

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA

**Células madre hematopoyéticas: función,  
regulación y aplicaciones clínicas actuales**

Proyecto de Graduación presentado a la Facultad de Microbiología como  
requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Microbiología y  
Química Clínica y grado profesional de Doctorado en Microbiología y  
Química Clínica

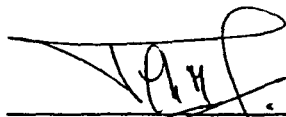
Mónica Zamora Cruz

CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

Julio, 2002

*Informe Final de Práctica Dirigida de Graduación presentado a la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el Título de Licenciada en Microbiología y Química Clínica y grado profesional de Doctora en Microbiología y Química Clínica.*


*El Tribunal Examinador estuvo integrado por los siguientes miembros:*



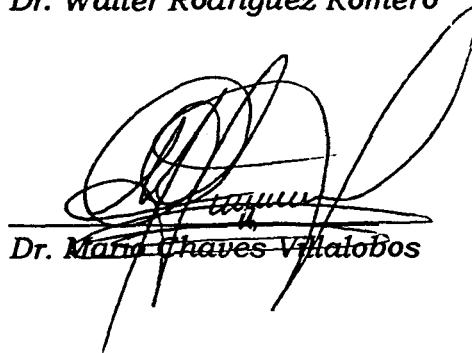
*Dr. Fernando Chaves Mora  
Presidente*



*Dr. Walter Rodriguez Romero*



*Dra. Berta Valverde Rojas*



*Dr. María Chaves Villalobos*



*Dra. Alexandra Rucavado Romero*

## **DEDICATORIA**

A Dios, por permitirme alcanzar esta meta y por todo lo que me ha regalado.

A mi esposo, Alfredo, por su amor y apoyo incondicional.

A mis hijos, Sebastián y Andrés, por ser la luz que me ilumina cada día.

A todos mis familiares y amigos por haberme ayudado durante todo este tiempo.

# ÍNDICE GENERAL

|   |           |
|---|-----------|
| DEDICATORIA.....  | iii       |
| ÍNDICE GENERAL .....  | iv        |
| RESUMEN .....   | vii       |
| OBJETIVOS.....  | 1         |
| GENERAL .....   | 1         |
| ESPECÍFICOS.....  | 1         |
| <b>1. EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO.....</b>                            | <b>2</b>  |
| <b>2. LAS CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS.....</b>                    | <b>7</b>  |
| PERSPECTIVA HISTÓRICA .....   | 7         |
| DEFINICIÓN Y CINÉTICA DE LAS CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS .....    | 8         |
| <b>3. REGULACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS.....</b>                       | <b>13</b> |
| FACTORES ESPECÍFICOS DE ACCIÓN TARDÍA.....                          | 15        |
| FACTORES INESPECÍFICOS DE ACCIÓN INTERMEDIA.....                    | 16        |
| FACTORES QUE INICIAN EL CICLO CELULAR EN PROGENITORES LATENTES..... | 17        |
| APLICACIONES CLÍNICAS DE LAS HEMOPOYETINAS .....                    | 18        |
| ERITROPOYETINA.....   | 19        |
| <i>Producción</i> .....   | 19        |
| <i>Lugar y mecanismo de acción</i> .....                            | 20        |
| <i>Efectos in vivo y aplicaciones clínicas</i> .....                | 20        |
| FACTORES ESTIMULANTES DE COLONIAS .....                             | 21        |
| <i>Producción</i> .....   | 21        |
| <i>Lugar y mecanismo de acción</i> .....                            | 22        |
| <i>Efectos in vivo y aplicaciones clínicas</i> .....                | 23        |
| M-CSF.....  | 23        |
| G-CSF .....   | 23        |
| GM-CSF .....  | 24        |
| IL-3.....   | 25        |

|   |           |
|---|-----------|
| INTERLEUQUINA 1 .....   | 25        |
| <i>Producción</i> .....   | 25        |
| <i>Lugar y mecanismo de acción</i> .....  | 26        |
| <i>Efectos in vivo y aplicaciones clínicas</i> .....  | 27        |
| INTERLEUQUINA 4.....  | 28        |
| <i>Producción</i> .....   | 28        |
| <i>Lugar y mecanismo de acción</i> .....  | 28        |
| INTERLEUQUINA 5.....  | 29        |
| INTERLEUQUINA 6.....  | 29        |
| <i>Producción</i> .....   | 29        |
| <i>Lugar y mecanismo de acción</i> .....  | 30        |
| <i>Efectos in vivo y aplicaciones clínicas</i> .....  | 30        |
| INTERLEUQUINA 11.....   | 30        |
| KIT-LIGAND O STEM CELL FACTOR .....   | 31        |
| <i>Producción</i> .....   | 31        |
| <i>Lugar y mecanismo de acción</i> .....  | 31        |
| <i>Efectos in vivo y aplicaciones clínicas</i> .....  | 32        |
| FACTORES INHIBIDORES.....   | 34        |
| <i>Lactoferrina</i> .....   | 34        |
| <i>Péptido hemoregulador</i> .....  | 34        |
| <i>Prostaglandina E</i> .....   | 34        |
| <i>Factor de crecimiento y transformación <math>\beta</math> (TGF <math>\beta</math>)</i> ..... | 34        |
| <i>Proteína inflamatoria macrófágica 1 <math>\alpha</math> (MIP1 <math>\alpha</math>)</i> ..... | 35        |
| <i>Interferón <math>\gamma</math> (IFN <math>\gamma</math>)</i> .....                           | 35        |
| <i>Factor de necrosis tumoral <math>\alpha</math> (TNF <math>\alpha</math>)</i> .....           | 35        |
| <b>4. UTILIDAD CLÍNICA DE LAS CÉLULAS MADRE: TRANSPLANTE DE CÉLULAS MADRE ..</b>                | <b>37</b> |
| FUENTES DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS .....  | 37        |
| MOVILIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE .....   | 39        |
| <i>El fenómeno de movilización</i> .....  | 40        |
| <i>Protocolos de movilización</i> .....   | 42        |
| Quimioterapia mielosupresiva.....   | 42        |
| Quimioterapia mielosupresiva + Factores de Crecimiento Hematopoyéticos.....                     | 42        |
| Factores de crecimiento.....  | 43        |
| RECOLECCIÓN DE CÉLULAS MADRE .....  | 45        |

|  |           |
|--|-----------|
| <i>Preparación del donador</i> .....                                 | 45        |
| <i>Recolección</i> .....   | 46        |
| <i>Complicaciones asociadas a la recolección</i> .....               | 47        |
| <i>Estandarización de la medición de células progenitoras</i> .....  | 48        |
| PROCESAMIENTO DE LAS CÉLULAS.....                                    | 49        |
| <i>Procesamiento de rutina</i> .....                                 | 49        |
| <i>Procesamiento extensivo</i> .....                                 | 49        |
| CRIOPRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO .....                              | 50        |
| <i>Método de DMSO y congelación programada</i> .....                 | 50        |
| <i>Método de DMSO, hidroxietil y congelación no controlada</i> ..... | 51        |
| DESCONGELACIÓN Y REINFUSIÓN .....                                    | 51        |
| UTILIZACIÓN DEL TRANSPLANTE DE CÉLULAS MADRE SANGUÍNEAS.....         | 53        |
| <i>Experiencia en Costa Rica</i> .....                               | 55        |
| <b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                           | <b>57</b> |

## RESUMEN

Zamora Cruz, Mónica.

**Célula Madre Hematopoyéticas: función, regulación y aplicaciones clínicas actuales.**

Proyecto de Graduación de Microbiología y Química Clínica. San José, CR. :

M. Zamora. C. , 2002.

59 h. : 2 il.-21 refs.

Se pretende hacer una investigación bibliográfica acerca del papel de las células madre en el mantenimiento del tejido hematopoyético y la importancia de los factores de crecimiento y otras citoquinas en la regulación de la proliferación y maduración de los progenitores hematopoyéticos. Este tema tiene una gran relevancia, ya que las células madre hematopoyéticas actualmente tienen un gran potencial como terapia para diversas enfermedades hematológicas, ya sea malignas o no.

Para ello se realizó una búsqueda de literatura científica relacionada con el tema en bases de datos bibliográficas especializadas y posteriormente se procedió al análisis de la información y elaboración de un trabajo escrito. Además, con el fin de investigar sobre la experiencia en nuestro país en cuanto a los trasplantes de células madre, se entrevistó a profesionales de los centros hospitalarios donde actualmente se utiliza esta terapia.

Esta investigación confirmó la relevancia de los factores estimulantes en la regulación de la hematopoyesis y su aplicación como terapia en la corrección de citopenias congénitas y adquiridas y en la movilización de células madre a sangre periférica. Con esta revisión se destaca la importancia del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas como única terapia con potencial curativo para pacientes con leucemia aguda y crónica, mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin y síndromes mielodisplásicos. Además, hay que destacar que en nuestro país se está realizando este tipo de trasplante desde 1998.

Palabras clave: hematopoyesis, células madre hematopoyéticas, factores de crecimiento hematopoyéticos, trasplante de células madre

Director: Dr. Walter Rodríguez Romero  
Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

# **OBJETIVOS**

## **General**

Hacer una revisión sobre la función, regulación y aplicaciones clínicas de las células madre hematopoyéticas.

## **Específicos**

- Definir el origen y las características de las células madre y su función en el sistema hematopoyético.
- Describir la regulación de la proliferación y la diferenciación de las células madre hematopoyéticas.
- Caracterizar los diferentes grupos de citoquinas que actúan en la regulación de la hematopoyesis, así como la forma en que se producen y su utilización en la actualidad.
- Describir la obtención y las aplicaciones de las células madre para el tratamiento de diferentes enfermedades hematológicas.



## 1. EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO

El tejido hematopoyético es probablemente el ejemplo de tejido de estructura jerárquica más estudiado y mejor comprendido. La producción de células maduras especializadas se mantiene durante toda la vida, con el fin de reemplazar las células que se están eliminando continuamente. La síntesis celular es del orden de  $4 \times 10^{11}$  células por día en un adulto normal. Esta cantidad aumenta en caso de requerimientos patológicos, como la destrucción celular aumentada (anemias hemolíticas), o por necesidad funcional de células blancas en las infecciones o de eritrocitos, en casos de hipoxia. El aumento en la producción celular se realiza de forma rápida y adecuada, y puede mantenerse durante períodos prolongados de tiempo e incluso, como en el caso de las anemias hemolíticas crónicas, durante toda la vida. (Testa, 1992)

La hematopoyesis aparece primero en el saco vitelino. Conforme el embrión se desarrolla, el bazo y luego el hígado fetal se convierten en el principal sitio de la hematopoyesis, desde donde las células migran hacia los huesos en desarrollo, los cuales van a ser el sitio principal de hematopoyesis durante la vida adulta, en el tejido denominado médula ósea. (Dexter, 1993)

En la médula ósea, se pueden reconocer células sanguíneas en diferentes estados de desarrollo, así como células más primitivas que actúan como precursores de las diferentes líneas de células maduras. Se sabe que todas estas células precursoras se derivan de una célula común, la célula madre pluripotencial. (Dexter, 1993)

Las células madre hematopoyéticas totipotenciales (pluripotentes, stem cell o tronco común) comprenden entre el 0,01 y el 0,05% del total de la población de la médula ósea, y tienen dos características que las distinguen de las demás células hematopoyéticas. La primera es la capacidad de proliferar para producir nuevas células madre y la segunda es la

capacidad de diferenciarse en al menos nueve tipos de células maduras altamente especializadas: eosinófilos, neutrófilos, basófilos, monocitos/macrófagos, plaquetas, eritrocitos, osteoclastos, linfocitos B y T y fibroblastos. En este proceso, las células madre pluripotenciales producen otras células madre llamadas comprometidas u orientadas, las cuales son capaces de proliferar, diferenciarse y madurar únicamente hacia una línea celular en particular (Figura 1).

