

00551

8



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO ^{2ej}

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

"CULTIVO Y EXPANSION *IN VITRO* DE CELULAS
HEMATOPOYETICAS HUMANAS DE SANGRE DE
CORDON UMBILICAL"

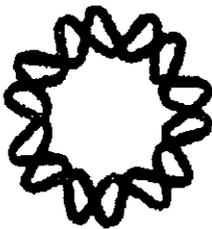
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

PRESENTA

I.Q. EDITH LOPEZ CHALINI



CUERNAVACA, MOR.

273018

JULIO, 1° 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

P

AGINACION

D

ISCONTINUA

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Octavio T. Ramírez y la co-asesoría del Dr. Héctor Mayani. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto 102-PM y de la beca 93824, y de DGAPA-UNAM proyecto IN119398.

A mi hijo Iván, por la vida que me brinda con cada una de sus sonrisas.

A mis padres: Cristina y Leopoldo por su amor y apoyo incondicional.

A Ros, por estar junto a mí en la alegría y en la adversidad.

A Julia, mi abuela, por su ejemplo de fortaleza y persistencia.

A Lety, Soco, Magy, Rodolfo, y las familias Chalini y Romero.

Reconocimientos:

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez por recibirme en su grupo, su apoyo y sus invaluable enseñanzas.

Al Dr. Héctor Mayani por su apoyo en la realización de este proyecto.

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios:

Dr. O. Tonatiuh Ramírez Reivich

Dr. Héctor Mayani Viveros

Dra. Ma. Luisa Villarreal

Dr. Rafael Vázquez

Dr. Gustavo Pedraza

Al personal de la unidad de ginecoobstetricia del Hospital Regional 1, IMSS de la Ciudad de Cuernavaca, por su colaboración altruista.

A Probiomed, S. A. de C. V.

A Nancy por su paciencia y ayuda invaluable en el desarrollo de este trabajo.

A quienes compartieron conmigo las alegrías y vicisitudes de este proyecto: Antonio y Claudia.

A quienes me recuerdan el valor de la amistad, en especial a: Angélica (Abeja), Claus, Toño, Paco, Laus, Lili, Gabito, Hilda, Miri, Poncho, Rocha y Vera.

A mis amigos y compañeros de los grupos OTR-Galindo, del grupo de hematopoyesis del U.I.M.E.O., y de Probiomed.

INDICE GENERAL

		Página
	INDICE DE FIGURAS	v
	INDICE DE TABLAS	viii
	SIGLAS Y NOMENCLATURA GENERAL	ix
	RESUMEN	1
1.	INTRODUCCION	3
2.	ANTECEDENTES	5
2.1	Aspectos Generales	5
2.1.1	Hematopoyesis	5
2.1.2	Células sanguíneas	5
2.1.3	Célula seminal	8
2.1.4	Progenitores hematopoyéticos	10
2.1.5	Microambiente hematopoyético	11
2.1.6	Interleucinas y factores de crecimiento	11
2.1.7	Transplante de médula ósea	14
2.1.8	Transplante de sangre de cordón umbilical	17
2.2	Aspectos particulares en el cultivo de células hematopoyéticas	18
2.2.1	Cultivos a Largo Plazo	18
2.2.2	Cultivos con células seleccionadas	21
2.2.3	Cultivos en bioreactores	22
2.2.3.1	Cultivos en perfusión	22
2.2.3.2	Cultivos agitados	24
2.2.4	Metabolitos tóxicos: amonio y lactato	27
2.2.5	Fuente de carbono: glutamina y glucosa	28
2.2.6	Suero fetal bovino	29

3.	OBJETIVOS	31
4.	MATERIALES Y METODOS	32
4.1	Recolección de la muestra	32
4.2	Procesamiento de la muestra	32
4.3	Medio de cultivo	34
4.4	Enriquecimiento de medios	35
4.5	Criopreservación celular	36
4.6	Descongelación celular	36
4.7	Determinación de progenitores hematopoyéticos	36
4.7.1	Ensayos clonogénicos	36
4.7.2	Identificación y cuantificación de progenitores	37
4.8	Cultivos a Largo Plazo	39
4.9	Cultivos a Largo Plazo con adición de citocinas	40
4.10	Cultivos Lote	40
4.11	Métodos analíticos	40
4.11.1	Determinación de la concentración celular	40
4.11.2	Determinación de glucosa, lactato, glutamina y glutamato	41
4.11.3	Determinación de amonio	41
4.11.4	Determinación de aminoácidos	41
4.12	Consideraciones matemáticas	41
4.12.1	Determinación de la velocidad específica de crecimiento y de muerte aparentes	42
4.12.2	Expansión celular	42
4.12.3	Expansión de progenitores	42
4.12.4	Consumo o producción volumétricos de glucosa o lactato	42
4.12.5	Consumo o producción específicos de glucosa o lactato	43

4.12.6	Consumo o producción específicos de glucosa o lactato de células adherentes	43
4.12.7	Rendimiento de lactato con respecto a glucosa	44
5	RESULTADOS Y DISCUSION	48
5.1	Establecimiento de técnicas de recolección y procesamiento de muestras de sangre de cordón umbilical	48
5.1.1	Recolección de las muestras	48
5.1.3	Características de las células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical	50
5.1.2	Características de las muestras	49
5.2	Cultivos a Largo Plazo	53
5.3	Evaluación de factores de crecimiento en cultivos a Largo Plazo	63
5.4	Cultivos lote	68
5.4.1	Cultivos lote sin adición de citocinas	68
5.4.2	Cultivos lote con adición de citocinas	72
5.4.3	Efecto del suero fetal bovino	78
5.4.4	Efecto de la concentración inicial de glucosa	81
5.4.5	Efecto de la concentración inicial de glutamina y del inóculo	83
5.4.6	Efecto tóxico del amonio.	91
6	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	96
7	REFERENCIAS	98
8	APENDICES	
	Apéndice A. Formulación de los medios IMDM (Sigma I-7633) y DMEM (Sigma D-5030)	106
	Apéndice B	107
	Apéndice C. Cinéticas de cultivos lote.	
	C1. Cultivos Lote, medio IMDM.	108

C2. Cultivos Lote, medio LT BMC.	109
Apéndice D. Artículo: Mayani, H., Gutiérrez-Rodríguez, M., Espinoza, L., López-Chalini, E., Huerta-Zepeda, A., Flores, E., Sánchez-Valle, E., Luna-Bautista, F., Valencia, I., Ramírez, O. T. (1998). "Kinetics of hematopoiesis in Dexter-type Long-Term cultures established from human umbilical cord blood cells". <i>Stem Cells</i> , 16:127-135.	110

