación, se presentan las características fenotípicas y funcionales de las células CD34+ purificadas de SCU, para utilizar su descripción como referencia de la calidad del producto tras su manipulación, y de su capacidad de formar colonias en cultivos clonogénicos y/o generar cultivos a largo plazo.

A) FENOTIPO

Diferentes estudios clínicos, han demostrado correlación entre el número de células CD34+ infundidas y la probabilidad del prendimiento (37, 39, 47, 49). No todas las células que se enumeran como CD34+ tienen la misma capacidad de repoblación,

habiéndose relacionado diferentes subpoblaciones con la capacidad de prendimiento. El estudio de las subpoblaciones de CD34 es útil para el seguimiento de la calidad de un inóculo de SCU y del producto resultante de su manipulación *ex vivo*. Así, la población CD34+/CD33- ha sido identificada como un factor predictivo independiente de la recuperación de granulocitos y plaquetas (53). Por otro lado, la coexpresión de CD34 y AC133 también determina un *subset* celular altamente enriquecido en LTC-IC y SRC (54). Otros autores, han descrito una correlación significativa entre dosis de células CD34+/CD38- infundidas, utilizando SPM y cinética de injerto trilineal. Según este artículo, el umbral de dosis mínimo calculado es de 5×10^4 CD34+CD38-/kg (55). También se ha relacionado expresión de ciertas moléculas de adhesión y probabilidad de injerto. Destacan los trabajos que relacionan la expresión de L-selectina y el injerto mieloide (56), y en el modelo animal (NOD-SCID), la expresión de CXCR4, ligando de la quemoquina SDF-1-alfa, con el injerto de CMH humanas (57).

Todos ellos son útiles como control de calidad de la SCU. Se presenta a continuación una tabla (Tabla 3.5), donde aparecen los porcentajes medios de expresión de diferentes marcadores de membrana, medidos sobre una población CD34+ de SCU, obtenida tras selección celular inmunomagnética (artículo en preparación). Analizando los marcadores primitivos, cabe destacar una mayor frecuencia de células CD34/CD38- en SCU comparadas con las presentes en MO ó SPM. Esto, como se ha apuntado anteriormente, puede explicar la capacidad de prendimiento de la SCU a pesar del menor número de células CD34+ recolectadas (58).

En general, las moléculas de adhesión están altamente expresadas en SCU. Cuando se analizan compartimentos primitivos (como CD34+/CD38-) la coexpresión de moléculas de adhesión está aumentada con respecto a MO. La exposición *in vitro* a

Tabla 3.5.

Coexpresión de diferentes marcadores sobre una población CD34+ seleccionada procedente de SCU. Se han analizado “en fresco” y tras descongelación

| | Fresco | Descongelado |
|---------------|---------------|---------------------|
| CD38 | 88% (83-97) | 84% (55-97) |
| HLA-DR | 95% (92-97) | 96% (88-99) |
| Ac133 | 86% (80-98) | 84% (60-88) |
| CXCR4 | 77% (19-96) | 78% (36-98) |
| Leu-8 | 31% (14-73) | 4% (2-42) |
| Vla-4 | 92% (56-97) | 85% (41-99) |
| Vla-5 | 9% (3-31) | 18% (2-38) |
| CD33 | 84% (44-94) | nd |
| CD90 | 30% (12-56) | nd |

Resultados expresados como mediana y rango de 10 determinaciones realizadas a células CD34+ obtenidas tras selección celular por un método inmunomagnético. La tabla muestra el porcentaje de coexpresión de los antígenos de membrana señalados, en las mismas células determinadas en fresco, o tras su descongelación.

(nd: antígenos no determinados)

diferentes citoquinas provoca un incremento en la expresión de moléculas de adhesión (59, 60).

Otros estudios, aportan datos de interés sobre las características funcionales de las subpoblaciones de células CD34+. Por un lado, la SCU presenta una mayor cantidad de células CD34+/CD38- en S+G₂M que la MO (61-63). Sin embargo, tras 48 horas de incubación con citoquinas (SCF+IL3), la SCU presenta una mayor proporción de estas células en ciclo, indicando una mayor respuesta proliferativa que las células de MO. La SPM se comporta en parecidos términos a la SCU en este sentido (64).

B) UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (CFUs):

Los aspectos cualitativos de los PH de SCU pueden tener más importancia que su contenido absoluto. En los estudios iniciales (25), se demostró un aumento en la capacidad de resembrado de las colonias CFU-GEMM, mediada por la presencia de SCF, que lo justificaban como un indicador potencial de autorrenovación. Esta citoquina también aumenta el potencial de resembrado de las CFU-GEMM de la MO del adulto, pero mientras que en este contexto las colonias secundarias son en su mayoría CFU-GM, en el caso de la SCU se obtienen de nuevo colonias de todas las líneas hemopoyéticas. Incluso, el resembrado de colonias BFU-E consigue colonias secundarias CFU-GEMM. Esto sugería la posibilidad de que la SCU contuviera mayor número de *subsets* celulares más inmaduros que los encontrados habitualmente en la MO. Esto se ha visto corroborado por estudios posteriores (65-71).

En nuestro centro se ha realizado una serie de estudios de caracterización del contenido de CFUs en SCU. La tabla 3.6 resume estos datos. Como se puede

Tabla 3.6.

Contenido de unidades formadoras de colonias (CFU) en SCU total ó tras selección positiva de células CD34+ por un método inmunomagnético

| MEDIANA DE COLONIAS/10⁵ CN | %CD34 | CFU-GM | BFU-E | CFU-Mix | CFU-Mk | BFU-Mk | CFU-GEMM |
|--|--------------|---------------|--------------|----------------|---------------|---------------|-----------------|
| SCU SANGRE TOTAL | <i>0.39</i> | 82 | 13 | 43 | 53 | 19 | 7 |
| SCU SELECCIÓN POSITIVA | <i>86</i> | 17200 | 2580 | 6020 | 2890 | 3070 | 660 |

Los resultados expresan la media de CFU resultados de la determinación de 20 muestras de SCU como sangre total, y de 9 muestras de SCU obtenidas tras selección celular mediante un método inmunomagnético.

comprobar, la CLONE de las células CD34+ de SCU es del 56%±12. La distribución de colonias es de 37% CFU-GM, 6% BFU-E, 20% CFU-Mix, 24% CFU-Mk, 9% BFU-Mk, y 3% CFU-GEMM. Al realizar la selección celular, se produce un enriquecimiento de las células más inmaduras, que no son clonogénicas, lo que conlleva a una menor CLONE (32%). Otros factores que pueden influir, son la desaparición de las células accesorias, ó un cierto efecto tóxico sobre el *pool* mas proliferativo tras someterlo a manipulación.

C) ENSAYOS *IN VITRO* A LARGO PLAZO: CELULAS FORMADORAS DE AREAS DE EMPEDRADO DE 5ª SEMANA Y CELULAS INICIADORAS DE CULTIVO A LARGO PLAZO:

Para evaluar la calidad hemopoyética de un inóculo es necesario definir ensayos que midan el contenido y la calidad de CMH responsables del injerto permanente. Para ello, son de especial utilidad los ensayos *in vitro* que permitan medir el contenido de células del *pool* stem en el inóculo. En este sentido, Breems y cols (41) publicaron el ensayo CAFC de células humanas, para cuantificar la frecuencia de células con capacidad de repoblación a largo plazo presentes en un determinado inóculo. Se han publicado estudios que demuestran que en pacientes sometidos a trasplante autólogo, el nº de CAFC de 6 semanas inoculadas predecían la probabilidad de sufrir un fallo de injerto, a pesar de que el contenido de progenitores (CFUs) estaba dentro de los límites de la normalidad (72).

En nuestro laboratorio hemos realizado la puesta punto de la técnica de cuantificación de CAFC de 5 semanas utilizando la estrategia de dilución límite. Esta técnica nos ha permitido comparar las células CD34+ procedentes de MO, SPM y SCU. Según estos resultados, la frecuencia relativa de CAFC de 5 semanas entre células CD34+ es

mayor en SCU con respecto a las demás fuentes, corroborando la diferencia funcional de los diferentes progenitores según fuente y origen ontogénico. En SCU, un 5% de las células CD34+ originan CAFC de 5 semanas, mientras que solamente un 0.5% de las procedentes de MO lo hicieron ($p < 0.05$). El contenido de CAFC en SPM es muy variable y se sitúa entorno al 1% (ver figura 3.1.).