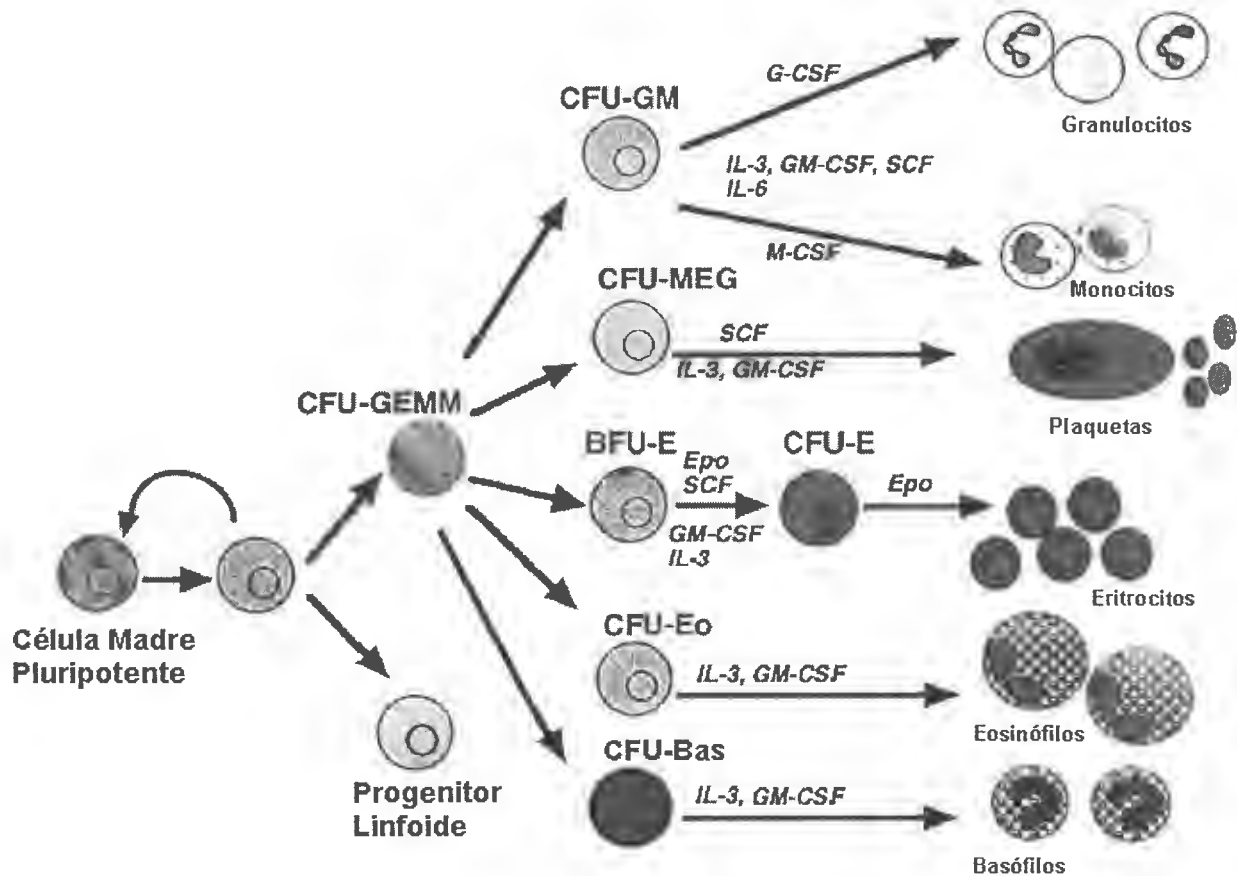


Figura 1. Esquema de la hematopoyesis (Tomado de Socolovsky, 1998)

Así, la célula madre totipotencial, puede replicarse y permanecer como tal, o bien, diferenciarse en células madre mieloides o linfoides, las cuales pueden proliferar y madurar hasta dar origen a todas las células sanguíneas circulantes; además, son las responsables de regenerar la hematopoyesis luego de un trasplante de médula ósea o de un daño severo en el sistema por radiación o tratamiento con agentes quimioterapéuticos. Si las células madre estuvieran ausentes, la pancitopenia resultante podría llevar a la muerte. Cuando están presentes pero defectuosas, el desarrollo anormal de las diferentes líneas celulares puede llevar al inicio de enfermedades malignas hematológicas. (Dexter, 1993)

El proceso de proliferación y diferenciación de células madre, así como el crecimiento y desarrollo de células hematopoyéticas maduras, puede ser modulado al menos en parte por citoquinas, como por ejemplo los factores de crecimiento. Sin embargo, las citoquinas no son el único componente regulador de la hematopoyesis: las moléculas de adhesión también juegan un papel importante en las interacciones entre células estromales y hematopoyéticas y presumiblemente son un prerrequisito para habilitar a las células hematopoyéticas para residir en regiones específicas de la médula ósea y luego responder a los diferentes estímulos que les llegan. (Dexter, 1993)

Los factores de crecimiento producidos por células no hematológicas (como las del estroma) o hematológicas (principalmente linfocitos T y macrófagos) juegan un papel crucial en la regulación de la producción celular y maduración. Estos factores actúan directamente sobre células hematopoyéticas blanco después de unirse a receptores específicos. Sin embargo, sus acciones indirectas, estimulando cascadas de otros factores estimuladores o moléculas inhibitorias también son de suma importancia. (Testa, 1993)

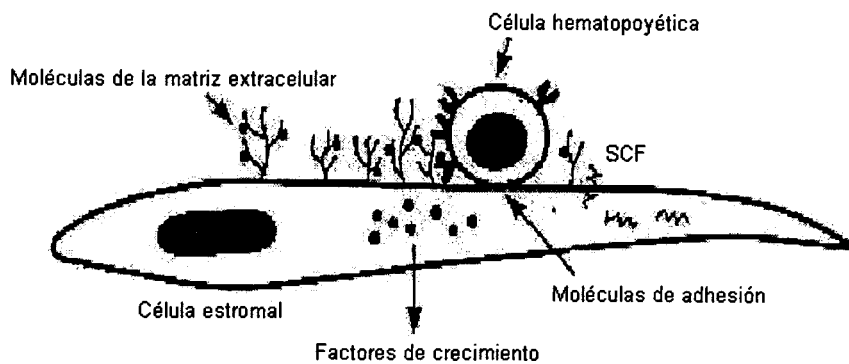
La médula ósea es un tejido altamente estructurado, con diferentes dominios ambientales en los que se encuentran, en diferentes proporciones, las distintas subpoblaciones de células hematopoyéticas primitivas. En esos dominios, las células están expuestas a influencias reguladoras que van a promover el desarrollo hacia líneas celulares

específicas. Así, la hematopoyesis ocurre en asociación con células del estroma, las cuales producen una serie de citoquinas reguladoras que luego van a actuar directa o indirectamente en la proliferación, diferenciación y maduración de las células hematopoyéticas (Figura 2). Por ejemplo, la interleuquina 1 (IL-1), la interleuquina 6 (IL-6) y el Factor de Células Madre (SCF, Stem Cell Factor) pueden ser detectados en células estromales mantenidas *in vitro*. Además, algunos factores estimulantes de colonias también pueden ser producidos por las células del estroma, ya sea constitutivamente o en respuesta a algún tipo de estímulo. El mantenimiento de la proliferación, diferenciación y desarrollo de células maduras a partir de las células madre requiere del contacto físico entre las células estromales y las hematopoyéticas; si este contacto no se da, la hematopoyesis declina rápidamente. En diversos estudios se ha observado que moléculas de la matriz extracelular pueden secuestrar factores de crecimiento, y uno de los componentes más importantes en este proceso es el heparán sulfato, el cual, aislado de células estromales tiene la capacidad de unirse a IL-3 y GM-CSF y presentarlas a células hematopoyéticas en una forma biológicamente activa. (Dexter, 1993)

Las células estromales de la médula ósea son heterogéneas, y comprenden: fibroblastos, células reticulares, adipocitos, células endoteliales y macrófagos; por esto es que existe la posibilidad de que estas diferentes poblaciones produzcan o secuestren tipos específicos de factores de crecimiento. (Dexter, 1993)

En un estudio realizado por *Dexter et al* se demostró que el factor estimulante de colonias granulomonocíticas (GM-CSF) y el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) no están distribuidos uniformemente en células estromales de cultivos de médula ósea, sino que están localizados en poblaciones de células estromales específicas. Se ha propuesto la hipótesis de que en la médula ósea, existen ambientes anatómicamente definidos donde ciertos factores de crecimiento se localizan y ejercen sus efectos sobre las células hematopoyéticas totipotenciales, dando origen a líneas celulares específicas. En un estudio realizado en médula ósea murina se observó que hay células multipotenciales que

muestran diversos grados de diferenciación hacia distintas líneas celulares y se encuentran en una elevada concentración en áreas bien definidas del tejido. (Dexter, 1993)



Un sistema regulador con múltiples componentes:

1. Células estromales heterogéneas
2. Factores de crecimiento
3. Moléculas de adhesión
4. Moléculas de la matriz extracelular

Figura 2. Diagrama esquemático que muestra la interacción entre una célula estromal, la célula blanco y un factor de crecimiento. (Tomado de Dexter, 1993)

## **2. LAS CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS**

### **Perspectiva histórica**

El término células madre fue utilizado por primera vez en la literatura científica en los años sesenta. Luego de esto, ha aparecido esporádicamente entre los años setenta y ochenta, y no fue hasta mediados de los ochenta que llamó la atención de muchos científicos, cuando aparecieron las primeras publicaciones acerca del potencial clínico de las células madre sanguíneas para restaurar la hematopoyesis en pacientes aplásicos, como consecuencia de quimioterapia o radioterapia. Sin embargo, la discusión acerca del significado fisiopatológico de las células madre circulantes empezó desde muchos años antes. (Fliedner, 1998)

Alexander Maximov, mientras trabajaba en San Petesburgo en 1909, fue el primero en sugerir que existía una célula madre hematopoyética con la apariencia morfológica de un linfocito y que era capaz de migrar a través de la sangre hasta nichos microecológicos que le permitían proliferar y diferenciarse en linajes específicos. En la actualidad, sabemos que Maximov estaba en lo correcto al sugerir el origen de la hematopoyesis en una célula capaz de migrar de un sitio de hematopoyesis a otro a través de la circulación sanguínea y quedarse en sitios tisulares en los cuales el microambiente conduce a la diferenciación y proliferación de células madre hematopoyéticas. (Fliedner, 1998)

En los textos hematológicos de los años cincuenta se asumía que en la sangre circulante de individuos saludables no estaban presentes células inmaduras. La hematopoyesis extramedular era considerada como un retorno de ciertos tejidos hacia un estado embrionario, por lo tanto, patológico. (Fliedner, 1998)

Años más tarde, Flidner y colaboradores determinaron que normalmente había células sintetizando ADN en sangre periférica (Flidner, 1998). En los años sesenta Joan Goodman y George Hodgson publicaron un artículo llamado “Evidencia de Células madre en Sangre Periférica de Ratones”. Este documento, junto con otros del grupo del laboratorio Brookhaven, dio pie al desarrollo de estudios sobre la fisiología y fisiopatología de las células madre sanguíneas como un sistema integral de la homeostasis de la formación de células sanguíneas. (Flidner, 1998)

Así, en el libro “Células Hematopoyéticas” de Metcalf y Moore, en 1970, revisan toda la información que había hasta el momento con respecto a ese tema. Se reconoció el hecho de que las células madre son de importancia primaria para el desarrollo embrionario de la hematopoyesis en la médula ósea y en la linfopoyesis en los órganos apropiados y que juegan además, un papel fundamental en el mantenimiento de la hematopoyesis en el adulto en el cual está distribuida a lo largo de todos los huesos. Con su libro, Metcalf y Moore abrieron la puerta para la investigación experimental y clínica del papel fisiológico de las células madre sanguíneas y su fisiopatología. (Flidner, 1998)

### **Definición y cinética de las células madre hematopoyéticas**

El recambio celular del sistema hematopoyético en un hombre de 70 kg de peso se estima que es cercano a 1 trillón de células por día, incluyendo 200 billones de eritrocitos y 70 billones de neutrófilos. Este enorme proceso de renovación celular está soportado por una población muy pequeña de células de la médula ósea llamadas células madre. (Ogawa, 1993)

Las células madre y progenitoras, no pueden reconocerse por medios morfológicos convencionales. Su existencia se ha demostrado gracias a las técnicas de cultivo *in vitro*, las cuales han permitido comprobar que ciertas células, al ser plantadas sobre una matriz

semisólida y en presencia de estimulantes determinados, son capaces de proliferar y dar lugar a la formación de una colonia. A estas células se les ha denominado Unidad Formadora de Colonias (CFU, Colony Forming Unity), o Célula Formadora de Colonias (CFC, Colony Forming Cell), ya que está demostrado que las colonias son clonales, es decir, cada colonia deriva de una única célula. Estas células se identifican por la progenie a la que dan lugar y se denominan por un sufijo que hace referencia a esta progenie (ej. CFU-GM: Unidad formadora de colonias granulomonocíticas). (Testa, 1992)

En general, el término “células madre” se refiere a células que son capaces de reconstituir, a largo plazo, el sistema hematopoyético en animales receptores. Por otro lado, algunas de las células que proveen reconstitución a corto plazo pueden ser llamadas también células madre, según el modelo estocástico que se describirá más adelante. (Ogawa, 1993)

Las características principales de estas células son:

- Pluripotencialidad, la cual implica que las células madre pueden originar todas las líneas linfohematopoyéticas. Esto se ha demostrado experimentalmente usando marcadores cromosómicos o células con inserción de retrovirus, cuyo destino puede seguirse por el organismo. Si se inyectan células de estas características a ratones irradiados puede comprobarse que clones que comprenden todas las líneas linfohematopoyéticas se detectan una vez que el sistema se ha regenerado. Estas observaciones indican que una célula madre puede recolonizar todo el sistema en el ratón, y ponen también de manifiesto la extensa capacidad de proliferación de las células madre. (Testa, 1992)
- Capacidad de autorenovación, la cual asegura que el número de células madre se mantenga constante en el tejido a lo largo de la vida normal del individuo, y permite que se regeneren nuevas células para reemplazar las que se han perdido normalmente



por diferenciación o por mecanismos patológicos, por ejemplo a consecuencia de los tratamientos citotóxicos. (Testa, 1992)