INDICE DE FIGURAS

	Página	
Fig. 1	Esquema de la Hematopoyesis.	6
Fig. 2	Momento previo a la toma de muestra.	33
Fig. 3	Gradiente de Ficoll.	34
Fig. 4	Unidad Formadora de Colonias Multipotentes (UFC-Mix).	45
Fig. 5	Unidad Formadora de Colonias Granulocíticas-Monocíticas (UFC-GM).	45
Fig. 6	Unidad Formadora de Colonias Eritroides Primitivas (UFB-e) 4X.	46
Fig. 7	Unidad Formadora de Colonias Eritroides Primitivas (UFB-e) 10X.	46
Fig. 8	Unidad Formadora de Colonias Monocíticas (UFC-M).	47
Fig. 9	Unidad Formadora de Colonias Granulocíticas (UFC-G).	47
Fig. 10	Porcentaje de progenitores en muestras de sangre de cordón umbilical, n=23.	51
Fig. 11	Concentración de progenitores en muestras de sangre de cordón umbilical.	52
Fig. 12	Cinética de crecimiento de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical en cultivos a Largo Plazo.	54
Fig. 13	Perfil de la concentración de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical en cultivos a Largo Plazo.	55
Fig. 14	Constante de crecimiento o de muerte aparente, evaluadas entre cada uno de los recambios.	56
Fig. 15	Porcentaje de unidades formadoras de colonias (UFC) en cultivos a Largo Plazo de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical.	60

Fig. 16	Consumo de glucosa y producción de lactato en cultivos a Largo Plazo de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical.	62
Fig. 17	Cinética de crecimiento de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical en cultivos a Largo Plazo con adición de citocinas.	64
Fig. 18	Expansión de progenitores hematopoyéticos suspendidos en cultivos a Largo Plazo de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical con adición de citocinas.	65
Fig. 19	Porcentaje de progenitores suspendidos con respecto a células MN.	66
Fig. 20	Efecto de la adición de Medio Condicionado de Células Gigantes sobre la viabilidad de células suspendidas.	67
Fig. 21	Cultivos lote de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical sin adición de citocinas. Medio IMDM 10% SFB.	69
Fig. 22	Cultivos lote de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical sin adición de citocinas. Medio LT BMC.	70
Fig. 23	Cultivos lote de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical con adición de citocinas. Medio IMDM 10% SFB.	72
Fig. 24	Cultivos lote de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical con adición de citocinas. Medio LT BMC.	74
Fig. 25	Efecto del medio de cultivo sobre la expansión de progenitores hematopoyéticos en cultivos lote con adición de citocinas.	77
Fig. 26	Cinética de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical a diferentes concentraciones de suero fetal bovino.	78
Fig. 27	Efecto del suero fetal bovino en cultivos de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical sobre el incremento celular y la constante de muerte.	79
Fig. 28	Relación entre células totales (nucleadas) y células mononucleadas en cultivos lote a diferentes concentraciones de suero fetal bovino.	80

Fig. 29	Efecto del suero fetal bovino sobre progenitores hematopoyéticos en cultivos lote sin adición de citocinas.	81
Fig. 30	Efecto de la concentración inicial de glucosa sobre diferentes parámetros cinéticos y estequiométricos.	82
Fig. 31	Efecto de la concentración inicial de glutamina sobre el rendimiento y el porcentaje de supervivencia al día 10.	84
Fig. 32	Efecto de la concentración inicial de glutamina sobre la expansión de progenitores hematopoyéticos al día 10.	85
Fig. 33	Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y glutamina y producción de lactato en cultivos lote a diferentes concentraciones iniciales de glutamina.	86
Fig. 34	Efecto de la concentración inicial de glutamina y el inóculo sobre la velocidad específica de crecimiento.	88
Fig. 35	Efecto de la concentración inicial de glutamina y el inóculo sobre la expansión celular.	89
Fig. 36	Expansión de progenitores hematopoyéticos a diferentes concentraciones de glutamina inicial.	90
Fig. 37	Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato y glutamato en cultivos lote a diferentes concentraciones iniciales de amonio.	92
Fig. 38	Efecto de la concentración inicial de amonio sobre la expansión celular en cultivos lote con adición de citocinas.	94
Fig. 39	Efecto de la concentración inicial de amonio sobre la expansión de progenitores hematopoyéticos en cultivos lote con adición de citocinas.	95

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Características generales de las células sanguíneas.	8
Tabla 2.	Componentes del microambiente hematopoyético.	12
Tabla 3.	Factores de crecimiento y citocinas humanas que intervienen en la hematopoyesis del linaje mieloide.	15
Tabla 4.	Datos cinéticos de cultivos de células hematopoyéticas en diferentes sistemas	26
Tabla 5.	Características generales de muestras de sangre de cordón umbilical.	49
Tabla 6.	Porcentaje de células adherentes con respecto al total de células vivas.	57
Tabla 7.	Expansión de células suspendidas en cultivos a Largo Plazo.	57
Tabla 8.	Concentración de progenitores hematopoyéticos (células/ml) de sangre de cordón umbilical en cultivos a Largo Plazo sin adición de citocinas, n=6.	58
Tabla 9.	Relación de células hematopoyéticas en cultivos a Largo Plazo con adición de citocinas con respecto a un control sin citocinas.	63
Tabla 10.	Datos cinéticos y estequimétricos de sange de cordón umbilical en cultivos lote, medios LTBMC e IMDM con adición de citocinas.	76
Tabla 11.	Velocidad específica de crecimiento (d^{-1}) a diferentes concentraciones de glutamina inicial y e inóculo.	87
Tabla 12.	Expansión celular a diferentes concentraciones de glutamina inicial e inóculo.	87
Tabla 13	Consumo y producción de amonio en cultivos lote con adición de citocinas a diferentes concentraciones de amonio.	91
Tabla 14	Datos cinéticos y estequimétricos en cultivos lote con adición de citocinas a diferentes concentraciones de amonio inicial.	93

SIGLAS Y NOMENCLATURA GENERAL

CI-CLP	Células Inicadoras de Cultivos a Largo Plazo
CLP	Cultivos a Largo Plazo
CMN-SXXI	Centro Médico Nacional Siglo XXI
CH	Células Hematopoyéticas
CHH	Células Hematopoyéticas Humanas
EPO	Eritropoyetina
Gln	Glutamina
HRF1	Hospital Regional Familiar 1
IFN- α	Interferón alfa
IFN- β	Interferón beta
IFN- γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
k_d	Velocidad específica de muerte aparente, h^{-1}
μ	Velocidad específica de crecimiento aparente, h^{-1}
MC	Medio Condicionado
ME	Medio MethoCult
MEC	Matriz extracelular
MN	Mononucleares
MO	Médula ósea
MON	Médula ósea normal
PBS	Solución salina de fosfatos
q_{glc}	Consumo específico de glucosa
q_{lac}	Producción específica de lactato
Q_{glc}	Consumo volumétrico de glucosa
Q_{lac}	Producción volumétrica de lactato
SCU	Sangre de Cordón Umbilical
SFB	Suero Fetal Bovino
to	Células totales suspendidas vivas (eritroides y mononucleares).
TPO	Trombopoyetina
UFC	Unidad formadora de colonias
UFC-BFUe	Unidad formadora de colonias eritroide primitiva
UFC-e	Unidad formadora de colonias eritroides
UFC-G	Unidad formadora de colonias de granulocitos
UFC-GEMM	Unidad formadora de colonias de granulocitos-eritrocitos-megacariocitos y monocitos, sinónimo de UFC-Mix.
UFC-GM	Unidad formadora de colonias granulocito-monocítica
UFC-HPP	Unidad formadora de colonias mieloides de alta proliferación.