3.2.7.3. ESTUDIOS *IN VIVO* SOBRE EL POTENCIAL DE INJERTO DE LA SCU

Existen otros modelos de estudio de la capacidad de prendimiento *in vivo* de células hemopoyéticas humanas. El más utilizado es el trasplante de células humanas, a ratones NOD/SCID, que toleran el xenotrasplante (73). En este modelo se han definido las SRC (SCID repopulating cells), que muestran la capacidad de repoblar la MO y SP y otros órganos hemopoyéticos (bazo, hígado, etc) de células sanguíneas humanas inmaduras y diferenciadas. Siguiendo los resultados de las frecuencias de SRC de diferentes tejidos hemopoyéticos, podemos comprobar la mayor frecuencia de este tipo celular en la SCU respecto a otras fuentes de progenitores. De esta manera, la frecuencia de SRC, es 6 veces mayor en SCU que en SPM ($1,1/10^6$ vs $0,17/10^6$ CN)(74).

Existe otro modelo de trasplante xenogénico que permite estudiar la capacidad de repoblación a largo plazo de un inóculo ó subgrupo celular. Este se basa en la permisividad inmunológica en las primeras etapas de vida intrauterina. De esta manera, la infusión de “células problema” en fetos de oveja antes de la época de desarrollo inmunológico, permite la consecución de una quimera mixta que se

mantiene a lo largo de la vida extrauterina de la oveja. Este ensayo permite evaluar el injerto a largo plazo, con seguimientos de más de 1 año después del trasplante, por medio de marcadores de antígenos humanos (75-77). Comparando el porcentaje de quimera humana respecto a la ovina, se puede inferir la capacidad stem de un producto, aunque presentan limitaciones para cuantificar las células. Este modelo ha servido también para estudiar la capacidad de prendimiento de la SCU, que se ha mostrado superior a otras fuentes (78, 79).

Según los resultados presentados, se puede concluir que la capacidad hemopoyética de la SCU no puede ser medida con parámetros clásicos como el contenido de células CD34+ ó de CFUs. Aunque estos marcadores pueden ser útiles para el screening de calidad del producto, se deberían definir nuevos umbrales de aceptabilidad en función de otros parámetros, que correlacionen mejor con su capacidad de injerto. Los resultados clínicos son, hoy en día, imprescindibles para evaluar la capacidad de injerto de la SCU en un individuo y, en concreto, definir los parámetros útiles para su predicción.

3.2.8. POTENCIAL HEMOPOYETICO COMPARADO DE MEDULA OSEA, SANGRE PERIFERICA MOVILIZADA Y SANGRE DE CORDON UMBILICAL EN CLINICA

El número de progenitores contenidos en una unidad de SCU se sitúa en el margen inferior de los contenidos normalmente en MO. Aunque las CFU-GM no son CMH, en algunos trabajos se ha podido correlacionar la rapidez en el prendimiento y la supervivencia, con la cantidad de CFU-GM administradas. En trasplantes murinos (80) y en trasplantes autólogos de MO en humanos (81) se ha podido documentar