El concepto de células madre ha sido bien establecido, sin embargo, no se ha podido estudiarlas directamente debido a la ausencia de marcadores específicos para detectarlas. Así, la investigación de los mecanismos que regulan estas células dependen de pruebas funcionales e indirectas como el ensayo de colonias de bazo, ensayos de cultivo en suspensión y reconstitución de ratones letalmente irradiados o genéticamente deficientes. (Ogawa, 1993)

En el estado estacionario, la mayoría de células madre están latentes en el ciclo celular y solamente una pocas suplen todas las células hematopoyéticas en un momento dado. Lajtha originalmente propuso el concepto de un verdadero estado de latencia y lo llamó Go. Este investigador propuso que las células madre hematopoyéticas están normalmente en Go y se vuelven activas en el ciclo aleatoriamente, además, este estado confiere a las células madre tiempo para reparar el ADN, permitiendo el mantenimiento de la integridad genética de las poblaciones de células madre. Hay numerosos estudios que apoyan el concepto de la latencia de estas células. Evidencia de la quiescencia de los progenitores primitivos hematopoyéticos ha sido obtenida en cultivos de progenitores humanos. Estos estudios documentaron que los progenitores individuales permanecen como células únicas por dos semanas en cultivo y proliferan en respuesta a la estimulación por combinaciones de citoquinas. (Ogawa, 1993)

En 1964, *Till et al* propusieron un importante modelo de las funciones de las células madre en el cual la decisión de una célula madre para autorreplicarse o diferenciarse se describe como un proceso estocástico. Ellos desarrollaron el modelo de “nacimiento y muerte” para la autorreplicación y diferenciación de células madre y lo probaron por medio de una simulación en computadora basada en la generación de números aleatorios y analizando las distribuciones de unidades formadoras de colonias en bazo (CFU-S, por sus

siglas en inglés) en colonias de bazo individuales. Basándose en la concordancia entre la simulación por computadora y observaciones experimentales, ellos propusieron que la decisión de una célula madre de diferenciarse hacia una línea determinada o replicarse es un proceso estocástico. Los procesos estocásticos se definen como eventos determinados aleatoriamente, los cuales siguen alguna distribución o patrón probable, por lo que se pueden analizar estadísticamente pero no se pueden predecir con precisión. (Ogawa, 1993)

Por su parte, *Ogawa et al* propusieron que el compromiso de los progenitores multipotenciales hacia líneas mieloides individuales podría ser también un proceso estocástico. Análisis citológicos de colonias derivadas de una sola célula mostraron una variedad de combinaciones de líneas celulares, consistente con el concepto de que la diferenciación de células madre es un proceso estocástico. No solamente los tipos de células en las colonias eran diferentes sino también el número de líneas celulares presentes en cada colonia. Esta observación indicó que el principio estocástico no solo aplica en el tipo sino también en el número de líneas celulares que se expresan durante el proceso de diferenciación. (Ogawa, 1993)

Anteriormente, dos modelos determinísticos fueron propuestos como mecanismos de la diferenciación de células madre. El primero de ellos es el modelo del microambiente inductor hematopoyético, el cual supone que hay nichos anatómicos que dirigen la diferenciación de progenitores multipotentes hacia una línea específica. El otro modelo es el modelo competitivo, el cual propone la regulación de la diferenciación por medio de factores humorales como la eritropoyetina y factores estimuladores de colonias. (Ogawa, 1993)

Dos mecanismos celulares pueden ser considerados para el modelo estocástico de diferenciación. Un mecanismo propone la restricción aleatoria de líneas celulares en los progenitores, la característica principal de este modelo es que asume la existencia de progenitores oligopotenciales. En un mecanismo alternativo una célula pluripotente puede

reproducirse (autorreplicación) o aleatoriamente puede diferenciarse hacia la expresión de una sola línea celular. En contraste con el primer modelo, no se da una restricción progresiva del potencial y por lo tanto no hay progenitores oligopotentes; así, la detección de dos o tres líneas en una sola colonia podría ser causada por la presencia de diferentes progenitores monopotentes. (Ogawa, 1993)

Aunque el proceso estocástico de diferenciación y los mecanismos de acción de citoquinas que se discutirán más adelante proveen una explicación razonable para la regulación de la hematopoyesis, debe notarse que es un modelo basado en estudios de progenitores aislados en un sistema de cultivo artificial. Es posible que la variación en los tipos de colonias pueda ser generada por interacciones de citoquinas durante la formación de la colonia. (Ogawa, 1993)

### 3. REGULACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis está estrictamente controlada por factores estimulantes e inhibidores. Los factores estimulantes o hemopoyetinas regulan la proliferación, diferenciación y maduración de los progenitores hematopoyéticos, mantienen la integridad de la membrana y la viabilidad celular de elementos maduros e inmaduros, y promueven la activación funcional de las células sanguíneas maduras. Estos factores son en general glicoproteínas con cadenas polipeptídicas de longitud similar. Los glicósidos son de composición variable, no están involucrados en la actividad biológica y dificultan la degradación de estos factores por acción de enzimas proteolíticas, incrementando su vida media *in vivo*. Las hemopoyetinas tienen actividad biológica elevada; sus niveles en sangre y tejidos en condiciones basales son mínimos, pero hay un incremento rápido de su síntesis y liberación después de hemorragia, infección y/o estímulo antigénico. Estos factores se detectan biológica e inmunoquímicamente como tales y son producidos por un amplio número de células como los linfocitos, macrófagos, fibroblastos y células endoteliales. (Malaspina, 1992)

La mayor parte de los factores estimulantes fueron identificados por su capacidad de inducir la formación de colonias hematopoyéticas *in vitro* (CFS, colony-stimulating factors). La eritropoyetina es la única hemopoyetina que desde su descubrimiento demostró un efecto *in vivo*. En cuanto a las otras, en particular los CSFs, sólo existía evidencia *in vitro*. El factor limitante fue hasta hace poco su escasa disponibilidad y pureza a causa de la baja eficiencia de las técnicas de aislamiento y purificación. El clonaje de los genes que codifican estos factores y la aplicación de técnicas de ingeniería genética han permitido la disponibilidad de grandes cantidades de hemopoyetinas recombinantes. Esto a su vez ha llevado a demostrar que estas citoquinas tienen un efecto *in vivo*. Las investigaciones *in vivo* se hicieron inicialmente en roedores y después en primates, tanto en condiciones fisiológicas como de estrés inducidas por quimioterapia, irradiación o

transplante de médula ósea. Los estudios en primates han servido como modelo preclínico para establecer las dosis, frecuencia de administración y toxicidad en seres humanos. (Malaspina, 1992)

Algunos factores son primordialmente estimuladores o inhibidores, mientras que otros tienen funciones más complejas en la proliferación hematopoyética. Por ejemplo la interleuquina 4 ha demostrado tener actividad estimuladora e inhibidora. Algunos factores tienen acciones más allá del sistema hematopoyético, por ejemplo los efectos pleiotrópicos de la interleuquina 6 que envuelven el sistema inmune, hepático y renal. Otro aspecto por tomar en cuenta es que afectan a células en diferentes etapas, como es el caso de G-CSF, que estimula la maduración de progenitores de neutrófilos mientras que también puede actuar sobre progenitores multipotentes primitivos. Además de los efectos sobre los progenitores, muchas citoquinas son capaces de activar funciones de leucocitos y monocitos maduros. (Ogawa, 1993)

Un concepto importante con respecto a la regulación por citoquinas es que hay una redundancia funcional significativa entre las citoquinas, particularmente en las que actúan en etapas tempranas. Hay varias observaciones que apoyan la aseveración de que hay redundancia entre los reguladores hematopoyéticos, como son la presencia de acciones proliferativas en común, el espectro común de acciones biológicas, subunidades compartidas entre receptores y la coexpresión de receptores para diferentes reguladores en las células individuales. (Metcalf, 1993)

Los factores estimulantes involucrados en el desarrollo y activación funcional de los elementos mieloides son: la eritropoyetina (Epo), el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF), el factor estimulante de colonias monocíticas (M-CSF), el factor estimulante de colonias granulocíticas-monocíticas (GM-CSF), la interleuquina 1 (IL-1), la interleuquina 3 (IL-3) o multi-CSF, la interleuquina 4 (IL-4), la interleuquina 5 (IL-5), la interleuquina 6 (IL-6), la interleuquina 9 (IL-9), la interleuquina 11 (IL-11), el Factor de

Células Madre (SCF, Stem Cell Factor) o ligando de la proteína codificada por el oncogen *kit* (KL, *kit*-ligand). Además, otros factores que actúan como inhibidores en estadios tardíos de la hematopoyesis tienen también efectos estimuladores en otros estadios, como por ejemplo el Factor Inhibidor de Leucemia (LIF, Leukemia Inhibitory Factor), el Factor de Transformación y Crecimiento  $\beta$  (TGF  $\beta$ , Transforming Growth Factor  $\beta$ ), Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  y  $\beta$  (TNF $\alpha$  y  $\beta$ , Tumoral Necrosis Factor), y la Proteína Inhibidora de Macrófagos (MIP-1, Macrophage Inhibitor Protein 1). (Malaspina, 1992)

Los factores de crecimiento se pueden dividir en tres categorías: (1) los que actúan en etapas tardías y son específicos de una línea celular, (2) los que actúan en etapas intermedias y no son específicos de una línea celular y (3) factores que afectan a los progenitores latentes primitivos. (Ogawa, 1993)

### **Factores específicos de acción tardía**

La mayoría de estos factores intervienen en la proliferación y maduración de progenitores comprometidos. La eritropoyetina es un regulador fisiológico de la eritropoyesis, el M-CSF y la IL-5 son considerados como específicos para macrófagos/monocitos y eosinófilos, respectivamente. El G-CSF regula la proliferación y maduración de progenitores de neutrófilos, aunque también actúa sobre progenitores primitivos, como se discutirá en detalle más adelante. (Ogawa, 1993)

## **Factores inespecíficos de acción intermedia**

Estos factores intervienen en la proliferación de progenitores multipotentes pero solamente cuando ya han salido de G<sub>0</sub>. Incluyen IL-3, GM-CSF e IL-4.

IL-3 por sí solo parece que no interviene en las etapas finales de la hematopoyesis. Estudios realizados por *Ogawa et al* indican que el grado de respuesta de progenitores multipotentes murinos hacia IL-3 decrece conforme se diferencian y maduran. *López et al*, reportaron que progenitores hematopoyéticos humanos también pierden su respuesta a IL-3 conforme se diferencian hacia neutrófilos. Estos resultados apoyan el concepto de que los efectos hematopoyéticos de IL-3 están restringidos a los progenitores en etapas intermedias del desarrollo hematopoyético y que no apoyan los procesos en líneas celulares restringidas, con la posible excepción de basófilos y mastocitos. (Ogawa, 1993)

GM-CSF originalmente fue descrito como una citoquina específica para granulocitos y macrófagos, pero estudios posteriores demostraron la ausencia de especificidad de esta citoquina. En humanos, hay varios reportes que muestran que las poblaciones blanco del GM-CSF se superponen con aquellas de la IL-3 e incluyen progenitores no comprometidos. El descubrimiento de la identidad entre la subunidad  $\beta$  del receptor humano para IL-3 y la subunidad  $\beta$  del receptor humano de GM-CSF apoyan el concepto de que ambas citoquinas tienen funciones similares. (Ogawa, 1993)

IL-4 también parece pertenecer a este grupo de factores no específicos que regulan a los progenitores multipotenciales. Por la posición intermedia de las células blanco de IL-3, GM-CSF e IL-4, estas moléculas pueden interactuar efectivamente con factores de acción tardía en la producción de células más maduras así como con factores que inician en ciclo celular en progenitores latentes. Se ha postulado que la producción de estos factores se acelera sólo en el caso de que haya una citopenia seria. (Ogawa, 1993)

## **Factores que inician el ciclo celular en progenitores latentes**

*Ogawa et al*, encontraron que IL-6, G-CSF, IL-11, SCF e IL-1 actúan sinérgicamente con IL-3 apoyando la formación de colonias derivadas de progenitores hematopoyéticos latentes murinos. Originalmente, estos investigadores propusieron que el efecto de estos factores es disminuir la duración de G<sub>0</sub> en los progenitores primitivos. Estudios más recientes indican que esos factores activan el ciclo celular en progenitores latentes. Estudios acerca de los mecanismos de transducción de señales de citoquinas proveen explicaciones bioquímicas acerca de las similitudes en las funciones de IL-6, G-CSF e IL-11. (Ogawa, 1993)

Un factor que parece ser único es SCF, el cual actúa sinérgicamente con los demás factores, además de que también puede interactuar con factores de acción tardía en particular con la eritropoyetina. (Ogawa, 1993)

Se ha demostrado que IL-3 y GM-CSF mantienen la supervivencia de los progenitores primitivos hematopoyéticos en G<sub>0</sub>, apoyando el concepto de que se requieren factores para que los progenitores primitivos sobrevivan en el estado de latencia. (Ogawa, 1993)