UFC-M	Unidad formadora de colonias de monocitos
UFC-Mast	Unidad formadora de colonias de mastocitos
UFC-Meg	Unidad formadora de colonias de megacariocitos
UFC-Mix	Unidad formadora de colonias de células eritroides-mieloides
UIMEO	Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas
$Y_{lac/glc}$	Rendimiento de lactato con respecto a glucosa, mol/mol

Dado su uso generalizado se incluyen las siguientes siglas con su nombre en inglés

<i>CD34</i>	<i>Cluster Differentiation 34</i>
<i>CFU</i>	<i>Colony Forming Unit</i>
<i>DMEM</i>	<i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i>
<i>G-CSF</i>	<i>Granulocyte colony stimulating factor</i>
<i>GM-CSF</i>	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
<i>GVHD</i>	<i>Graft Versus Host Disease</i>
<i>HLA</i>	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
<i>IMDM</i>	<i>Iscove Modified Dulbecco's Medium</i>
<i>LTBMC</i>	<i>Long Term Bone Marrow Culture</i>
<i>LTC-IC</i>	<i>Long Term Culture-Initiating Cell</i>
<i>M-CSF</i>	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>
<i>MIP-1 α</i>	<i>Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha</i>
<i>SCF</i>	<i>Factor Seminal o Stem Cell Factor</i>
<i>TGF- β</i>	<i>Transforming Growth Factor-beta</i>
<i>TNF- α</i>	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>

RESUMEN

El cultivo de células hematopoyéticas es un área en el cultivo de tejidos que tiene aplicaciones potenciales en el campo clínico. Su estudio se inició en la década de los 60's y en los últimos años ha tenido un gran avance. Sin embargo, aún existen aspectos metabólicos e ingenieriles que se encuentran escasamente abordados. El objetivo de este trabajo fue caracterizar algunos de estos aspectos de los cultivos de células hematopoyéticas usando como fuente sangre de cordón umbilical.

Para el desarrollo de esta tarea se utilizó el sistema usual de cultivo de células hematopoyéticas: los cultivos a largo plazo. Por otra parte se realizaron cultivos lote en placas multipozos. En ambos sistemas se analizaron las cinéticas de crecimiento, consumo de nutrientes y producción de desechos metabólicos.

Los cultivos a largo plazo sin adición de citocinas hematopoyéticas tuvieron una duración máxima de 9 semanas. De la cinética de crecimiento de células suspendidas se observó que fue comparable con la que se reporta para médula ósea. Bajo condiciones normalmente usadas con médula ósea, se observó formación de una capa adherente a partir de sangre de cordón umbilical. Lo anterior ha sido reportado escasamente y bajo condiciones diferentes a las normalmente establecidas. Sin embargo, el porcentaje de células adherentes con sangre de cordón umbilical fue inferior. Debido a la baja frecuencia de recambio de medio, en las primeras dos semanas se observó agotamiento de glucosa; sin embargo, en las siguientes semanas y hasta el final del cultivo, la glucosa y el lactato se encontraron a niveles constantes.

Por otra parte, en los cultivos lote se caracterizaron las cinéticas de crecimiento de células suspendidas, consumo de nutrimentos (glucosa y glutamina) y producción de desechos metabólicos tóxicos (amonio y lactato). En los cultivos con adición de citocinas se observó un periodo de adaptación seguido de una fase de crecimiento exponencial, finalizando con un periodo de muerte. La cinética de progenitores hematopoyéticos presentó un punto máximo de expansión, el cual dependió del medio utilizado y fue generalmente entre el día 8 y el 13. Este punto máximo parece coincidir con el inicio de la fase de crecimiento exponencial en células suspendidas.

La concentración inicial de glucosa no tuvo efecto dramático en la cinética de crecimiento celular, sin embargo, la tendencia marca una concentración óptima entre 1 y 2 g/L, observándose cierta inhibición a la mayor concentración evaluada (6 g/L). Se observó que el suero fetal bovino promueve la diferenciación celular a altas concentraciones (30% v/v), principalmente hacia la línea monocítica-granulocítica, y a bajas concentraciones,

mantiene el estado inmaduro de las células y la permanencia de eritrocitos maduros. La concentración óptima aparente se observó entre 8 y 10%.

No existió efecto dramático de la concentración inicial de glutamina, en el intervalo de 0.2 a 6 mM, sobre la constante de crecimiento. Sin embargo, sobre la expansión celular se observó que a 6 mM de glutamina inicial y a bajos inóculos (0.06×10^6 cel/ml) la expansión celular fue de 26.5 con respecto al inóculo.

Por otra parte se observó que el amonio no resultó tóxico para la concentración celular a los niveles producidos en cultivo: 2 mM.

1. INTRODUCCION

En el cuerpo humano, se producen diariamente millones de células sanguíneas maduras, las cuales tienen funciones específicas importantes; entre otras las relacionadas a la respuesta inmune, a mecanismos de defensa y al transporte de oxígeno. Estos niveles de células son mantenidos gracias a un complejo esquema de proliferación y diferenciación celular continua llamada *hematopoyesis*. Todas las células sanguíneas maduras provienen de un progenitor común denominado célula seminal hematopoyética. Esta célula primitiva ha sido observada a través de su progenie en cultivos a Largo Plazo (definidos más adelante). A su vez, las células progenitoras comprometidas que provienen de las células seminales, se determinan a través de la formación de colonias en cultivos semisólidos.

El microambiente hematopoyético, formado *in vivo* por células estromales y accesorias, juega un papel importante en la regulación de la hematopoyesis. Las células estromales se pueden cultivar *in vitro* y se han caracterizado parcialmente en cultivos de células hematopoyéticas de médula ósea. Aún más, sólo escasamente se ha reportado la presencia de células estromales en cultivos a partir de sangre de cordón umbilical.

El sistema hematopoyético puede estar afectado por factores externos (por ejemplo, el uso de agentes antineoplásicos: quimio o radioterapia) o sufrir enfermedades que lo deterioren y dañen las características finales de las células sanguíneas. Una forma de contrarrestar los efectos devastadores de factores externos y enfermedades, es la reconstitución del sistema hematopoyético con transplantes de médula ósea o células hematopoyéticas movilizadas a sangre periférica de un donador compatible. Sin embargo, para la gran mayoría de los pacientes tales transplantes son inaccesibles, dado los altos costos y la baja probabilidad de encontrar un donador sano compatible, sobre todo en minorías étnicas. En este sentido, el cultivo y la expansión de células hematopoyéticas se perfila como una alternativa importante al problema de la búsqueda de un donador compatible. Además tiene otras aplicaciones potenciales igualmente importantes, como por ejemplo en la terapia génica, la inmunoterapia y la producción de células rojas y plaquetas para transfusiones.

Las células hematopoyéticas en cultivo determinan un sistema complejo y heterogéneo que comprende diferentes poblaciones celulares, en diferentes estados de

desarrollo y maduración, y por ende diferentes condiciones metabólicas y características cinéticas. Lo anterior es debido no solamente a la diferenciación hematopoyética, sino también a variabilidad de la muestra, aún de la misma fuente.