dicha relación. Algunos autores (82, 83) han propuesto un umbral mínimo de 2×10^4 CFU-GM/kg para asegurar un injerto alogénico. La media de CFU-GM por mL en SCU se sitúa alrededor de 5×10^3 (aunque presenta márgenes muy amplios), lo que supone aproximadamente 3 mL por kg de peso del receptor para cumplir con este umbral. Teniendo en cuenta que la recogida promedio es de 90 mL, el dintel de seguridad en el trasplante de SCU (valorando promedios) se sitúa alrededor de los 30 kg de peso del receptor. Para adultos, se necesitan condiciones especiales, así como donantes de mayor volumen. Estos simples cálculos no tienen en cuenta otros factores, como el potencial relativo de las células más inmaduras (CAFC ó SRC en SCU respecto a MO) ó la capacidad proliferativa *in vivo* de cada célula que consiga injertar. En la tabla 3.7, se muestran los resultados comparados de MO y SCU analizando globalmente estas diferencias. Se ha considerado en esta comparación, el umbral mínimo de dosis recomendada para MO en nuestra institución (1×10^8 CN/kg). Existe una clara diferencia en cuanto el contenido de células más diferenciadas que se tiende a compensar con el análisis de las células más primitivas. Estos datos pueden explicar la aparente igualdad entre ambas fuentes de progenitores en cuanto a probabilidad global de injerto, pero la mayor lentitud en la recuperación de las cifras hemoperiféricas, que conlleva un mayor riesgo de morbilidad peritrasplante utilizando SCU. En esta tabla, se introduce, como corrigiendo las diferencias por la capacidad proliferativa de ambos tejidos, la diferencia desciende de forma substancial (90% tras 14 días de cultivo).

Tabla 3.7.

Comparación entre la dosis de células y progenitores empleados en un trasplante de MO alogénico, con dosis mínimas, y la dosis media de una unidad de SCU considerando un receptor de 60 kg

| | MO[^] | SCU | Diferencia |
|---------------------------------------|-----------------------|------------|-------------------|
| CN/kg (10⁷) | 10 | 2,5 | X 4 |
| CD34/kg (10⁴) | 50 | 7,5 | X 6,7 |
| CFU-GM/kg (10⁴) | 5 | 1 | X 5 |
| CFU-Mix/kg (10³) | 4 | 1 | X 4 |
| CAFC 5 sem/kg (10³) | 2,5 | 1,5 | X 1,7 |
| Potencial de expansión* | 250 | 2500 | X 0,1 |

*Tras 14 días de cultivo suplementado con 50 Ng/mL de SCF, IL3, IL6, FLT3-L

[^]Los datos de MO se corresponden a injertos con la dosis umbral mínima considerada en nuestro centro

Diferencia: Factor diferencial entre la dosis infundida en un trasplante de MO a dosis umbral y la de un trasplante de SCU utilizando una unidad de contenido medio.

3.2.9. RESULTADOS CLINICOS PRELIMINARES DEL TRASPLANTE DE SCU

En 1989 Broxmeyer y cols (27) publicaron que la SCU es una fuente rica de PH y CMH. Según los datos de ese estudio infirieron que la SCU contenida en una colección única debería contener suficiente contenido de CMH y PH como para reconstituir la función medular en el contexto de un trasplante hemopoyético. Esta posibilidad fue verificada por el éxito obtenido en el trasplante de un paciente afecto de anemia de Fanconi con SCU procedente de su hermano HLA-idéntico (84). La cuestión era, si una colección única de SCU, contenía suficiente material biológico para injertar el sistema hemopoyético de un adulto. En 1992, el mismo grupo publicó un artículo donde comparaban el contenido numérico de los progenitores mieloides de la SCU con los utilizados habitualmente en un trasplante autólogo de MO (25). En el artículo, se enfatizaba, que el contenido de CFUs en una unidad de SCU era del 45-91% en CFU-GM, 29% en BFU-E y 24% en CFU-GEMM, del contenido en un trasplante de MO, que confirmaba el déficit cuantitativo de progenitores. De todas maneras, en numerosos países se iniciaron los programas de recogida de SCU, y también en nuestra institución, pionera en España. La evidencia de que existía un considerable solapamiento entre el contenido de progenitores (CFU-GM) infundido como rango mínimo en TMO y el que presentaba la SCU, llevó a entender que la probabilidad de injerto se mantendría. Tal vez, los trasplantes de MO y SPM se habían realizado habitualmente en condiciones de “saturación” de progenitores, y era posible el injerto con dosis mucho inferiores. Esto ha sido ratificado con las primeras experiencias clínicas obtenidas con los trasplantes de SCU.