## **Aplicaciones clínicas de las hemopoyetinas**

El uso clínico de las hemopoyetinas ha despertado gran interés ya que tiene potencialmente un gran número de aplicaciones:

1. Como terapia de reemplazo en el tratamiento de citopenias secundarias a un déficit cuantitativo o cualitativo de hemopoyetina, por ejemplo, la utilización de eritropoyetina en pacientes con insuficiencia renal crónica.
2. Incrementar el pool de progenitores hematopoyéticos de modo que sea posible utilizar dosis más elevadas de agentes citotóxicos.
3. Acelerar la regeneración del tejido medular después de tratamientos mieloablativos (quimioterapia y/o irradiación) o trasplante de médula ósea.
4. Corrección de citopenias congénitas y adquiridas.
5. Activación funcional de células maduras.
6. En el tratamiento de leucemias agudas, ya sea induciendo la diferenciación de blastos leucémicos en células maduras funcionales, o bien, estimulando el tránsito de células leucémicas en estado no proliferativo hacia un estadio proliferativo, volviéndolas así más susceptibles a agentes citotóxicos.
7. En la movilización de células madre a sangre periférica para su uso en trasplante.  
(Dexter, 1993)

## **Eritropoyetina**

La eritropoyetina es una glicoproteína que regula los estadios tardíos de la producción eritroide. Es producida principalmente por el riñón y el hígado. La síntesis y secreción de Epo está controlada por un sistema de receptores de membrana que funciona como sensor específico de la presión de oxígeno tisular. (Malaspina, 1992)

### *Producción*

El riñón es la principal fuente de Epo. Los niveles de Epo en pacientes anémicos con uremia severa son muy bajos, pero después del trasplante renal aumentan considerablemente como consecuencia de un incremento en la síntesis y liberación de la hormona, lo cual a su vez lleva a una normalización del hematocrito. ( Malaspina, 1992)

El hígado es otro órgano productor de Epo, pacientes anéfricos con anemia severa no tienen completa ausencia de Epo plasmática. Animales nefrectomizados bilateralmente desarrollan anemia y tienen niveles muy bajos de Epo, los cuales decaen después de hepatectomía total. (Malaspina, 1992)

Estudios recientes han mostrado que también los macrófagos de médula ósea producen Epo. Cuando estas células son expuestas a niveles de oxígeno de 3,5% liberan una glicoproteína que estimula la formación de colonias eritroides, sin necesidad de Epo exógena. Los macrófagos medulares poseen además sensores para la presión de oxígeno y expresan el gen de la Epo. (Malaspina, 1992)

Los mecanismos intracelulares que intervienen en la síntesis de Epo renal involucran la ciclooxigenasa y el AMP cíclico. Niveles bajos de la presión de oxígeno tisular activan la ciclooxigenasa, la cual produce en la médula renal un incremento de prostaglandinas, principalmente la PGE<sub>2</sub>. La PGE<sub>2</sub> induce la liberación en la corteza renal de AMPc, que a su vez activa una proteinquinasa responsable del incremento de Epo a través, posiblemente, de la fosforilación de un precursor de la eritropoyetina. (Malaspina, 1992)

### *Lugar y mecanismo de acción*

La Epo actúa sobre la médula ósea en forma selectiva, estimulando la proliferación y diferenciación de la serie eritroide a partir de un progenitor menos diferenciado. La Epo estimula la proliferación y diferenciación de los progenitores eritroides tardíos (CFU-E), y no tiene efecto directo, pero se requiere para completar la diferenciación de precursores eritroides más primitivos (BFU-E). Además, favorece la proliferación de proeritroblastos y eritroblastos basófilos y su transformación al estadio ortocromático, incrementa la síntesis de ARN en células eritroides, disminuye el tiempo de tránsito medular de células eritroides con denucleación temprana de eritroblastos e induce la movilización de reticulocitos a sangre periférica a las 24 horas post-tratamiento. (Malaspina, 1992)

Con respecto a los hechos que se desencadenan post-interacción ligando-receptor y que llevan a la transcripción, la Epo no actuaría directamente difundiendo hasta al núcleo, sino que sería indirectamente, a través de un factor intracelular que actuaría como segundo mensajero. Dentro de los posibles segundos mensajeros se ha propuesto el AMPc, GMPc y un factor de naturaleza polipeptídica inactivado por tripsina, siendo el más aceptado el tercero. La Epo, al actuar sobre la membrana citoplasmática, induciría la producción de esta proteína intermediaria, la cual interactúa con el núcleo estimulando la transcripción. En suma, la estimulación de la síntesis de ARN es el primer hecho nuclear, seguida de la producción de ADN, la división celular y la maduración con síntesis de hemoglobina. (Malaspina, 1992)

### *Efectos in vivo y aplicaciones clínicas*

Las investigaciones iniciales con Epo se centran en pacientes anémicos con niveles bajos de Epo endógena como en aquellos con insuficiencia renal crónica. Varios estudios han establecido claramente el valor terapéutico de la Epo en el tratamiento de este tipo de anemia y su mínima toxicidad. También es capaz de revertir la anemia originada por un efecto tóxico directo sobre los progenitores eritroides por drogas como el AZT, usado en el tratamiento del SIDA. La Epo también mejora la anemia en ciertos pacientes con síndromes mielodisplásicos con anemia y niveles endógenos altos de Epo. (Malaspina, 1992)

## **Factores estimulantes de colonias**

El nombre de factores estimulantes de colonias (CSF, Colony Stimulating Factors) fue dado a un grupo de glicoproteínas que inducen la formación de colonias granulocíticas y monocíticas a partir de células medulares que no son identificables morfológicamente. Estas células progenitoras están, por lo tanto, ya comprometidas en un proceso de diferenciación celular específico. Este grupo de citoquinas que comparten múltiples características biológicas y bioquímicas son: el G-CSF, el M-CSF, el GM-CSF, y la IL-3 o multi-CSF. (Malaspina, 1992)

### *Producción*

En condiciones fisiológicas, los monocitos, macrófagos, los fibroblastos y las células endoteliales del estroma medular son los responsables fundamentales de la producción de los CSFs. Otras células que tienen ARNm específico para los CSFs son los linfocitos B y T y algunas células epiteliales. La síntesis basal es muy baja, independientemente del tipo de célula productora, pero en condiciones de estrés hay un incremento de la transcripción y traducción, obteniéndose un aumento de hasta 1 000 veces los niveles basales. Los agentes estimulantes son endotoxinas bacterianas para fibroblastos y células endoteliales, y antígenos específicos para linfocitos. Los agentes activantes actúan a veces indirectamente, estimulando la liberación de IL-1, la cual a su vez estimula la producción de CSFs. (Malaspina, 1992)

El G-CSF es producido por monocitos, fibroblastos y células endoteliales al ser estimuladas con IL-1 o TNF. El M-CSF es producido fundamentalmente por monocitos. El GM-CSF es producido por monocitos, fibroblastos, células endoteliales y linfocitos T de distintos órganos al ser activados por IL-1 o TNF. La IL-3 es producida por linfocitos T estimulados por la IL-1 o TNF. (Malaspina, 1992)

### *Lugar y mecanismo de acción*

La disponibilidad, por una parte, de formas recombinantes de CSFs y, por otra, de mejores técnicas de aislamiento y purificación de progenitores hematopoyéticos, ha permitido delinear más claramente el sitio de acción de los diferentes CSFs. Estos factores no sólo estimulan la proliferación, diferenciación y maduración de los progenitores mieloides, sino que también mantienen la integridad de la membrana y la viabilidad celular de elementos maduros e inmaduros, y promueven la activación funcional de las células maduras. La activación funcional es un proceso rápido y se revierte en ausencia del factor estimulante. En granulocitos, los CSFs aumentan la capacidad de ingestión y el consumo de oxígeno, con la correspondiente producción de superóxido y posterior incremento de la actividad citolítica. En macrófagos, activan la capacidad fagocítica, con aumento de la síntesis de radicales oxigenados tóxicos por la vía de activación de la NADPH oxidasa y fosfolipasa A2 de membrana, y prolongan el período citotóxico. (Malaspina, 1992)

El G-CSF estimula la producción de neutrófilos. En experimentos con células medulares no separadas y en presencia de Epo, el G-CSF induce la formación de colonias derivadas de BFU-E y CFU-mixtas, mientras que, en experimentos con preparaciones celulares altamente enriquecidas con progenitores hematopoyéticos, sólo se forman colonias neutrofilicas; lo que indica que la acción de G-CSF sobre BFU-E y CFU-mixtas es indirecta. (Malaspina, 1992)

El M-CSF humano estimula la neutropoyesis por mecanismos indirectos, estimulando la producción de otros CSFs. El M-CSF acelera la maduración de monocitos en macrófagos; en particular, induce la producción de interferón y de activador de plasminógeno. (Malaspina, 1992)

El GM-CSF estimula, sobre todo, la producción de neutrófilos y monocitos/macrófagos y, menos intensamente, la de eosinófilos. Además, estimula la proliferación y diferenciación de progenitores eritroides más primitivos (BFU-E) y megacariocíticos (CFU-Mk), los cuales requieren, para completar su maduración, la participación de otros factores. Este efecto sobre varias líneas celulares indica que el GM-

CSF actúa sobre un progenitor menos diferenciado. El GM-CSF estimula la síntesis y liberación de otras citoquinas, como TNF y IL-1. (Malaspina, 1992)

La IL-3 tiene un efecto equivalente al del GM-CSF y además estimula la producción de mastocitos. La IL-3 ejerce su acción sobre progenitores hematopoyéticos más primitivos, cercanos a la célula madre pluripotente, mientras que la IL-1 actúa posiblemente sobre la célula madre. (Malaspina, 1992)

Una falta de regulación en la producción de CSFs puede inducir efectos perjudiciales que favorecen el desarrollo tumoral.

Los progenitores, precursores y células maduras tienen receptores específicos de membrana para cada uno de estos CSF, encontrándose más de un tipo de receptor por célula. El número de receptores/célula es alrededor de 100-500, y se necesita un número bajo de sitios ocupados (10%) para desencadenar la respuesta biológica. No existe competencia entre los CSFs para ocupar un mismo receptor, pero hay interacción entre el receptor ocupado y el libre. (Malaspina, 1992)

### *Efectos in vivo y aplicaciones clínicas*

#### M-CSF

La forma natural del M-CSF humano fue el primer factor de crecimiento utilizado en pacientes cancerosos con leucopenia post-quimioterapia y su administración endovenosa induce una aceleración de la neutropoyesis sin afectar las otras líneas celulares, incluyendo los monocitos. Este efecto *in vivo* del M-CSF es probablemente indirecto, ya que no tiene efecto sobre las células progenitoras pero estimula la síntesis y liberación de otros CSFs. (Malaspina, 1992)

#### G-CSF

La administración de G-CSF, en individuos con médula ósea intacta o modificada, se traduce en un incremento del número de neutrófilos en sangre periférica, el cual es dosis dependiente, efecto que se revierte al suspender el tratamiento. La toxicidad más notable

del G-CSF es dolor óseo, que es también dosis dependiente. Igualmente, en pacientes con neutropenias congénitas o secundarias a infecciones, la administración de G-CSF incrementa el número y la actividad funcional de neutrófilos, favoreciendo así la resolución de la infección. El tratamiento con G-CSF acelera la recuperación hematológica de pacientes con tumores sólidos tratados con quimioterapia intensiva solamente o trasplante autólogo de médula ósea. La administración de G-CSF a pacientes con síndromes mielodisplásicos sin exceso de blastos causa un incremento de neutrófilos sin aumentar la proporción de blastos. En leucemia mieloide aguda reduce la duración de la neutropenia post-quimioterapia de inducción sin riesgo de estimulación de blastos residuales. (Malaspina, 1992)

### GM-CSF

La administración de GM-CSF a individuos con médula intacta o modificada causa un aumento de neutrófilos, eosinófilos y monocitos en sangre periférica. El efecto secundario más notable asociado con esta citoquina es también dolor óseo, el cual es dosis dependiente. En pacientes con neutropenias congénitas y adquiridas, el GM-CSF induce neutrofilia, eosinofilia y monocitosis. En pacientes con SIDA que tienen neutropenia severa asociada, ya sea a la infección o secundaria al tratamiento antiviral, el uso de GM-CSF permite continuar estos tratamientos. En pacientes con aplasia medular, el GM-CSF produce una mejoría del número de leucocitos, pero sólo en aquellos pacientes que tienen progenitores hematopoyéticos residuales. El uso de esta citoquina también acelera la recuperación de neutrófilos, eosinófilos y monocitos en pacientes tratados con quimioterapia intensiva solamente y trasplante autólogo o alogénico. El GM-CSF también revierte las citopenias de pacientes con síndromes mielodisplásicos (SMD). El tratamiento con GM-CSF en pacientes con SMD induce incremento de neutrófilos, eosinófilos, monocitos; en algunos casos, de linfocitos; en raros casos, de plaquetas y lo que es más notable, en ciertos casos causa un incremento de blastos, ofreciendo incluso un cuadro franco de leucemia aguda. (Malaspina, 1992)