La sangre de cordón umbilical es una fuente atractiva para el cultivo de células hematopoyéticas. Entre sus ventajas destacan: ser rica en precursores hematopoyéticos, tener una baja inmunoreactividad, carecer prácticamente de virus que normalmente se encontrarían en médula ósea, ser un tejido de desecho en el parto, y en su colecta no causar riesgo alguno para el donante ni para la madre.

Por otra parte, la aplicación de principios ingenieriles a los cultivos de células hematopoyéticas se ha reportado recientemente en la literatura, mediante el diseño de cultivos en perfusión. Sin embargo, todavía es escasa la información en muchos aspectos. Por ejemplo, no se tienen reportes sobre el efecto de nutrimentos en el medio, como la glucosa y la glutamina sobre parámetros fundamentales de cultivo. Así mismo, la importancia de la concentración de metabolitos tóxicos como el lactato y el amonio, ha sido escasamente abordada.

En el presente trabajo se estudiaron y caracterizaron los cultivos lote y a largo plazo de células hematopoyéticas provenientes de sangre de cordón umbilical, con o sin adición de citocinas y sin estroma preformado. En los cultivos a largo plazo se estudiaron las cinéticas de crecimiento de células mononucleares y de progenitores hematopoyéticos, así como de metabolitos. En los cultivos lote además de lo anterior, se estudiaron los efectos de la concentración inicial de glucosa, glutamina, suero fetal bovino, lactato y amonio sobre variables tales como expansión celular, constantes de crecimiento, de muerte y rendimientos entre otros.

2. ANTECEDENTES

2.1 Aspectos Generales

2.1.1 Hematopoyesis

La hematopoyesis, como se mencionó previamente, comprende un complejo proceso de proliferación y diferenciación celular cuya finalidad es la producción regulada de células sanguíneas maduras, las cuales provienen de un progenitor común: la célula pluripotente hematopoyética o célula seminal hematopoyética. Esta a su vez, da lugar a células progenitoras comprometidas a cierto linaje, las cuales son altamente proliferativas pero son incapaces de autorenovarse, siendo durante este proceso cada vez más maduras (Fig. 1).

La hematopoyesis en el ser humano se inicia en etapas tempranas de la vida embrionaria (del 1° al 2° mes y medio) en el saco vitelino, en el bazo del 2° al 7° mes y en el hígado se sustenta hematopoyesis desde el mes y medio hasta el final de la vida fetal. En la médula ósea la hematopoyesis inicia en el 4° mes de gestación. Durante la lactancia toda la médula ósea es hematopoyética, y en la niñez se lleva a cabo un reemplazo progresivo de médula por tejido graso en los huesos largos. De tal modo, en la edad adulta la hematopoyesis está restringida a la médula ubicada en la parte central del esqueleto (vértebras, costillas, esternón, cráneo, sacro y pelvis, y extremos proximales del fémur) (Hoffbrand y Pettit, 1987; Erslev y Lichtman, 1991).

En el adulto, a través de la hematopoyesis, la producción diaria de células sanguíneas es de aproximadamente 2.5×10^9 eritrocitos, 2.5×10^9 plaquetas, y 1×10^9 granulocitos por kilogramo de peso, en total 400×10^9 células producidas por día, para un adulto promedio (Erslev y Lichtman, 1991; McAdams *et al.*, 1996a).

2.1.2 Células sanguíneas

Las células sanguíneas maduras son altamente especializadas, con funciones específicas. Se clasifican en dos linajes, el mieloide y el linfoide (Fig. 1). La línea mieloide comprende a los eritrocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, plaquetas (originadas de megacariocitos) y monocitos. La línea linfoide comprende a los linfocitos T y B. Las características generales de las células sanguíneas se muestran en la Tabla 1. Sus funciones son

ampliamente conocidas (Hoffbrand y Pettit, 1987; Golde, 1991; Smolen y Boxen, 1991; Alberts *et al.*, 1994) y se resumen a continuación.

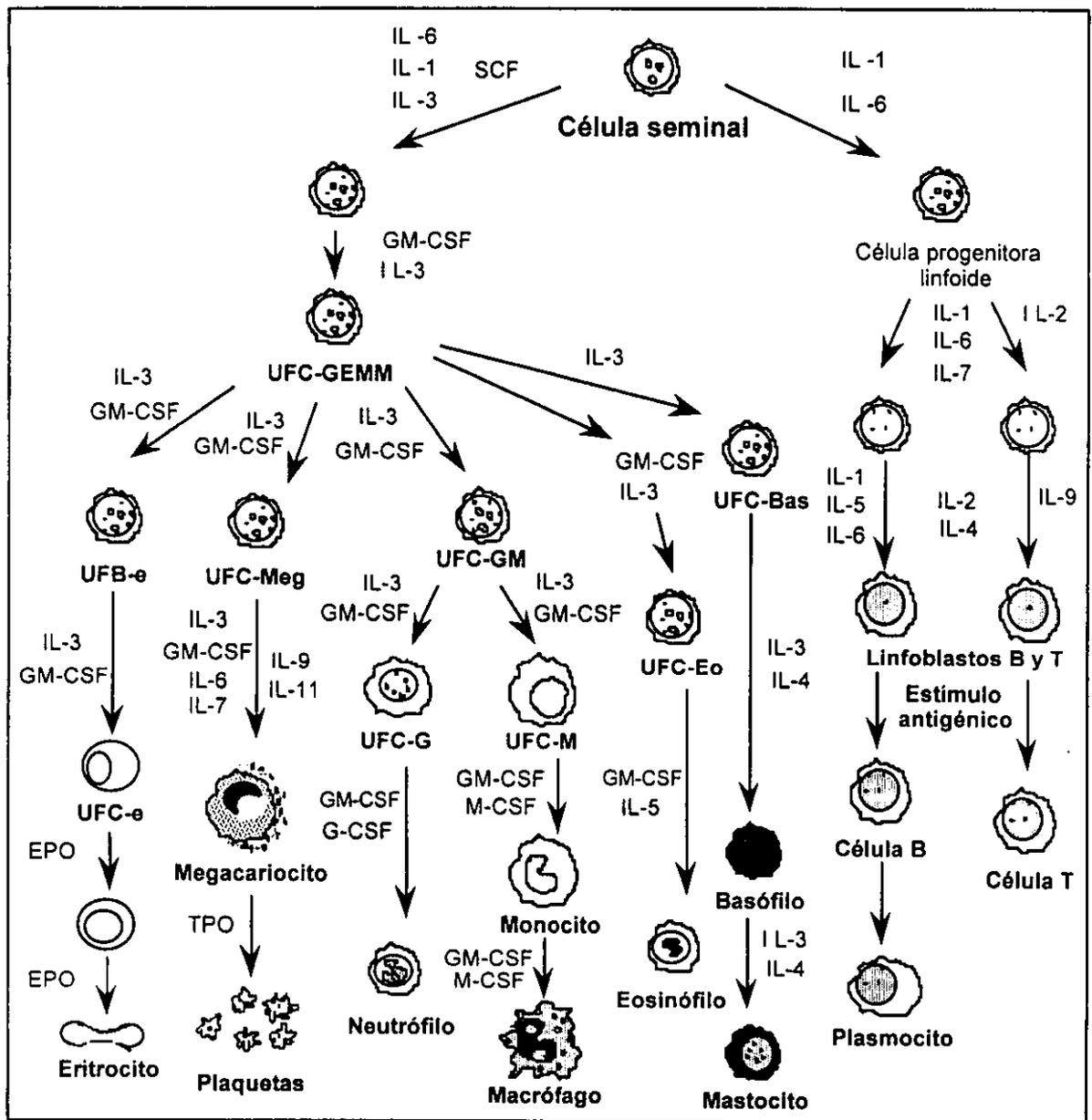


Fig. 1. Esquema de la Hematopoyesis.