El análisis efectuado por Rubinstein y cols después del seguimiento de 562 trasplantes (2), mostraba una tasa de injerto de neutrófilos a día 42 del 81% (tiempo mediano de injerto 28 días) y del 85% a día 180 para plaquetas (mediana, día 90). La velocidad del prendimiento mieloide se asoció primariamente con el contenido en leucocitos en la SCU infundida, mientras que los eventos relacionados con el trasplante se asociaron con la enfermedad de base, el número de leucocitos en el inóculo, el grado de disparidad HLA, y el centro en donde se efectuó el trasplante. Después del injerto, la edad, la disparidad HLA, y el centro fueron los principales valores que influyeron en el seguimiento. La EICH severa (grado III-IV) se presentó en 23% de los pacientes, y la incidencia de la EICH crónica en un 25%, a pesar de existir una incompatibilidad HLA en más del 90% de los trasplantes realizados. La tasa de recaída de los pacientes tratados por leucemia fue del 9% dentro de los primeros 100 días, 17% a los 6 meses y 26% al año. Estos resultados demostraron las posibilidades de la SCU, como fuente de PH de donante no emparentado.

Recientemente, se ha conducido un estudio donde se ha podido demostrar (al comparar SCU y MO de donante emparentado) que la tasa de EICH agudo (riesgo relativo 0,41) y crónico (riesgo relativo 0,35) en SCU es menor que en MO (3). Sin embargo, esta menor incidencia de la EICH, se ve enmascarada por la menor rapidez en el injerto. A los 30 días, la probabilidad de injerto de neutrófilos y de plaquetas fue de 0,40 y 0,20, para SCU, respectivamente. En el seguimiento de las series, la supervivencia no fue diferente (riesgo relativo 1,15, $p=0,43$). Un hallazgo interesante en este trabajo, es la observación de la misma tasa de recaída en una fuente de progenitores respecto a la otra. Otro factor importante en el éxito del trasplante, es la fecha del mismo, obteniéndose mejores resultados en los trasplantes realizados a partir del año 1998 que en los anteriores. Esta curva de aprendizaje permite pensar

que eligiendo mejor al receptor, y encontrando con mayor facilidad unidades de buena celularidad con compatibilidad HLA aceptable, los resultados de SCU pueden ser mejores que los de MO, al menos en edad pediátrica.

A la vista de estos resultados, se puede plantear una mejora de los resultados incidiendo en el injerto a corto plazo. La dosis límite de progenitores trae consigo una mayor tasa de complicaciones en el periodo peritrasplante, fundamentalmente debidas a un retraso en el prendimiento mieloide precoz, es aquí donde se necesita el desarrollo biotecnológico que apoye los resultados de la SCU. En el trabajo inicial, Broxmeyer y cols muestran la capacidad de expansión *in vitro* de los PH en respuesta a la adición de citoquinas proliferadoras (25). Esta idea, abre la puerta al desarrollo de la tecnología de expansión de progenitores y generación de células funcionales con capacidad de recuperación medular a largo plazo, que permita obtener un producto que complemente al trasplante convencional, que ya ha demostrado su eficacia y factibilidad.

3.3. EXPANSION DE CELULAS HEMATOPOYETICAS

La terapia celular es una disciplina que pretende ofrecer un tratamiento utilizando como fuente del mismo a las células y sus interacciones. El trasplante de CMH constituye un ejemplo de ello. La discriminación de los diferentes subgrupos celulares ha llevado al diseño de modelos terapéuticos basados en sus funciones específicas.

Entre los métodos de terapia celular, más comúnmente empleados en la actualidad, cabe señalar la selección celular como método de *purging* ó de inmunomodulación, la expansión/estimulación *ex vivo* de CMH, progenitoras ó maduras, la generación de tejidos a partir de células madre mesenquimales, y la terapia génica (85, 86).

La expansión, en si misma, pretende aumentar ó generar un subtipo celular, necesario para un propósito terapéutico, mediante la utilización de técnicas de cultivo celular. En esta Tesis, se hace hincapié en la expansión *ex vivo* para la generación de células repobladoras a corto término, utilizando la SCU como fuente.

Los progresos en los estudios básicos sobre hemopoyesis, han permitido el desarrollo de la tecnología de la expansión *ex vivo*, por cuanto promueven: 1) el conocimiento de los factores que intervienen en la regulación del mismo, 2) la clonación y síntesis de forma recombinante de las proteínas que ejercen efectos en el sistema hematopoyético, y 3) la definición de nuevos modelos biológicos que permiten diseñar estrategias de cultivo *ex vivo* encaminadas a la expansión de los diferentes linajes celulares.