### IL-3

La administración de IL-3 a roedores, primates y humanos con médula ósea normal o patológica causa un incremento en el número de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, reticulocitos y plaquetas. Esta respuesta es generalmente menos marcada y ocurre más tarde en comparación con la que es inducida por G-CSF o GM-CSF, lo cual refleja su acción sobre un progenitor más primitivo. (Malaspina, 1992) Sin embargo, no hay condición bien establecida para la utilización de IL-3 *in vivo*. En combinación con G-CSF, GM-CSF y Epo, puede ser usada en casos de fallo en trasplante de médula ósea y hasta el momento no ha demostrado beneficio significativo en el tratamiento de enfermedades malignas hematológicas como la leucemia mieloide aguda o los síndromes mielodisplásicos. (Eder, 1997)

### **Interleuquina 1**

Originalmente, se le describió como un factor soluble de naturaleza polipeptídica liberado por macrófagos activados, que tenía capacidad pirógena y, posteriormente, se le adjudicaron otras funciones como el efecto sinérgico con la fitohemaglutinina en la proliferación de timocitos, resorción del cartilago, aumento del catabolismo muscular, inducción de neutrofilia y, recientemente, actividad de hemopoyetina. (Malaspina, 1992)

#### *Producción*

Los monocitos/macrófagos, que son la fuente principal de IL-1 *in vivo*, han servido como células modelo para los estudios de producción de IL-1. En general, no existe IL-1 preformada, su producción activa requiere la transcripción del ARNm específico. El fenómeno inicial en este proceso es la interacción ligando-receptor de membrana. La unión a los receptores de membrana lleva a la activación de una proteinkinasa, responsable del incremento del ARNm específico de IL-1. El primer producto del proceso de traducción de



IL-1 es un precursor de 31 Kd para cada tipo de IL-1. En contraste con la forma  $\alpha$ , que permanece asociada a la membrana en su mayor porcentaje, la forma  $\beta$  es secretada. El mecanismo de secreción incluye un proceso de formación de poros en la membrana plasmática y es dependiente del antígeno Ia/DR de membrana, sea la producción de IL-1 inducida por endotoxinas o por antígenos específicos. (Malaspina, 1992)

La producción de IL-1 es inhibida por un gran número de agentes inmunosupresores, infecciones virales así como por el interferón  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) y el Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ). (Malaspina, 1992)

La lista de células productoras de IL-1 incluye queratinocitos, células del epitelio corneal, linfocitos B estimulados, linfocitos granulares grandes, células gliales, células endoteliales, neutrófilos, células mesangiales, fibroblastos y líneas celulares transformadas, como las leucemias monocíticas murinas P388D1 y J774 y humanas ThP-1, U.937 y células derivadas de melanomas. (Malaspina, 1992)

#### *Lugar y mecanismo de acción*

La IL-1 no induce la formación de colonias hematopoyéticas *in vitro*, pero hace que una subpoblación celular sea sensible a los factores estimulantes de colonias. La IL-1 induce a la célula madre pluripotente a diferenciarse en estadios que expresan receptores para factores estimulantes que actúan más tardíamente. La IL-1 también estimula la hematopoyesis indirectamente induciendo la producción y liberación de otras hemopoyetinas como el GM-CSF, el G-CSF, el M-CSF, la IL-6 a partir de las células del estroma medular (fibroblastos y células endoteliales). Además, la IL-1 estimula la producción de inhibidores de la hematopoyesis como el interferón  $\beta$ , TNF y prostaglandinas, en particular PGE<sub>2</sub>. A dosis sensibilizantes y no saturantes de IL-1, la estimulación de inhibidores generalmente ocurre como fenómeno secundario cuando el primario de la producción de factores estimulantes ha alcanzado su pico. (Malaspina, 1992)

Se ha atribuido a la IL-1 una multitud de otras funciones que, en la mayor parte de casos, se producen indirectamente a través de otras citoquinas que tienen funciones más específicas, siendo raros los ejemplos de efecto directo. (Malaspina, 1992)

#### *Efectos in vivo y aplicaciones clínicas*

La administración de IL-1 a roedores, primates y pacientes cancerosos post-quimioterapia causa aumento en el número de neutrófilos y monocitos. Este efecto estimulante se observa solamente cuando la IL-1 se administra durante un corto período de tiempo; la administración continuada durante varios días causa el efecto opuesto: citopenia. Este fenómeno es mediado por inhibidores de la hematopoyesis, particularmente el TNF, cuya producción es estimulada por la propia IL-1. Un aspecto importante en cuanto al uso *in vivo* de esta citoquina es que a dosis altas tiene efectos colaterales muy severos tales como hipotensión, shock y muerte, que son mediados por otros factores cuya producción es estimulada por esta citoquina tan pleiotrópica. Sin embargo, la IL-1 es de interés terapéutico por su efecto directo en la célula madre hematopoyética pluripotente y su capacidad de inducir la síntesis y liberación de otras hemopoyetinas. Tiene un gran potencial en el tratamiento de problemas caracterizados por disminución masiva de la reserva de células madre. (Malaspina, 1992)

## **Interleuquina 4**

IL-4 es una glicoproteína producida por linfocitos T que fue originalmente descrita como un coestimulante de la proliferación de linfocitos B no activados, por lo cual se le llamó “B cell growth factor” (BCGF). Más tarde se demostró que induce la expresión de moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en linfocitos B no activados. En las células mieloides, la IL-4 actúa como coestimulante del G-CSF, Epo y la IL-1, en la formación de colonias granulocíticas, eritroides y mixtas respectivamente. En cultivos de médula ósea a largo plazo, IL-4 estimula la proliferación de progenitores primitivos e inhibe la de progenitores tardíos. Este último efecto no es mediado por acción directa de la IL-4 sobre los progenitores ni tampoco a través de la inducción de la producción de inhibidores como el IFN  $\gamma$ , TNF, o TGB  $\beta$ . (Malaspina, 1992)

### *Producción*

La principal fuente de IL-4 son las células T, preferentemente las CD4+ activadas. Otra fuente importante son los mastocitos. (Malaspina, 1992)

### *Lugar y mecanismo de acción*

El receptor para la IL-4 se halla presente sobre las células T, B, mastocitos, macrófagos, la mayoría de células eritroides y mieloides, fibroblastos, y células epiteliales. El número de receptores por célula es generalmente bajo. La activación de las células B, así como de las T, aumenta su expresión. La IL-4 por sí misma también aumenta la expresión del receptor. (Malaspina, 1992)

La naturaleza de los signos bioquímicos desencadenados por la unión del ligando con su receptor no es del todo conocida. El dominio citoplasmático es de fundamental importancia en la transmisión de la señal, la cual sería mediada por la fosforilación de tirosina. (Malaspina, 1992)

## **Interleuquina 5**

La IL-5 estimula la producción de colonias eosinofílicas por células medulares, favorece la supervivencia *in vitro* y estimula la actividad funcional de eosinófilos. La IL-5 induce a los progenitores eosinofílicos a proliferar y diferenciarse en eosinófilos maduros, pero no interviene en la producción de dichos progenitores. La pérdida del antígeno CD34 se correlaciona con la adquisición de la susceptibilidad a la acción de la IL-5. La IL-5 incrementa la actividad citolítica antitumoral de los eosinófilos de sangre periférica y la producción de anión superóxido. (Malaspina, 1992)

## **Interleuquina 6**

La IL-6 es una glicoproteína producida por una amplia variedad de células y actúa en varios tejidos; tiene una actividad multifuncional que regula la respuesta inmune, las reacciones de fase aguda y la hematopoyesis.

### *Producción*

La IL-6 es producida por linfocitos T y B, monocitos, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, células del estroma medular, células mesangiales y neutrófilos humanos estimulados con GM-CSF e IFN  $\alpha$ . También es producida por células tumorales derivadas de mielomas e hipernefoma, líneas celulares T transformadas, líneas monocitoides, líneas carcinomatosas de pulmón y vejiga y líneas derivadas de glioma y astrocitoma. A diferencia de la producción de IL-6 por monocitos, la producción por parte de los linfocitos T requiere la presencia de monocitos, mitógenos o estimulación antigénica. (Malaspina, 1992)

### *Lugar y mecanismo de acción*

En la mielopoyesis actúa sobre la célula madre pluripotente estimulando su tránsito de la fase Go a la fase G1. Esto explica la acción sinérgica con la IL-3, existiendo la posibilidad de que también aumente la expresión de los receptores para la IL-3 en los progenitores multipotentes. La IL-6 aumenta el número de colonias megacariocíticas estimuladas por la IL-3. Además, tiene acción antagónica con el G-CSF sobre la formación de colonias (CFU-GM). La IL-6, junto con la IL-1 y el TNF, regula la producción de las proteínas de fase aguda por parte de los hepatocitos. (Malaspina, 1992)

El receptor específico para la IL-6 es expresado sobre células linfoides y no linfoides en concordancia con sus propiedades multifuncionales. (Malaspina, 1992)

### *Efectos in vivo y aplicaciones clínicas*

La administración de IL-6 recombinante humana a ratones y primates estimula la mielopoyesis causando un aumento significativo del número de neutrófilos, glóbulos rojos, plaquetas y también de linfocitos. (Malaspina, 1992)

### **Interleuquina 11**

Como la IL-6, la IL-11 tiene actividad sinérgica con la IL-3 en la estimulación de progenitores muy primitivos. El mecanismo sería abreviando la duración de la fase Go del ciclo celular. En presencia de la IL-3, la IL-11 estimula la formación de colonias megacariocíticas. (Malaspina, 1992)

## **Kit-ligand o Stem Cell Factor**

El SFC tiene la capacidad de estimular células progenitoras hematopoyéticas muy primitivas. En las células normales existe un proto-oncogen denominado *c-kit* que codifica un receptor con actividad de tirosinkinasa. El receptor de esta molécula ha sido denominado kit-ligand. El ligando del receptor *c-kit* es codificado por un gen denominado *Steel* que regula también el desarrollo de células pigmentarias, germinales y hematopoyéticas. (Malaspina, 1992)

El ligando del producto del protooncogen *c-kit* se aisló como una molécula soluble y fue descrito como Stem Cell Factor (SCF), y *c-kit* ligand (KL). El receptor codificado por el *c-kit* es un glicoproteína que está estructuralmente relacionada con el receptor para el M-CSF y el receptor para el platelet-derived growth factor. (PDGF). (Malaspina, 1992)

### *Producción*

SCF es producido constitutivamente por células endoteliales y fibroblastos. Los queratinocitos en piel normal y células epiteliales del intestino también lo producen, y la proteína SCF puede ser detectada en el timo y otros sitios. (Broudy, 1997)

### *Lugar y mecanismo de acción*

Estudios *in vitro* han demostrado que SCF actúa sobre las células madre hematopoyéticas y células progenitoras; su acción es directa acelerando su entrada en el ciclo celular. (Broudy, 1997)

El SCF no induce colonias hematopoyéticas por sí solo, pero lo hace en presencia de otras hemopoyetinas. Este efecto estimulador es más notable sobre una pequeña subpoblación de células CD34+ que no expresan antígenos asociados con el linaje linfoide ni mieloide. Esta población CD34+lin- es más primitiva que la CD34+, no forma colonias en presencia de G-CSF, GM-CSF, o IL-3, pero cuando estos factores se combinan con el SCF, estas células CD34+lin- producen numerosas colonias. El SCF, además, provoca un aumento en el tamaño de las colonias mixtas (CFU-GEMM) y eritroides (BFU-E) en

presencia de Epo y de las colonias granulocito-macrofágicas (CFU-GM) estimuladas con GM-CSF o G-CSF, lo cual sugiere que el SCF promueve la regeneración y expansión de las células progenitoras que responden a estas citoquinas dentro de las colonias individuales. (Malaspina, 1992)

*Efectos in vivo y aplicaciones clínicas*

La administración de SCF a babuinos causa un incremento de granulocitos, reticulocitos y plaquetas. (Malaspina, 1992)

Se ha utilizado clínicamente en la movilización de células madre de médula ósea a sangre periférica ya que *in vitro* ejerce efectos potenciadores con factores de crecimiento hematopoyéticos que actúan directamente. (To,1997)

Cuadro1. Principales factores estimulantes de la hematopoyesis

| Factor | Fuente   | Célula Blanco   | Efectos <i>in vivo</i> en la hematopoyesis  |
|--------|--|---|---|
| Epo    | Células yuxtglomerulares renales, de Kuffer y macrófagos   | CFU-E   | Estimula proliferación y diferenciación de serie eritroide  |
| IL-5   | Linfocitos T   | Linfocitos B, eosinófilos   | Estimula proliferación de progenitores eosinófilos  |
| M-CSF  | Monocitos  | Macrófagos, neutrófilos   | Estimula neutropoyesis por mecanismos indirectos<br>Acelera maduración de monocitos   |
| GM-CSF | Linfocitos T, monocitos, células endoteliales, fibroblastos  | Neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, célula progenitora multipotente, megacariocito              | Estimula producción de neutrófilos y monocitos/macrófagos y en menor grado eosinófilos<br>Estimula proliferación y diferenciación de BFU-E Y CFU-Mk<br>Estimula síntesis y liberación de otras citoquinas |
| IL-3   | Linfocitos T   | Neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, megacariocitos, mastocitos, célula progenitora multipotente | Equivalente a GM-CSF<br>Estimula producción de mastocitos   |
| IL-4   | Mastocitos y linfocitos T  | Linfocitos B, T y mastocitos  | Coestimulante de G-CSF, Epo e IL-1  |
| G-CSF  | Monocitos, fibroblastos, células endoteliales  | Neutrófilos, macrófagos   | Estimula producción de neutrófilos  |
| IL-1   | Mono/ macrófago, neutrófilos, fibroblastos, endoteliales, cél. dendríticas, epiteliales, mesangiales | Célula madre  | Induce a la célula madre a diferenciarse<br>Induce producción y liberación de otras hemopoyetinas<br>Estimula producción de inhibidores de la hematopoyesis   |
| IL-6   | Monocitos, Linfocitos T, fibroblastos y células epiteliales  | Linfocitos B, T, neutrófilos y célula madre   | Acción sinérgica con IL-3   |
| IL-11  | Cél. endoteliales  | Célula madre  | Acción sinérgica con IL-3   |
| SCF    | Células endoteliales y fibroblastos  | Célula madre  | Estimula proliferación de progenitores hematopoyéticos primitivos   |



## **Factores inhibidores**

El conocimiento actual sobre los inhibidores de la hematopoyesis es menos satisfactorio que el de los factores que la inducen, aunque se ha descrito una serie de sustancias con acción inhibidora, la cual raramente es selectiva.