Los *eritrocitos* tienen forma de disco bicóncavo y son muy flexibles, la función principal es el transporte de oxígeno y bióxido de carbono, los cuales están unidos a la hemoglobina que corresponde al 33% en peso de la célula. Los eritrocitos maduros carecen de núcleo y no pueden reproducirse ni llevar a cabo actividades metabólicas considerables. Su membrana plasmática es semipermeable y consiste de estromatina, lecitina y colesterol.

Los *eosinófilos* ayudan en la destrucción de parásitos, participan en la respuesta alérgica y en la modulación de la respuesta inflamatoria. Fagocitan los complejos antígeno-anticuerpo.

Los *basófilos* participan en las reacciones alérgicas. En los tejidos actúan como células cebadas, liberando heparina, histamina y serotonina, sustancias que intensifican la reacción inflamatoria global.

Los *neutrófilos* protegen al cuerpo contra infecciones invasoras, su función está muy relacionada con la de los macrófagos (fagocitosis de bacterias y células tisulares muertas), y con la de los linfocitos (en la presentación de antígenos). Son atraídos a los sitios de infección por factores quimiotácticos, los cuales son generados por la interacción de anticuerpos con los antígenos de los patógenos. Los gránulos neutrofilicos contienen proteasas, hidrolasas y metaloproteinasas, entre otras, las cuales degradan y digieren el material fagocitado.

Los *monocitos* después de dejar el torrente sanguíneo e internarse en los tejidos maduran a macrófagos, los cuales tienen funciones específicas. Junto con los neutrófilos fagocitan partículas y cuerpos extraños, además de células tisulares senescentes, dañadas y muertas. Así también contienen lisosomas especializados, los cuales fusionan con la vesícula fagocitada, exponiéndola a enzimas digestivas, a superóxido y peróxido de hidrógeno (O_2^- , H_2O_2) e hipoclorito (HOCl). Son los únicos que son capaces de ingerir microorganismos grandes como protozoarios.

Los *linfocitos B y T* median la respuesta inmune, ya sea celular (linfocitos T) o humoral (anticuerpos producidos por las células plasmáticas). Las células T se desarrollan en el timo a partir de precursores que migran de los tejidos hematopoyéticos a través de la sangre. Las células T pueden ser condicionadas en etapas tempranas por las células dendríticas reticulares ricas en antígenos HLA (por sus siglas en inglés: *human leucocyte-associated*), para reconocer los antígenos propios del cuerpo y para transformarse en las células que determinan la inmunidad mediada por las células. Los linfocitos T abarcan a las células *auxiliares* y a las *supresoras o citotóxicas*, las cuales reducen las respuestas de los linfocitos B y son capaces de matar directamente a aquellas células reconocidas como extrañas. Los linfocitos B son activados por antígenos, desarrollándose a células plasmáticas, las cuales producen anticuerpos. Las células B pueden ser instruidas por las células T circulantes auxiliares para

producir algunos antígenos específicos, mientras que los macrófagos intervienen al procesar muchos antígenos.

Las *plaquetas* se producen en la médula ósea al fragmentarse el citoplasma de los megacariocitos. Estos maduran mediante un proceso de autorreproducción nuclear y generalmente cuando se alcanza una fase de ocho núcleos el crecimiento cesa, el citoplasma se torna granular y se liberan las plaquetas. Cada megacariocito da origen aproximadamente a 4000 plaquetas. La función principal de las plaquetas es la formación de tapones mecánicos durante la respuesta hemostática normal a una lesión vascular. El punto central de esta función son las reacciones de adhesividad, liberación, agregación y fusión de plaquetas, así como su actividad procoagulante.

Tabla 1. Características generales de las células sanguíneas (Tortora y Anagnostakos, 1989).

Células Sanguíneas Maduras	Diámetro (µm)	Vida media aproximada	Concentración en sangre
Eritrocitos	8	120 días	4.8×10^6 /ml
Monocitos	16 - 20	20 a 40 hrs en el torrente sanguíneo. Meses-años en los tejidos	3 - 8% del total de los leucocitos (tl)*
Basófilos	8 - 10	De algunas horas a varios días.	0.5- 1 % tl*
Eosinófilos	10 - 12	De algunas horas a varios días.	2 - 4 % tl*
Neutrófilos	10 - 12	8 horas	60 -70 % tl*
Linfocitos B	10	días - meses	20- 25 % tl*
Linfocitos T	7 - 15	2 - 3 días	
Plaquetas	2 - 4	7 a 10 días	$250- 400 \times 10^3$ / ml

* total de leucocitos (tl): $5 - 9 \times 10^3$ /ml

2.1.3 Célula seminal

Una célula seminal (en inglés: stem cell) es aquella célula que tiene la capacidad de autorenovarse y diferenciarse hacia diferentes tipos de células maduras; en el proceso de diferenciación, se compromete cada vez más a formar un tipo específico de célula (Golde, 1991). La célula seminal debe tener básicamente dos propiedades: mantenerse presente (es

decir, que durante la autorenovación permanezca una célula en estado seminal), y que las células diferenciadas generadas sean suficientes para asegurar un adecuado funcionamiento del tejido resultante (Lord y Dexter, 1995). En principio una sola célula seminal hematopoyética es capaz de reconstituir completamente todo el sistema sanguíneo. Sin embargo, se ha observado que cuando se han transplantado células seminales en animales, éstas pierden su capacidad regenerativa (Lord y Dexter, 1995), perdiendo su capacidad de autorenovarse y mantenerse como célula seminal.

Las células más primitivas se han definido en términos de su habilidad de reconstituir el sistema hematopoyético y por su capacidad de regenerar tanto células linfoides como mieloides. Las células denominadas CI-CLP (Células Iniciadoras-de Cultivos a Largo Plazo, o por sus siglas en inglés: *LTC-IC, Long Term Culture-Iniciating Cell*), han sido definidas como células muy primitivas, altamente proliferativas y en analogía con el sistema murino, capaces de repoblar el sistema hematopoyético. Las CI-CLP solo pueden ser observadas a través de su progenie debido a que no pueden ser detectadas en ensayos clonogénicos. Estas células son determinadas indirectamente *in vitro* en cultivos a largo plazo adicionales bajo diluciones limitantes; siendo su número proporcional a los progenitores encontrados en estos cultivos a la quinta semana (Sutherland *et al.*, 1990).