A continuación, se repasan estos aspectos, sobre los que se asienta el desarrollo tecnológico de la expansión. Para ello, se describirá el sistema hemopoyético, repasando los aspectos fundamentales de la anatomía y fisiología de la hemopoyesis, y se discutirán los mecanismos reguladores del sistema como son los FCH, y sus

receptores, cruciales en el diseño de los cultivos *in vitro*. Con estos datos, se discutirán las evidencias científicas sobre el comportamiento de las CMH en estos cultivos, y se revisarán los principales trabajos de expansión a partir de SCU. Finalmente, se abordarán los cultivos de expansión desde un punto de vista biotecnológico, definiendo las características y variables, que deben tenerse en cuenta para su utilización clínica.

3.3.1. EL SISTEMA HEMOPOYETICO

La hematopoyesis es el proceso responsable de mantener estable el *pool* de CMH repobladoras a largo plazo, y generar todas las células maduras efectoras. La producción diaria en un adulto normal de alrededor de 10^{12} células, siendo regulada por una compleja interacción entre factores solubles y ligados a membrana, factores inhibidores y sus correspondientes receptores (87). El clonaje molecular de estos factores de crecimiento y sus receptores ha sido un instrumento que ha ayudado a delinear las vías que llevan a la formación, a partir de una sola CMH, de diferentes tipos de células maduras.

3.3.1.1. LAS CELULAS HEMOPOYETICAS

Desde un punto de vista funcional, se pueden agrupar las células hemopoyéticas en distintos compartimentos. En general, podemos distinguir tres: el compartimento de células madre, el compartimento de células progenitoras, y finalmente el compartimento de células precursoras y maduras. Las células a lo largo de su diferenciación van progresando a través de los compartimentos, perdiendo

paulatinamente capacidad proliferativa, y ganando aspectos morfológicos distintivos de las diferentes células maduras.

A) CELULAS MADRE:

La evidencia de la existencia de CMH nació con los estudios de Jacobson y cols (88) que consiguen repoblar la función medular de ratones irradiados con extractos de bazo, previamente extraídos. Posteriormente, Till y McCulloch (89) acuñan el concepto de CFU-S, como las colonias esplénicas que aparecen tras la infusión medular en un trasplante murino. Las CFU-S de día 12 contienen células que son capaces de repoblar un receptor secundario. Estas células son en su mayoría quiescentes, por cuanto resisten la incubación de 3 horas con hidroxurea ó ³H-timidina (90).

Las células del compartimento stem son heterogéneas y comprenden células con capacidad variable de autorrenovación, y diferenciación multilineal. Las células progresan en una dirección única en este esquema. Solo las células más primitivas, tienen capacidad de repoblación medular a largo plazo, y en ensayos *in vitro*, se pueden identificar cómo células formadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC) (91) ó de áreas de empedrado tras más de 5 semanas de cultivo (CAFC) (41).

También, fenotípicamente se han definido distintos marcadores, como la expresión de CD34, AC133 y la ausencia de marcadores de activación como CD38, HLA-DR, CD71 y de linaje(92-95). Otros ensayos, como modelos xenogénicos de trasplante para células humanas (SRC) ó trasplantes competitivos en ratón sirven para evaluar la capacidad de repoblación a largo término de subfracciones celulares, que no representan necesariamente al conjunto del *pool* stem funcional (73, 76, 96).

B) CELULAS PROGENITORAS:

La CMH se diferencia hacia progenitores primitivos de línea mieloide ó linfoide. El progenitor mieloide multilineal puede diferenciarse progresivamente hacia células de distinto linaje, y se ha asimilado a CFU inmaduras obtenidas en diferentes ensayos como CFU-Blast, HPP-CFC ó CFU-GEMM (65, 97-100). Atendiendo a ese linaje, se han descrito diversas CFU. La célula más primitiva exclusiva de linaje eritroide es la BFU-E, que se obtiene en cultivo en respuesta al efecto de citoquinas como SCF, IL3 y EPO (101, 102). Cuando esta célula se continua diferenciando, origina colonias únicas, más pequeñas llamadas CFU-E. Mientras las BFU-E necesitan periodos de maduración de semanas, las CFU-E aparecen, tras incubación con EPO, en 7 días. En cultivos semisólidos, también se distingue la célula progenitora de la línea granulocítica y mieloide (CFU-GM). Esta célula tarda entre 12 y 14 días en madurar. Dentro de la línea de maduración gránulo-monocítica, se pueden distinguir colonias de solo un linaje (CFU-G y CFU-M) en cultivos más cortos (103, 104).