### *Lactoferrina*

Cuando está saturada por hierro inhibe indirectamente la granulopoyesis al bloquear la liberación de monocinas. Es una proteína liberada a partir de los gránulos secundarios de los granulocitos. (Testa, 1992)

### *Péptido hemoregulador*

Inhibe la proliferación de las CFU-GM, pero es altamente inestable. Su producto de oxidación es un dímero con actividad opuesta, que estimula las colonias granulomonocíticas. Parece lógico pensar que los granulocitos, a través de su fuerte capacidad óxido-reductora, son capaces de mantener un equilibrio entre el monómero y el dímero, lo que causa una rápida modulación de la granulopoyesis. (Testa, 1992)

### *Prostaglandina E*

Inhibe también la proliferación de las CFU-GM. Los monocitos son las células que las producen, lo que sugiere que es también un mecanismo de autoregulación. (Testa, 1992)

### *Factor de crecimiento y transformación $\beta$ (TGF $\beta$ )*

Se localiza en los gránulos alfa de las plaquetas y parece que ejerce un papel de auto-control al inhibir las CFU-Mk y también las BFU-E, las CFC-GM y las CFU-GEMM. (Testa, 1992)

Recientemente se ha demostrado que el Factor Plaquetario 4 inhibe la proliferación y diferenciación de los megacariocitos. Este factor, localizado en los gránulos alfa, podría también ejercer un papel de autoregulación de la megacariocitopoyesis. (Testa, 1992)

*Proteína inflamatoria macrofágica 1  $\alpha$  (MIP1  $\alpha$ )*

Inhibe la entrada de las CFU-S en ciclo celular, pero no actúa regulando el ciclo celular de células más maduras. (Testa, 1992)

*Interferón  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ )*

Tiene efecto inhibitorio directo sobre la mielopoyesis e inhibe las CFU-GEMM, las CFU-GM y las BFU-E. (Testa, 1992)

*Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ )*

Inhibe fundamentalmente a la CFU-GM, pero también actúa sobre progenitores mixtos y eritroides. Además, parece aumentar la proliferación en estadios muy tempranos de diferenciación. (Testa, 1992)

La mayoría de los factores inhibidores a los que se ha hecho referencia no son reguladores específicos del sistema hematopoyético. En general, tienen efectos pleiotrópicos en diversos sistemas del organismo, y es concebible que algunas de sus acciones más importantes puedan ejercerse de manera indirecta a través de complejos circuitos reguladores. (Testa, 1992)

Cuadro 2. Factores inhibidores de la hematopoyesis

| Factor                | Fuente       | Efecto  |
|-----------------------|--------------|---|
| Lactoferrina          | Granulocitos | Bloquea liberación de monocinas                         |
| Péptido hemoregulador | Granulocitos | Inhibe proliferación de CFU-GM                          |
| Prostaglandina E      | Monocitos    | Inhibe proliferación de CFU-GM                          |
| TGB $\beta$           | Plaquetas    | Inhibe proliferación de CFU-Mk, BFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM |
| MIP $\alpha$          | Macrófagos   | Inhibe entrada de CFU-S al ciclo celular                |
| IFN $\gamma$          | Linfocitos T | Inhibe proliferación de CFU-GM, CFU-Mix y BFU-E         |
| TNF $\alpha$          | Macrófagos   | Inhibe proliferación de CFU-GM                          |

#### **4. UTILIDAD CLÍNICA DE LAS CÉLULAS MADRE: TRANSPLANTE DE CÉLULAS MADRE**

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas se ha aplicado ampliamente en el tratamiento de fallo medular y síndromes mielodisplásicos, y en el rescate hematológico de pacientes que reciben quimioterapia a altas dosis para una gran variedad de enfermedades hematológicas.

##### **Fuentes de células madre hematopoyéticas**

Las principales fuentes de células madre hematopoyéticas que se han utilizado son: el cordón umbilical, las células embrionarias y la sangre periférica. Otra fuente que está en estudio es la sangre fetal.

La sangre de cordón umbilical es una rica fuente de células hematopoyéticas ya que su contenido de células madre se asemeja al de la médula ósea. (Cairo, 1997).

La utilización de células madre derivadas de cordón tiene varias ventajas como su disponibilidad inmediata (2 semanas, mientras se hacen las pruebas de compatibilidad), el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas es muy bajo y no existe riesgo para el donador en cuanto a la recolección. (Cairo, 1997).

Las desventajas que presenta esta fuente son:

- La recuperación inmunológica y hematológica después del trasplante puede tardar más por la disregulación de factores de crecimiento en el neonato.
- Existe alto riesgo de transmisión de un desorden genético.

- Se obtiene un número insuficiente de células pluripotentes para receptores adultos, por lo que sólo se puede utilizar para pacientes pediátricos; esto puede dificultar el procesamiento para disminuir células tumorales o linfocitos T, ya que durante éste hay pérdidas importantes de células.
- Hay riesgo de contaminación microbiana ya que el método de recolección es abierto. (Cairo, 1997)

Recientemente, bancos de sangre de cordón en los Estados Unidos y Europa han abierto a los padres la posibilidad de criopreservar sangre de cordón umbilical de sus bebés, para su utilización en caso de una futura enfermedad. (Cairo, 1997)

Otra fuente de células madre son las células embrionarias. Estas son células pluripotentes derivadas de embriones no implantados, que tienen la habilidad de ser mantenidas en cultivo indefinidamente como células indiferenciadas, y además tienen la capacidad de diferenciarse. (Kaufman, 2001)

Estas células proveen una población inicial ilimitada para el estudio del desarrollo de la hematopoyesis, ya que los estudios contemporáneos han sido confinados al uso de tejido hematopoyético primario como la médula ósea, la sangre periférica o la sangre de cordón umbilical como población inicial. (Kaufman, 2001)

La diferenciación *in vitro* de las células madre embrionarias puede tener importantes implicaciones terapéuticas, incluyendo la derivación de eritrocitos y plaquetas para transfusiones y de células madre hematopoyéticas para trasplante. Como éstas pueden expandirse sin límite aparente, los productos derivados de ellas podrían ser creados en grandes cantidades. Las células madre hematopoyéticas de origen embrionario podrían incrementar la disponibilidad y efectividad del trasplante. Trabajos recientes realizados en ratones sugieren que estas células permiten regeneración a largo plazo de la hematopoyesis incluso en el trasplante alogénico. (Kaufman, 2001)

Las células progenitoras hematopoyéticas circulantes en sangre fetal pueden ser el blanco para terapia génica intrauterina en desórdenes hereditarios hematopoyéticos y metabólicos, y podrían permitir el desarrollo de técnicas diagnósticas no invasivas prenatales, por medio de la expansión de progenitores hematopoyéticos fetales presentes en sangre materna. Además, se está estudiando la posibilidad de utilizarlas como fuente de células para trasplante. (Campagnoli, 2000)

La fuente de células madre que más se ha utilizado es la sangre periférica, por medio de la movilización, es decir, el proceso por el cual se da la migración de estas células desde la médula ósea hasta el torrente sanguíneo.

### **Movilización de células madre**

El primer estudio preclínico al respecto fue publicado en 1973 por *Fliedner et al* y fue un modelo terapéutico del uso de células madre sanguíneas en el tratamiento del fallo medular inducido por radiación (Gee, 1997); sin embargo, como ya se mencionó, la existencia de esas células ya había sido propuesta en 1909 por Maximov.

La recolección de células madre por centrifugación de flujo continuo fue realizada por primera vez en voluntarios humanos a finales de los setenta por *Korbling et al*, y ya para 1986 aparecieron en la literatura seis estudios independientes en los cuales se utilizaron células madre sanguíneas para trasplante. (Gee, 1997)

Las primeras recolecciones de células pluripotentes sanguíneas fueron realizadas durante el estado estacionario de hematopoyesis, con el resultado de que eran necesarias muchas aféresis para llegar al número de células requeridas. Esto hizo el procedimiento costoso y cansado tanto para el paciente como para el personal, se requirió congelación y

almacenamiento en cada recolección y por lo tanto un gran volumen de injerto. Esta situación cambió con el uso de quimioterapia y/o factores de crecimiento para movilizar las células madre de la médula ósea a la circulación, reduciendo el número de recolecciones y el volumen del injerto final. Esto trajo como consecuencia un gran incremento en el uso de este tipo de trasplante, el cual empezó solamente como autólogo pero se ha extendido su uso hacia el trasplante alogénico. (Gee, 1997)

En humanos, el proceso de movilización se notó inicialmente durante la recuperación después de terapia mielosupresiva. La capacidad de los factores de crecimiento para movilizar células madre, ya sea solos o en combinación con quimioterapia, incrementó la utilización de estas células para trasplante. Sin embargo, se conoce poco acerca del mecanismo de movilización de células malignas o no malignas y el diseño de protocolos de movilización permanece empírico. (To, 1997)

#### *El fenómeno de movilización*

La creencia general es que las células madre movilizadas se originan de la médula ósea. Este postulado predice una secuencia de eventos durante la movilización: primero, la modulación de la interacción entre la célula madre y el estroma medular, luego la migración a través de los sinusoides medulares y el egreso a través de la membrana basal y la capa endotelial. (To, 1997)

La localización de la hematopoyesis en la médula ósea implica interacciones adhesivas entre las células hematopoyéticas primitivas y el estroma medular (microambiente hematopoyético). Este hecho dio pie a muchos investigadores para proponer que la movilización involucra una perturbación de las interacciones adhesivas con los elementos estromales, los cuales bajo condiciones estacionarias son responsables de la retención fisiológica de las células hematopoyéticas primitivas en la médula ósea. Las células primitivas exhiben un amplio rango de moléculas de adhesión celular, incluyendo

miembros de las superfamilias de las integrinas, selectinas, inmunoglobulinas y de la familia de moléculas de adhesión CD44. Los ligandos de muchas de esas moléculas de adhesión son expresados por las células estromales de la médula ósea. (To, 1997)

Estudios recientes han sugerido una contribución importante al alojamiento y retención de las células madre en la médula ósea por la  $\beta$  1 integrina VLA-4, con sus ligandos fibronectina y VCAM-1. Notablemente, la perturbación de la función de VLA-4 después de la administración de un anticuerpo anti-VLA-4 en primates, resulta en la inducción de la movilización de células madre hacia el torrente sanguíneo. En otros estudios se demostró que células CD34+ movilizadas mediante varias combinaciones de citoquinas tienen una expresión reducida de ciertas moléculas de adhesión, en particular VLA-4, LFA-1 y LFA-3. Las células CD34+ durante estado estacionario de la médula ósea expresan las integrinas VLA-4 y VLA-5 en un estado inactivo o de muy baja afinidad. Después del tratamiento con varias citoquinas, incluyendo IL-3, GM-CSF y SCF, las células CD34+ exhiben un incremento transitorio en las propiedades de unión de VLA-4 y VLA-5. Todos estos datos sugieren que el desplazamiento de células progenitoras hematopoyéticas es el resultado de cambios inducidos por citoquinas en la función de integrinas de la célula CD34+ que facilita su egreso de la médula ósea. Los factores que modulan la migración directamente no han sido definidos. (To,1997)

La mayoría de los estudios que investigan estos mecanismos han sido enfocados en los cambios de las células madre, pero pocos han investigado la contribución del estroma medular a este fenómeno. Daños al estroma causados por exposición previa a quimioterapia podrían explicar los pobres resultados en la movilización en algunos pacientes y en modelos murinos. (To, 1997)

El entendimiento de este proceso puede contribuir al desarrollo de protocolos de movilización más eficaces y predecibles con implicaciones clínicas relevantes. En



particular, la elucidación de los eventos moleculares y bioquímicos relacionados con el desprendimiento y migración pueden permitirnos el movilizar células más directamente. Cambios en la función de integrinas y selectinas también han sido descritos en el tráfico de células tumorales, así, podría ser posible desarrollar protocolos que favorezcan la migración de células normales y reduzcan el riesgo de contaminación por células malignas. (To, 1997)

### *Protocolos de movilización*

Actualmente, existen tres formas de movilizar las células madre hacia la circulación: utilización de quimioterapia mielosupresiva, factores de crecimiento, o una combinación de factores de crecimiento y quimioterapia.