Por otra parte, se han definido a las células primitivas como aquellas que presentan el marcador de superficie CD34 (Baum *et al.*, 1992), y que tienen actividad seminal *in vivo* e *in vitro*. Se sabe que la CI-CLP es CD34⁺, y que la gran mayoría de células hematopoyéticas CD34⁺ son células comprometidas a cierto linaje, además de ser células formadoras de colonias. Por ejemplo, la subpoblación CD34^{alto} HLA-DR^{bajo} (contenida en solo el 0.06% de las células mononucleares en la médula ósea) es rica en CI-CLP (50-60%) y representa el 2% del total de células formadoras de colonias (Sutherland *et al.*, 1989). Sin embargo, la presencia del marcador CD34 no es suficiente para seleccionar a las posibles células totipotentes, debido a que algunos otros tipos celulares también presentan este marcador, como son los fibroblastos y algunas células endoteliales.

Por otra parte, se sabe que bajo condiciones normales la gran mayoría de células CI-CLP se encuentran en la fase G₀ del ciclo celular, durante la cual puede ser reparado el DNA dañado y mantener la integridad genética de la población de células seminales. Así también se ha determinado que los progenitores multipotentes se encuentran mayoritariamente en G₀ o en

G₁ tempranos, mientras que los progenitores semicomprometidos como el denominado unidad formadora de colonias granulocito-monocito (UFC-GM), se encuentran principalmente en G₁ (Koller y Palsson, 1993; Gothot *et al.*, 1997).

Morfológicamente, la célula seminal y los progenitores hematopoyéticos son problememente similares, observándose como pequeñas células mononucleares de tipo linfoide (Erslev y Lichtman, 1995). La célula seminal hematopoyética no ha sido aislada; se sabe que la célula más primitiva además de ser CD34⁺ exhibe el marcador Thy-1⁺ y es HLA-DR⁺ (Mayani y Lansdorp, 1994; Verfaillie, 1993), sin embargo, como se mencionará posteriormente, se tienen indicios de haber encontrado un precursor que carece del antígeno CD34.

2.1.4 Progenitores hematopoyéticos

Los progenitores hematopoyéticos no muy primitivos y comprometidos, originados de la célula seminal, poseen la capacidad de formar colonias en cultivo. A éstos se les denomina Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (por sus siglas en inglés: *CFU, Colony Forming Unit*). De acuerdo a su potencialidad, las UFC se denominan pluripotentes o multipotentes (células progenitoras mieloides-eritroides), bipotentes (células progenitoras monocíticas-granulocíticas) o monopotentes (células progenitoras eritroides, granulocíticas o monocíticas).

Las UFC pueden ser identificadas en cultivos semisólidos de acuerdo a la morfología de las colonias que generan. Para ello se utiliza los denominados ensayos clonogénicos, que consisten en inocular un pequeño número de células en un medio semisólido (generalmente a base de metilcelulosa), con una mezcla de factores de crecimiento. Los cultivos son incubados por un par de semanas y las colonias formadas (que provinieron de una sola célula) son cuantificadas. En la sección 4.7 se muestran fotografías de las colonias típicas encontradas en estos ensayos clonogénicos.

La proliferación y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos son dependientes de citocinas y de factores de crecimiento (Koller y Palsson, 1993; McAdams *et al.*, 1996a). Estos son provistos por diferentes células en múltiples sitios en el cuerpo humano, principalmente por las células que constituyen el microambiente hematopoyético.

2.1.5 Microambiente hematopoyético

En mamíferos adultos más del 95 % de la hematopoyesis ocurre en la médula ósea (MO), que es el único órgano donde la mielopoyesis (producción de células granulocíticas y monocíticas), eritropoyesis (producción de células eritroides) y linfopoyesis (producción de células linfoides) es simultánea (Mayani, 1996). El microambiente hematopoyético de la MO está constituido por células estromales, accesorias (monocitos y linfocitos) y por sus productos, además es capaz de regular la proliferación y diferenciación hematopoyética. En la Tabla 1, se resumen las células que componen el estroma, así como sus productos.

El microambiente hematopoyético puede influir en la hematopoyesis en forma positiva o negativa a través de tres mecanismos: por contacto directo célula-célula, por la secreción de factores de crecimiento e interleucinas y por la secreción de los componentes de la matriz extracelular. Estos mecanismos operan simultáneamente en la interacción entre el microambiente y las células hematopoyéticas (Mayani *et al.*, 1992).

2.1.6 Interleucinas y factores de crecimiento

Las citocinas son proteínas que tienen funciones parecidas a las hormonas. Por ejemplo, regulan mecanismos de defensa y homeóstasis. Pueden tener efecto supresor o estimulador de funciones tales como la proliferación, diferenciación, activación y mecanismos motores (Cohen y Cohen, 1996). Dentro de esta gran familia se encuentran las interleucinas y factores de crecimiento que son proteínas glicosiladas que actúan cinérgicamente sobre los progenitores hematopoyéticos comprometidos y semicomprometidos, promoviendo su diferenciación y crecimiento, y probablemente la autorenovación de células seminales. Fueron descubiertas inicialmente en cultivos semisólidos en agar, en donde se requería de medio específico condicionado para promover la formación de colonias hematopoyéticas (Koller y Palsson, 1993). Como puede observarse en la Fig. 1, en cada una de las etapas de la diferenciación y desarrollo hematopoyético actúan determinados factores de crecimiento. Se piensa que IL-1, IL-3 y SCF actúan sobre los progenitores primitivos aparentemente sensibilizándolos hacia los factores que actúan en las siguientes etapas de diferenciación (Cowling y Dexter, 1992). EPO, G-CSF y M-CSF, están restringidos al estímulo de progenitores comprometidos para su diferenciación y activación, mientras que IL-3, IL-6 y GM-CSF son multilineales, estimulando además a progenitores semicomprometidos o en el

Tabla 2. Componentes del Microambiente Hematopoyético (Mayani *et al.*, 1992; Mayani, 1996; Erslev y Lichtman, 1995).

Tipo celular: Estromal (E) Accesorio (A)	Función en el microambiente y productos celulares. Matriz extracelular (MEC). Interleucinas y factores inhibitorios (IL's)
Células reticulares (E): fibroblastos y adventicias	<p><i>Fibroblastos.</i> Soporte. Asociados con granulocitos. Producen: IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, M-CSF, G-CSF, GM-CSF, SCF y IFN-β (i) (IL's).</p> <p><i>Adventicias.</i> Regulan la migración de células maduras hacia la circulación y como "células barrera" están relacionadas con la liberación de precursores hematopoyéticos a la circulación.</p> <p>Las células reticulares sintetizan colágeno y otras proteínas fibrosas como fibronectina (MEC).</p>
Macrófagos (E) y monocitos (A)	<p>Soporte. Aparentemente, regula la eritropoyesis en donde se les ha observado rodeados de eritroblastos conformando lo que se ha denominado isla eritroblástica.</p> <p>Fagocítica. Remueve los eritroblastos defectivos de la circulación.</p> <p>Inductiva. A través de la producción de factores de crecimiento y de factores inhibitorios y mediante las interacciones célula-célula con precursores hematopoyéticos en desarrollo.</p> <p>Producen: IL-1, IL-6, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IFN-α (i), PDGF, TNFα (i), MIP-1α (i) y TGF β (i) (IL's).</p>
Linfocitos (A)	<p>Inductiva. A través de la producción de factores de crecimiento y de factores inhibitorios y mediante las interacciones célula-célula con precursores hematopoyéticos en desarrollo.</p> <p>Producen: IL-1, IL-3, IL-6, IL-9, IL-10, GM-CSF y IFN (i), LIF (i) y TNFα (i) (IL's).</p>
Células endoteliales (E)	<p>Regulatoria. Forman la mayor barrera y controlan el sistema de entrada y salida de sustancias químicas y partículas hacia los espacios hematopoyéticos.</p> <p>Producen colágeno y proteínas fibrosas (laminina) (MEC).</p>
Adipocitos (E)	<p>No se tiene clara su función. Se desarrollan en la lipogénesis de células fibroblastoides. Parecen estar asociados con la capacidad del estroma para soportar precursores de diferentes linajes.</p>
Células osteogénicas (E)	<p>Soporte e inductiva. Aunque no son consideradas parte del estroma, son componentes de la cavidad medular y aparentemente son capaces de sintetizar interleucinas y moléculas de la matriz extracelular.</p>