De forma similar al linaje eritroide, la línea megacariocítica posee un progenitor inmaduro, capaz de dar varios clones contiguos de megacariocitos maduros y plaquetas (BFU-Mk). En un medio de cultivo adecuado, como aquel que presente plasma de individuos aplásicos, ó en la actualidad TPO, esta célula se diferencia a células con menor capacidad de proliferación (CFU-Mk), normalmente agrupaciones de megacariocitos de menos de 50 células (105).

Todas estas células, definidas por su capacidad clonogénica, poseen una gran capacidad de proliferación y acaban formando células maduras en el cultivo en número variable. Fenotípicamente, se las considera CD34+CD33+, y dependiendo de la línea expresan marcadores de linaje característicos (CD71 para línea eritroide, CD13 para gránulo-monocítico, CD14 para monocito, CD15 para granulocito y CD61

ó CD41a para megacariocito) (106-108). Se les ha relacionado con la recuperación medular a corto plazo tanto en cuanto su periodo de maduración oscila entre 7 y 14 días. Este grupo celular agota su potencial al madurar, y no sirven para soportar la hemopoyesis a medio ó largo plazo. Es lógico pensar, que el inóculo hemopoyético ideal en un trasplante debe contar con un número suficiente de células de ambos compartimentos, tanto stem como progenitor multilineal.

C) PRECURSORES Y CELULAS MADURAS:

Mientras que las células pertenecientes a los compartimentos anteriores no son reconocibles por técnicas de citología convencional, y necesitan ensayos funcionales para su definición, los precursores son células ya reconocidas por técnicas morfológicas.

Los diferentes linajes cuentan como precursores a los proeritroblastos, mieloblastos, monoblastos, y megacarioblastos. Cada linaje hemopoyético mieloide tiene un patrón de diferenciación propio y específico, con células reconocidas en los aspirados de MO normales. Algunos precursores mantienen capacidad mitótica, aunque muy limitada, y forman los llamados clusters en los cultivos celulares, que son agrupaciones de menos de 50 células. Durante los días de su maduración terminal, residen normalmente en la MO. Finalmente, cuando las células ya han madurado inician su migración a través del endotelio medular hacia la SP, donde son distribuidas por todo el organismo.

3.3.1.2. LOS FACTORES DE CRECIMIENTO HEMOPOYETICOS

Los FCH fueron inicialmente descritos por Bradley y Metcalf (104), y Pluznik y Sachs (103) como factores solubles, que presentes en medios clonogénicos inducían la

producción de colonias. Durante la década de los 70 y 80, fueron descubiertas las especificidades de numerosos de estos factores solubles, basados en sus propiedades de promover diferentes tipos de colonias. Posteriormente, con la clonación de la molécula y la identificación de sus ligandos en la membrana celular se ha podido estudiar con mayor profundidad el mecanismo de acción sobre la célula.

A continuación describiremos funcionalmente a las citoquinas más ampliamente utilizadas en los cultivos de expansión.

Los FCH se pueden clasificar según su función en:

- Factores linaje específico, como G-CSF, M-CSF, EPO, TPO e IL5

Usando la técnica de cultivos clonogénicos se demostró que G-CSF promovía la generación de colonias CFU-G tras 1 semana de cultivo, indicando un efecto en la maduración terminal y el crecimiento de los granulocitos (109). De forma parecida, se ha demostrado el efecto trófico de M-CSF sobre los monocitos (110), ó de IL5 sobre los eosinófilos (111). EPO es necesaria para la maduración terminal de la serie roja (102) y TPO promueve el crecimiento y maduración de las CFU-Mk y la subsecuente producción de plaquetas (42). Estas moléculas han sido involucradas en otro tipo de regulación como maduración endotelial (G-CSF), activación de células B (IL5), activación recíproca de la serie roja y plaquetar (TPO y EPO), ó el desarrollo del trofoblasto (M-CSF) (112, 113). Dado el solapamiento de funciones entre diversas citoquinas, algunas de estas moléculas se han relacionado con capacidad de promover la mitosis de CMH, como G-CSF, M-CSF ó TPO (114, 115).