#### Quimioterapia mielosupresiva

La quimioterapia mielosupresiva fue el primer protocolo clínicamente útil. Durante la fase de recuperación después de quimioterapia mielosupresiva, ocurre un incremento de 50 veces en las CFU-GM circulantes. La droga de utilización más común es la ciclofosfamida en altas dosis, porque es activa contra muchos tipos de tumores. (To, 1997)

Las limitaciones principales de la quimioterapia son la sepsis neutropénica, diatesis y la imposibilidad de predecir el tiempo óptimo para hacer la aféresis. Con el advenimiento de los factores de crecimiento hematopoyéticos, ya no es necesaria la utilización de quimioterapia solamente para incrementar la circulación de células madre. (To, 1997)

#### Quimioterapia mielosupresiva + Factores de Crecimiento Hematopoyéticos

La adición de factores de crecimiento hematopoyéticos como G-CSF o GM-CSF a la quimioterapia mielosupresiva, incrementa la movilización mientras que reduce la mielotoxicidad. En la literatura se reporta el uso de diversos ensayos biológicos:

G-CSF: En numerosos estudios clínicos de fase II se ha reportado la eficacia de la utilización de esta citoquina en combinación con la quimioterapia, lo que da como resultado reducción de la hospitalización en pacientes con diferentes tumores malignos. La dosis utilizada con quimioterapia es de 3 a 6  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  y usualmente se inicia el día después de que comienza la quimioterapia y continúa hasta que se completa la leucoaféresis. (To, 1997)

GM-CSF con IL-3: GM-CSF fue la primera citoquina utilizada para incrementar la movilización dada por la quimioterapia. Aunque su eficacia es comparable con G-CSF, es menos utilizada probablemente por sus efectos colaterales como fiebre e hipoxemia. La dosis usual es de 5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ , dosis mayores están asociadas con efectos secundarios mayores. El inicio de GM-CSF cinco días después de la quimioterapia es igual de efectivo que un día después, pero el inicio en el séptimo día después de la quimioterapia es menos efectivo. Un protocolo con IL-3 en secuencia con GM-CSF da mejores resultados que el uso de GM-CSF solamente después de la quimioterapia o la quimioterapia sola. (To, 1997)

### Factores de crecimiento

Otra forma de movilizar células madre es utilizando factores de crecimiento como el G-CSF, GM-CSF y SCF.

G-CSF: estimula la granulopoyesis de neutrófilos en una forma dependiente de la dosis e incrementa el nivel de células progenitoras sanguíneas en pacientes con cáncer. El nivel de células madre se incrementa de 40 a 80 veces después de cuatro a cinco días de tratamiento. Cuando el tratamiento cesa, los niveles de células regresan a los niveles basales en cuatro a seis días. Transplantes singénicos en ratones han demostrado que células sanguíneas movilizadas con G-CSF tienen un número sustancial de células madre primitivas capaces de reconstituir la hematopoyesis a largo plazo y de repoblar el timo. En humanos, las

células CD34+ movilizadas con G-CSF son capaces de generar CFU-GM en cultivo líquido por tres o más semanas. Los efectos colaterales de G-CSF son pocos. Los efectos más comunes son dolor óseo y elevación asintomática de la fosfatasa alcalina sérica y gamma glutamil transferasa. (To, 1997)

Actualmente están disponibles dos formas comerciales de G-CSF. El filgrastim es la forma no glicosilada producida en *Escherichia coli*, mientras que la lenograstim es la forma glicosilada producida en células de ovario de hámster chino. La lenograstim ha demostrado ser más activa que la filgrastim en ensayos de médula ósea in vitro, aunque ambas son equivalentes en ensayos inmunológicos. (To,1997)

G-CSF/SCF: SCF tiene sólo un efecto modesto en la proliferación de células hematopoyéticas *in vitro* pero ejerce efectos potenciadores con factores de crecimiento hematopoyéticos que actúan directamente. (To,1997)

El uso clínico de SCF + G-CSF para la movilización ha demostrado sinergismo en experimentos en animales como ratones, además de que se ha observado también en pacientes con quimioterapia previa. La administración de SCF ha producido ocasionalmente reacciones anafilácticas. (To,1997)

GM-CSF: en varios estudios se ha demostrado que este factor es menos efectivo que G-CSF en cuanto a la movilización de células, por lo que su utilización no es muy frecuente.

IL-3: tiene un efecto proliferativo en células hematopoyéticas, pero tiene poca actividad en movilización ya que los efectos secundarios limitan su dosis a un nivel que es poco efectivo para este propósito. (To, 1997)

## **Recolección de células madre**

### *Preparación del donador*

Tradicionalmente, la aféresis comienza cuando el conteo de leucocitos es aproximadamente  $10^9$ /litro, pero se prefiere retrasarla hasta que el conteo alcance más de  $2 \times 10^9$ /litro. Alternativamente, algunos centros monitorean la concentración de células CD34+ en la circulación e inician la aféresis cuando el conteo es mayor de  $15 \text{ CD34+}/\mu\text{l}$ . (Gee, 1997)

Varias organizaciones han desarrollado lineamientos y estándares para la evaluación de donadores para trasplante de células madre sanguíneas (TCMS). El siguiente es un resumen de los estándares desarrollados por la Fundación para la Acreditación de Terapia de Células Madre:

- Debe haber una evaluación documentada de historia médica, examen físico y de laboratorio, en cuanto a los riesgos de la donación por aféresis.
- Antes de cada procedimiento de recolección debe hacerse una evaluación de la salud completa.
- Debe hacerse un conteo de las células sanguíneas completo 72 horas antes de la primera recolección y 24 horas antes de cada aféresis siguiente.
- Para donaciones alogénicas, debe ser obtenida la historia médica y deben hacerse una evaluación física completa y exámenes de laboratorio ( tipo de HLA-A, -B o -DR, grupo ABO y factor Rh, pruebas para anti-HIV-1, anti-HIV-2, HIV-1 Ag, anti-HTLV, HBsAg, anti-HBc, anti-HBc y anti-CMV, y una prueba serológica para sífilis)
- Se requiere un consentimiento informado antes de comenzar con la quimioterapia a altas dosis, y el procedimiento debe ser explicado de forma que el donador pueda entender.

- La administración de factor de crecimiento debe hacerse bajo la supervisión de un médico especializado en el manejo de personas que reciben estos agentes.
- Catéteres venosos centrales deben ser colocados por un médico calificado para este procedimiento, y la colocación adecuada debe ser documentada radiográficamente. (Gee, 1997)

Rutinariamente se utiliza anticoagulación con ACD-A (anticoagulante-citrato-dextrosa fórmula A) durante la recolección, también se usa heparina para pacientes alérgicos al citrato. El mayor efecto colateral asociado al uso de ACD-A es la hipocalcemia, la cual puede ser prevenida por administración oral de leche o citrato de calcio. Si los síntomas aparecen durante la recolección debe administrarse gluconato de calcio durante 5-10 minutos. Los signos vitales así como el conteo de plaquetas y hematocrito, deben ser monitoreados cada 30 minutos durante la recolección y deben observarse los síntomas de hipocalcemia. (Gee, 1997)

### *Recolección*

La recolección es automática, conectando al donador en una máquina de aféresis, con el fin de realizar un procedimiento de leucoaféresis modificado. Aunque hay una gran variedad de máquinas para esto, todas funcionan bajo el mismo principio. La sangre se drena del donador, se anticoagula y se bombea hacia una cámara giratoria. Allí la sangre se separa en sus componentes con base en el tamaño celular y la densidad, formando distintas capas. La capa rica en leucocitos se deposita en un recipiente recolector y los demás elementos regresan al paciente. Este procedimiento puede ser realizado de forma continua o discontinua y se mantiene hasta que el volumen requerido de sangre es procesado. En la mayoría de los casos se procesan dos o tres volúmenes de sangre (10-12 litros) durante 3-4 horas. (Stroncek, 1999)

La leucoaféresis se repite en los días siguientes hasta que se haya recolectado el número necesario de células. La experiencia indica que la dosis óptima de células es de  $1-2 \times 10^8$  células nucleadas por kilogramo de peso corporal del paciente. Si el producto se va a manipular *ex vivo*, se requiere una concentración de células dos o tres veces mayor para compensar las pérdidas. (Gee, 1997)

Se han utilizado tres parámetros para medir la eficiencia de la recolección: total de células nucleadas, ensayos de formación de colonias y células CD34+ totales y subpoblaciones. El parámetro que más se utiliza es el número total de células CD34+ recolectadas. Sin embargo, hay una gran variabilidad entre laboratorios en el conteo de CD34+, principalmente dada por la elección del anticuerpo monoclonal anti-CD34, del conjugado, del análisis de citometría de flujo y del denominador usado. También hay que tomar en cuenta que la población de células CD34+ es heterogénea, y que contiene tanto progenitores como células madre pluripotentes y este fenotipo puede ser afectado por el tipo de movilización usado y la terapia anterior que haya tenido el paciente. (Gee, 1997)

Por estos aspectos el criterio utilizado entonces es el número de células nucleadas ( $2-6 \times 10^8$ ) y el número de células CD34+ ( $1-3 \times 10^6$ ). (Gee, 1997)

#### *Complicaciones asociadas a la recolección*

El número de complicaciones ha bajado conforme el procedimiento se ha hecho más eficiente y el número de aféresis por paciente ha disminuido.

Como ya se mencionó, la toxicidad del citrato puede ser un problema, pero usualmente es fácilmente prevenida y controlada. Otra complicación es la hipovolemia, la cual se puede evitar interrumpiendo el procedimiento o disminuyendo la tasa de flujo. Algunas veces se presenta trombocitopenia como resultado de la adherencia de la plaquetas a la superficie del equipo. (Gee, 1997)

En una revisión de 554 recolecciones en 75 pacientes, entre 1990 y 1994, *Golberg et al* describieron complicaciones asociadas al catéter en 15,9% de los procedimientos. Anemia o trombocitopenia que requirieron transfusión se observó en un 30,7% y 14,7% de los casos, respectivamente. (Gee, 1997)

#### *Estandarización de la medición de células progenitoras*

La citometría de flujo ha sido ampliamente utilizada para enumerar las células CD34+, aunque no hay un consenso acerca de que ese sea el mejor método para este propósito. Es importante considerar que una subpoblación de células movilizadas, definida inmunofenotípicamente, no necesariamente tiene las mismas propiedades funcionales que su contraparte de médula ósea. El ensayo de CFU-GM ha sido utilizado para enumerar células progenitoras y para probar la viabilidad de células criopreservadas, sin embargo, no provee información directa sobre las células progenitoras primitivas. Estos ensayos son los dos índices de reconstitución hematopoyética más utilizados, pero la estandarización de estos métodos no se ha establecido. (Gee, 1997)

Hay una serie de variantes críticas para la estandarización del conteo de células CD34+. Primero, el método de procesamiento de la muestra influencia el grado de contaminación por detritos celulares y eritrocitos. Segundo, el anticuerpo anti-CD34 y el fluorocromo utilizado influencia la sensibilidad y especificidad. Tercero, el denominador utilizado para el cálculo del número de células CD34+ es crítico en el establecimiento de la incidencia de células CD34+ relacionada a otros leucocitos. (To, 1997)

El establecimiento de un rango de referencia basado en individuos sanos podría proporcionar una medida para comparar los datos de diferentes laboratorios y/o diferentes métodos para enumerar CFU-GM o células CD34+ y así poder establecer la validez de un determinado método de movilización de células sanguíneas. (To, 1997)

## **Procesamiento de las células**

### *Procesamiento de rutina*

Las condiciones óptimas de almacenamiento no han sido rigurosamente establecidas, sin embargo, parece que las células se mantienen adecuadamente a 4 °C con la concentración mantenida debajo de  $5 \times 10^7$ /mL y el pH menor a 7. (Gee, 1997)

El control de calidad requiere que cada producto sea probado por esterilidad, composición celular cualitativa y cuantitativa y contenido de células progenitoras. Los ensayos de formación de colonias se pueden utilizar también para evaluar viabilidad y actividad funcional de las células midiendo su habilidad para proliferar. Ensayos de viabilidad por exclusión de tinciones proveen información acerca de la integridad de la membrana, pero no del potencial proliferativo. (Gee, 1997)

### *Procesamiento extensivo*

Las células madre sanguíneas pueden ser manipuladas de varias maneras. Las células tumorales en el producto para trasplante autólogo pueden ser disminuidas con el fin de aminorar la probabilidad de una recaída, ya que se ha demostrado en varios estudios que el uso de productos “purgados” de células tumorales está asociado con una mayor supervivencia del paciente. Estas células se pueden disminuir activamente (selección negativa) o enriqueciendo específicamente la población de células CD34+ (selección positiva). La selección negativa puede disminuir las células tumorales muy eficientemente, sin embargo, el procedimiento es relativamente caro, puede haber pérdida significativa de células nucleadas y la mayoría de procedimientos son largos y deben ser repetidos con cada producto. (Gee, 1997)



El enriquecimiento de células CD34+ es una alternativa atractiva, y hay varios sistemas disponibles en el mercado que usualmente son automatizados y relativamente rápidos. Los resultados obtenidos son variables y además ha habido reportes de que ciertas células tumorales pueden tener el antígeno CD34+ y podrían copurificarse con la población de células madre. (Gee, 1997)

Estas células madre pueden ser infundidas directamente, expandidas o diferenciadas *ex vivo*, o ser utilizadas como blanco para terapia génica. (Gee, 1997)

En el caso del trasplante alogénico, pueden disminuirse las células T como profilaxis contra la Enfermedad Injerto versus Huésped (EIVH). (Gee, 1997)

### **Criopreservación y almacenamiento**

Requiere la adición de un agente crioprotector para mantener la integridad celular, además de una transición de temperatura controlada hacia la temperatura final de almacenamiento.