(i) = inhibidor

caso de IL-6 a nivel de célula seminal. A continuación se mencionan algunas características de las interleucinas y de los factores de crecimiento más importantes.

IL-3, interleucina-3. También llamada multi-CSF. IL-3 es una proteína relativamente pequeña, altamente glicosilada: es posible que tal grado de glicosilación pueda regular la interacción con la matriz extracelular e influenciar su difusión o localización en los tejidos (Schrader, 1994). La acción principal de IL-3 en células normales parece estar restringida a las células hematopoyéticas mieloides pluripotentes y sus derivados (eritrocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos y megacariocitos) y no así en la línea linfoide (Clark y Kamen, 1987; Schrader, 1994), aunque se tienen reportes de que afecta el crecimiento de ciertos tipos de células epiteliales (Schrader, 1994).

IL-6, interleucina-6. Es una glicoproteína que induce la diferenciación y el crecimiento de progenitores hematopoyéticos, tanto de la línea linfoide como de la mieloide. Además tiene una función importante como mediador de la respuesta inflamatoria, así como en la diferenciación de otras células no hematopoyéticas como queratinocitos, osteoclastos y células neuronales y endoteliales (Peters *et al.*, 1996).

GM-CSF, factor estimulador de colonias granulocíticas-monocíticas. Es una glicoproteína monomérica y tiene efecto en un amplio rango de tipos celulares *in vitro* a altas concentraciones. *In vivo* es producido por células endoteliales, mesoteliales, del parénquima del hígado y epiteliales, fibroblastos, osteoblastos, astrocitos y mioblastos. GM-CSF estimula la producción de granulocitos, macrófagos y posiblemente plaquetas. *In vitro* estimula la formación de UFC-G, UFC-M y UFC-GM. Actúa sinérgicamente con otros factores para estimular UFC-Mix, UFC-Meg y UFB-e. GM-CSF ha sido clonado y expresado en bacterias, levaduras y células animales (Johnson, 1984; Clark y Kamen, 1987; Yang y Shu, 1996).

M-CSF, factor estimulador de colonias monocíticas. Es un dímero y es sintetizado por diferentes células. Se encuentra en la circulación sanguínea a concentraciones biológicamente activas. Se ha encontrado que además de macrófagos y sus precursores, regula a otras células (precursores de osteoblastos) (Stanley, 1994). También puede estimular a UFC-G a altas concentraciones (Massagué y Pandiella, 1993).

EPO, eritropoyetina. Es responsable de la formación y maduración de eritrocitos. En cultivo se observa que estimula la formación de progenitores eritroides tardíos, UFC-e, y actúa sinérgicamente con IL-3 para la estimulación de progenitores tempranos, UFB-e. EPO es producida principalmente por las células intersticiales renales en respuesta a bajos niveles de

O₂ (hipoxia) y fue la primera proteína que se observó tenía efecto sobre la diferenciación celular (Tortora y Anagnostakos, 1989).

Existen también factores inhibitorios de la proliferación celular hematopoyética, tales como TGF- β , TNF- α , IFN- γ y MIP-1 α , los cuales tiene tanto efectos negativos sobre la hematopoyesis dependiendo del tipo de célula y las citocinas presentes (Koller y Palsson, 1993). Algunos de ellos se mencionan a continuación.

TGF- β (Transforming growth factor-beta). Puede inhibir la formación normal de colonias hematopoyéticas y también inhibe la diferenciación de células leucémicas promovida por IL-6 (Derynck, 1994), induce apoptosis y disminuye la expresión de receptores para factores de crecimiento (Sachs y Lotem, 1994). Se ha observado que es un potente inhibidor del sinergismo mediado por SCF en progenitores murinos Lin⁻Sca1⁺, así como también en progenitores comprometidos (Dubois *et al.*, 1994).

TNF- α (Tumor necrosis factor alpha). Se expresa principalmente en monocitos y macrófagos y deriva de una proteína transmembranal. Tiene actividad sobre diferentes células y afecta la diferenciación, crecimiento y la adhesividad de células de tejidos adiposos y musculares, del sistema nervioso central, glándulas adrenales, endoteliales, neutrófilos, monocitos, del hueso y de la piel (Massagué y Pardiella, 1993). Se sabe que induce apoptosis en muchos tipos celulares, normales y transformados. En progenitores hematopoyéticos contrarresta la proliferación y supervivencia que inducen algunos factores de crecimiento como SCF, IL-6, IL-11 y G-CSF. Sin embargo, tiene efectos bidireccionales, mientras que induce apoptosis en presencia de SCF, actúa sinérgicamente con IL-1 para suprimir apoptosis en progenitores Lin⁻Sca1⁺ (Jacobsen *et al.*, 1996).

Las acciones que ejercen los principales factores de crecimiento sobre las células hematopoyéticas se mencionan en la Tabla 3.

2.1.7 Transplante de médula ósea

El transplante de MO, es una opción para restaurar la hematopoyesis normal en pacientes con problemas hematopoyéticos clonales. La MO para un transplante, se obtiene comúnmente de múltiples punciones en la cresta ilíaca de un donador sano. Alternativamente, se colectan células hematopoyéticas medulares de la sangre periférica mediante aféresis, las cuales han sido previamente movilizadas con la administración del Factor Estimulador de

Tabla 3. Factores de crecimiento y citocinas humanas que intervienen en la hematopoyesis del linaje mieloide (Johnson, 1984; Clark y Kamen, 1987; Quesenberry, 1991; Cowling y Dexter, 1992; Massagué y Pandiella, 1993; Hirano, 1994; Schrader, 1994).