- Factores multilineales: IL3 y GM-CSF.

Utilizando también cultivos clonogénicos, se vio que la presencia de GM-CSF promovía la aparición de diferentes tipos celulares como CFU-G, CFU-M, CFU-Eo y

CFU-GM (116). También se estudió el efecto trófico de CFU-GM en presencia de EPO para la diferenciación de células de linaje eritroide, como BFU-E, ó megacariocítico (BFU-Mk)(117). IL3 tiene un espectro mayor, que incluye a las CFU-GEMM y tiene mayor capacidad proliferativa que la anterior (118). Sin embargo, carece de efecto en la diferenciación terminal de los elementos de la serie. A diferencia de GM-CSF, IL3 también promueve la proliferación y diferenciación de células como mastocitos y basófilos (119). GM-CSF, en cambio, conjuntamente con TNF produce *in vitro* células dendríticas (120).

- Factores específicos de CMH: SCF y FLT3-L

SCF, también llamado Kit ligand ó Steel factor, juega un papel esencial para promover la expansión *in vitro*, en conjunción con otras citoquinas. Promueve la supervivencia de las células madre y las induce a entrar en ciclo celular (121). Los ratones con defecto en el gen productor (ratón steel) padecen severos defectos de la hemopoyesis fundamentalmente a nivel primitivo, con anemia macrocítica, deficiencias en los mastocitos, y alteraciones en otros órganos (regulación de los melanocitos y el sistema nervioso) (122). También este factor se encuentra ligado a la membrana de células efectoras. Las células que expresan SCF en su superficie son capaces de soportar mejor la hemopoyesis *in vitro* (123). Además la interacción SCF-KIT proporciona un mecanismo adicional de adhesión y homing de las células madre al estroma (124).

La presencia del receptor FLT3 ha sido circunscrita a las células CD34+. Su ligando promueve el desarrollo de pocas colonias en solitario, pero como SCF, actúa sinérgicamente aumentando la proliferación inducida por IL3, GM-CSF y otras citoquinas de acción tardía (125). Los ratones defectivos del gen del FLT3-L tienen

aparentemente una hemopoyesis normal, aunque tienen la diferenciación a célula B comprometida (126). Sin embargo, la disrupción de ambos receptores KIT y FLT3 origina ratones con un mayor grado de afectación hemopoyética que los defectos individuales, sugiriendo un grado de compensación de ambas vías (126). El papel de FLT3-L en el mantenimiento de la supervivencia de las células madre en cultivo ya ha sido demostrado, y su utilización en los cultivos de expansión ha supuesto aumentar las tasas de proliferación (127).

- Factores sinérgicos ó facilitadores: IL1, IL6 e IL11.

La descripción clásica de una citoquina de este grupo es la hemopoyetina-1, después rebautizada como IL1. Son citoquinas con pocos efectos, en solitario, sobre el mantenimiento de la supervivencia de las células madre ó el desarrollo de colonias *in vitro*, pero su presencia junto con otras citoquinas, produce una amplificación de la respuesta proliferativa celular. Un numeroso grupo de citoquinas han surgido, atribuyéndose efectos similares como IL6, IL11, LIF, IL12 y otras. Curiosamente, un grupo de ellas, IL6, LIF e IL11 actúan a través del componente gp130 del receptor de la IL6 (128). Esto supone un grado de solapamiento de funciones entre diferentes citoquinas, que hace que no sean determinantes, ni exclusivas en sus efectos. En numerosos estudios se ha implicado el efecto sinérgico de estas citoquinas, y se han mostrado necesarias en los ensayos de optimización de cultivos de expansión (129).