#### *Método de DMSO y congelación programada*

En este método, se utiliza dimetil sulfóxido (DMSO) solo como crioprotector y las células se congelan utilizando un congelador de tasa de enfriamiento programable. Las células se suspenden en plasma autólogo o en soluciones salinas fisiológicas que contengan proteínas plasmáticas a una concentración final desde  $3 \times 10^7$ /ml hasta  $8 \times 10^8$ /ml. Se depositan alícuotas en bolsas de congelación a un volumen que no exceda la mitad de la capacidad recomendada de la bolsa. A esta suspensión se la añade lentamente, mezclando, solución salina fisiológica con 20% v/v de DMSO. Las bolsas se sellan con calor y se colocan rápidamente en latas para protegerlas durante la congelación y almacenamiento.

Las latas son congeladas a  $-1$  °C/minuto hasta  $-50$  °C y luego a  $-5$  °C/minuto hasta  $-90$ °C, punto en el cual son transferidos a nitrógeno líquido para almacenamiento a largo plazo. (Stroncek, 1999)

#### *Método de DMSO, hidroxietil y congelación no controlada*

En esta segunda técnica, la concentración final de DMSO es de 5 %v/v y se añade 6% v/v de hidroxietil. La suspensión se divide en bolsas de congelación, las cuales se colocan horizontalmente en un congelador a  $-80$ °C para la congelación y almacenamiento. (Stroncek, 1999)

#### **Descongelación y reinfusión**

El descongelamiento usualmente es llevado a cabo rápidamente por inmersión del producto congelado en un baño a  $37$  °C. En este paso hay que tener cuidado de que el baño esté siempre escrupulosamente limpio y el agua que se utilice sea estéril para prevenir la contaminación. (Gee, 1997)

Una vez que el productos ha sido descongelado, se infunde rápidamente mediante un equipo de administración de sangre. Se debe utilizar un filtro de sangre para remover microagregados. Deben tomarse muestras para control de calidad directamente de las bolsas descongeladas. (Gee, 1997)

Antes de la infusión del producto descongelado, el paciente debe hidratarse y medicarse con antihistamínicos para reducir el riesgo de colapso vascular e hipotensión producto de la liberación de histamina inducida por el DMSO. Aunque las reacciones al DMSO son infrecuentes, han sido reportadas, en un rango de efectos desde

cardiovasculares (bradicardia e hipertensión) y encefalopatía hasta muerte súbita. Otros efectos son comunes como el dolor de cabeza, náuseas, vómito y hematuria. (Gee, 1997)

En el caso de infusión de volúmenes grandes, es necesario hacer la infusión en varios días o lavar las células antes de infundirlas para remover el crioprotector y detritos celulares, lo cual puede llevar a pérdidas importantes de células. (Gee, 1997)

## **Utilización del trasplante de células madre sanguíneas**

El trasplante autólogo de células madre ha sido aplicado con varios grados de éxito en leucemia granulocítica crónica, leucemia aguda, síndromes mielodisplásicos, mieloma múltiple y linfoma no Hodgkin. (Cutler, 2001)

En el caso de la leucemia aguda, el trasplante se recomienda en pacientes con características citogenéticas de alto riesgo en primera remisión, pacientes con enfermedad resistente o refractaria y pacientes en segunda remisión. En leucemia granulocítica crónica en fase estable, el trasplante alogénico actualmente es la terapia de elección, ya que es la única terapia con potencial curativo. (Cutler, 2001).

El trasplante de médula ósea autólogo para mieloma múltiple ha demostrado ser superior comparado con la quimioterapia tradicional ofreciendo ventajas en cuanto a remisión y tiempo de supervivencia. Sin embargo, estos trasplantes frecuentemente se contaminan con células tumorales residuales. Este riesgo de contaminación ha impulsado el estudio de la utilización de células madre sanguíneas como una alternativa; así, se han realizado diversos ensayos clínicos con humanos en los cuales se han obtenido buenos resultados en cuanto a remisión. (Cutler, 2001)

Actualmente, el trasplante alogénico es la única terapia con potencial curativo para síndromes mielodisplásicos. Los pacientes con anomalías genéticas menores, menor periodo de latencia desde el diagnóstico y pacientes con anemia refractaria o anemia refractaria con sideroblastos en anillo tienen mejores resultados después del trasplante. El momento óptimo para realizar el trasplante de células madre todavía no se conoce para estas enfermedades. La experiencia en el trasplante para estas enfermedades es más limitada que en el caso de leucemia aguda y crónica. Los pacientes con síndromes mielodisplásicos comprenden una porción mínima en estudios donde se comparan los

transplantes , por lo que no se puede concluir nada sobre las ventajas o desventajas de la utilización de esta terapia. (Cutler, 2001)

En el linfoma no Hodgkin, el trasplante autólogo tiene ventajas en cuanto a supervivencia con respecto a la quimioterapia. Este trasplante ha sido utilizado en pacientes con fracaso de trasplantes de médula ósea o enfermedad refractaria con alto éxito en cuanto a remisión completa de la enfermedad. (Cutler, 2001)

El trasplante de células madre sanguíneas ofrece una serie de ventajas sobre el de médula ósea:

- Se pueden tratar pacientes de mayor edad y más enfermedades con este tipo de trasplante (To, 1997)
- La recuperación hematológica e inmune ocurre en menor tiempo, lo que puede disminuir el periodo de vulnerabilidad a infecciones y otras complicaciones y la duración de la hospitalización en los receptores, con lo que se disminuyen los costos. (Korbling, 1996)
- El procedimiento de recolección conlleva menos riesgos ya que no requiere anestesia general, hay menor riesgo de sangrado, infección o daños a nervios, además tiene menos inconvenientes para el donador , ya que la aspiración de médula es más dolorosa y la recuperación tarda de 2 a 4 semanas. (Korbling, 1996)
- El trasplante tiene un mayor número de células CD34+ y linfoides. (Korbling, 1996)
- El donador está disponibles para recolecciones adicionales, además de que hay mayor número de posibles donadores que en de médula ósea. (Korbling, 1996)
- Hay menor mortalidad relacionada al trasplante. (Korbling, 1996)

Sin embargo, esta fuente de células madre para trasplante también tiene desventajas al compararla con la médula ósea:

- La recolección requiere acceso vascular.
- Los efectos adversos del tratamiento con citoquinas.
- Pueden ser necesarias múltiples recolecciones de células, a diferencia de la médula ósea donde se realiza una única recolección.
- El producto de aféresis tiene un volumen mayor, lo cual puede dificultar el procesamiento para disminuir las células tumorales o los linfocitos T. (Korbling, 1996)
- Mayor incidencia de enfermedad de injerto versus huésped crónica, probablemente debido al mayor número de linfocitos T que se transplantan. (Korbling, 1996)

### *Experiencia en Costa Rica*

En nuestro país, el trasplante de células madre sanguíneas se utiliza en el Hospital San Juan de Dios (HSJD) y en el Hospital México (HM).

En el HSJD el primer trasplante se realizó en el año 2000 y ya se han realizado seis autotransplantes. El diagnóstico de todos los pacientes tratados fue linfoma no Hodgkin. De éstos, dos han fallecido, uno por causas relacionadas al trasplante en sí. En cuanto a los pacientes que viven, dos de ellos han tenido una evolución poco satisfactoria, con varias recaídas y un pobre estado de salud. Los otros dos pacientes han evolucionado satisfactoriamente; uno tuvo una recaída, se recuperó y actualmente está en remisión y el otro, que fue sometido al trasplante recientemente, hasta el momento se considera que ha sido un éxito. (Agüero, comunicación personal)

En el HM, el Programa de Trasplantes de Células Madre Hematopoyéticas inició en el año 1998; se han realizado 26 trasplantes a 19 pacientes con diagnósticos como

leucemia aguda y crónica, mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, anemia aplásica y tumores germinales. (Buján, comunicación personal)

De estos 19 pacientes transplantados, once han fallecido, cuatro de ellos por recaídas de la enfermedad inicial; los ocho pacientes que todavía viven tienen un estado de salud favorable y por el momento se considera que el transplante ha tenido muy buen resultado. (Buján, comunicación personal)

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agüero, O. *Utilización del trasplante de células madre en el Hospital San Juan de Dios*. San José, Costa Rica: 10 de julio, 2002. (Comunicación personal)
2. Broudy, V. Stem Cell Factor and Hematopoiesis. *Blood* 1997; 90:1345-1364
3. Buján, B. *Utilización del trasplante de células madre en el Hospital México*. San José, Costa Rica: 16 de julio, 2002. (Comunicación personal)
4. Cairo, M; Wagner, J. Placental and/or Umbilical Cord Blood: An Alternative Source of Hematopoietic Stem Cells for Transplantation. *Blood* 1997, 90: 4665-4678
5. Campagnoli, C; Fisk, N; Overton, T; Bennett, P; Watts, T; Roberts, I. Circulating hematopoietic progenitor cells in first trimester fetal blood. *Blood* 2000, 95: 1967-1972
6. Cutler, C; Antin, J. Peripheral Blood Stem Cells for Allogeneic Transplantation: a Review. *Stem cells* 2001; 19: 108-119
7. Dexter T.M. *Haematopoietic Growth Factors, review of biology and clinical potential*. Gardiner-Caldwell Communications Ltd, United Kingdom, 1993.
8. Eder, M; Geissler, G; Ganser, A. IL-3 in the clinic. *Stem Cells* 1997; 15: 327-333
9. Fliedner, T. Prologue to characteristics and potentials of blood stem cells. *Stem Cells* 1998; 16: 357-360.



10. Fliedner, T. The role of blood stem cells in hematopoietic cell renewal. *Stem Cells* 1998; 16: 361-374.
11. Gee, A. Collection and processing of peripheral blood hematopoietic progenitor cells. En: *Blood Stem Cell Transplantation*. Isis Medical Media, England, 1997. pp 55-71
12. Kaufman, D; Hanson, E; Lewis, R; Auerbach, R; Thomson, J. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001, 98: 10716-10721
13. Korbling, Martin; Champlin, Richard. Peripheral Blood Progenitor Cell Transplantation: A Replacement for Marrow Auto or Allografts. *Stem Cells*. 1996; 14: 185-195.
14. Malaspina, H; Zala, N. Factores estimulantes de la mielopoiesis. En: *Enciclopedia Iberoamericana de Hematología*. Volumen II. 1era edición. Ediciones Universidad de Salamanca.. Salamanca, España. 1992. pp 88-101.
15. Metcalf, D. Hematopoietic Regulators: Redundancy or Subtlety?. *Blood* 1993; 82: 3515-3523
16. Ogawa, M. Differentiation and Proliferation of Hematopoietic Stem Cells. *Blood* 1993; 81: 2844-2853
17. Socolovsky, M; Ladisch, H; Daley, G. Control of Hematopoietic Differentiation: Lack of Specificity in signaling by Cytokine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998; 95: 6573-657

18. Stroncek, D; Clay, M; McCullough, J. *Efficient Mobilization and Collection of Peripheral Blood Stem Cells from Normal Donors for Allogeneic Transplantation, The University of Minnesota Experience*. Baxter Biotech. Minnesota, EEUU, 1999. pp 1-12
19. Testa, N; Cañizo, C. Hematopoyesis: Regulación y micromedio ambiente. En: *Enciclopedia Iberoamericana de Hematología*. Volumen II. 1era edición. Ediciones Universidad de Salamanca. Salamanca, España. 1992. pp 35-43.
20. Testa, N; Coutinho, L; Radford, J; Will, A.. *Hemopoietic Growth Factors and Mononuclear Fagocytes*. Karger, Basel, Switzerland, 1993.
21. To, L; Haylock, D; Simmons, P; Juttner, C. The Biology and Clinical Uses of Blood Stem Cells. *Blood*, 1997 89: 2233-2258