Nombre	Células Productoras	Acciones sobre progenitores hematopoyéticos	Amino Ácidos	Datos Técnicos
SCF	Fibroblastos	Estimula la formación de UFC-Mix <i>in vitro</i> .	164-165 (murino)	Receptor: c-kit
IL-3	Linfocitos T	Estimula la formación UFC-Mix, UFC-G, UFC-M, UFC-Mast <i>in vitro</i> . Actúa sinérgicamente con EPO para la formación de UFB-e, y con M-CSF para la formación UFC-HPP. Así también con G-CSF en la producción neutrófilos, y con IL-1 y SCF en la de macrófagos.	133 (humano) 140 (murino)	14-28 kD altamente glicosilada
GM-CSF	Linfocitos T, células endoteliales y fibroblastos	Estimula la formación de UFC-G, UFC-M y UFC-GM <i>in vitro</i> . Actúa sinérgicamente con otros factores para estimular UFC-Meg y UFB-e. Estimula <i>in vivo</i> la producción de granulocitos, macrófagos y posiblemente plaquetas.	127	14-35 kD
G-CSF	Macrófagos, células endoteliales y fibroblastos	Estimula la formación de UFC-G <i>in vitro</i> . Actúa sinérgicamente con IL-3, GM-CSF y M-CSF para estimular la formación de UFC-Meg, UFC-GM y UFC-HPP. Estimula <i>in vivo</i> la producción y maduración de neutrófilos.	174/177	18-25 kD
M-CSF	Macrófagos, células endoteliales, y fibroblastos.	Estimula la formación de UFC-M. Soporta la sobrevivencia de macrófagos <i>in vitro</i> .	256/554	35-45 kD Receptor: c-fms
IL-6	Fibroblastos, monocitos, megacariocitos.	Actúa sinérgicamente con IL-3 para la proliferación de células seminales, y con M-CSF para la estimulación de UFC-M, así también sinergiza con GM-CSF. Estimula la maduración de megacariocitos.	212	21-28 kD
EPO	Células intersticiales renales	Estimula la formación de UFC-e <i>in vitro</i> . Actúa sinérgicamente con IL-3 para estimular la formación de UFB-e <i>in vitro</i> .	164	Altamente glicosilada

Colonias-Granulocíticas (por sus siglas en inglés: *G-CSF*) o con GM-CSF.

Las células hematopoyéticas obtenidas se almacenan refrigeradas o congeladas, o bien se administran inmediatamente al paciente (Limón, 1995). La MO a transplantar se administra por vía intravenosa, como una transfusión sanguínea. Las células progenitoras hematopoyéticas tienen la capacidad de localizar el espacio medular a través de la circulación y alojarse en él, para reinstalar de esta forma la hematopoyesis abatida con la quimio/radioterapia.

Las variedades del trasplante medular más utilizadas son: *allogénico*, el donador es histocompatible, (HLA compatible), habitualmente un hermano consanguíneo; *singénico*, el donador es un hermano HLA idéntico, es decir, hermano gemelo del paciente; *autólogo*, el donador es el propio enfermo; *no relacionado*, el donador es altruista, HLA compatible con el enfermo, pero sin conexión familiar (Limón, 1995). El término HLA se refiere a las moléculas localizadas en la superficie de células sanguíneas y otras células de diferentes órganos que sirven como código de reconocimiento y comunicación entre las células inmunocompetentes (linfocitos) y el resto de los tejidos. Este código de reconocimiento es diferente en cada individuo y por lo tanto específico, distintivo y único de cada ser humano (Limón, 1995).

Algunas de las complicaciones graves que puede presentar el trasplante de MO son Enfermedad Injerto contra Hospedero (por sus siglas en inglés: *GVHD*, *Graft Versus Host Disease*), inmunosupresión, infecciones oportunistas y falla del implante medular, entre otras (Limón, 1995). La GVHD se presenta en trasplantes alogénicos y consiste en que los linfocitos T del donador atacan al cuerpo del hospedero. Esta enfermedad en gran proporción desencadena la muerte del paciente.

Los trasplantes de MO se han incrementado a razón del 20 al 30 % por año. En 1980 se realizaron cerca de 200 trasplantes en el mundo, y en 1990 aproximadamente 10000 trasplantes fueron realizados principalmente en EUA y Europa (Koller y Palsson, 1993). Se estima que los requerimientos son de 200 millones de células de MO/kg de peso del paciente (Golde, 1991).

El trasplante de MO está indicado en neoplasias hematológicas, y eventualmente no hematológicas, que a través del análisis de factores pronósticos, no tengan probabilidades substanciales de curarse con quimioterapia y radioterapia convencionales (Limón, 1995). Es un proceso doloroso para el donador y muy caro. Sin embargo eleva la sobrevivencia de los

pacientes a los cuales es aplicado. En algunos países es un proceso común, en cambio en México no existen bancos de MO, por otra parte la infraestructura necesaria está localizada en pocos hospitales en el país como el Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS y el Instituto Nacional de Cancerología.

2.1.8 Transplante de sangre de cordón umbilical

La sangre de cordón umbilical (SCU) es un tejido que se había considerado como un desecho en el parto, hasta la década pasada cuando en 1988 en Francia, un grupo de investigadores a cargo de la Dra. Gluckman realizó el primer transplante usando SCU (Gluckman *et al.*, 1988). Este transplante fue realizado exitosamente a un niño de 5 años que padecía anemia de Fanconi, una terrible enfermedad congénita, el cual hacia 1995 permanecía vivo y aparentemente curado.

La SCU tiene enormes ventajas sobre la MO, es rica en precursores hematopoyéticos, los cuales tienen mayor capacidad proliferativa que los encontrados en MO (Lansdorp *et al.*, 1993). La SCU es normalmente desechada en el parto y su obtención no representa riesgo alguno para el donador ni para la madre. La SCU tiene una baja inmunoreactividad debido a que los linfocitos T no están educados para atacar antígenos específicos, lo que reduce el riesgo de desarrollar la GVHD, que con SCU se presenta del 30 al 50% para transplantes no relacionados, y menos del 10% en relacionados (Rubinstein, 1997). En cambio, para transplantes de MO, la GVHD se presenta en un 70 a 80% (BMTP, 1996; Thompson, 1995). La SCU prácticamente carece de virus (0.3%) que normalmente se encontrarían en MO (mayor al 85%), como el citomegalovirus y el Epstein Barr (BMTP, 1996; Jenney, 1995). El costo agregado que implica la recolección y almacenamiento de SCU comparado con el que se requiere para obtener MO (hospitalización y cirugía del donador) es mucho menor: 100 dls/año de almacenamiento de SCU contra 10 mil dls/procedimiento en EUA. (Thompson, 1995; ICBF, 1995). Por otra parte para algunas enfermedades, el transplante de SCU tiene una elevada aceptación corporal (89 a 90%) (Rubinstein, 1997). Además de estas ventajas, la SCU puede ser almacenada bajo criopresevación y ser utilizada en el mismo paciente años después en caso de que desarrollara alguna enfermedad que requiriera el transplante de células hematopoyéticas, o bien ser utilizada en personas relacionadas con el donador, como hermanos consanguíneos.

Esta opción reduce en gran medida la búsqueda de donadores de MO. De acuerdo con el Journal of the American Medical Association, de 10 mil a 15 mil pacientes americanos/año son incapaces de encontrar un donador (CBR, 1997); problema que se acrecenta en grupos étnicos pobremente representados en distintas comunidades.

El trasplante de células hematopoyéticas de SCU tiene amplias expectativas. Desde el primero en 1988 hasta 1997, se han realizado en el mundo cerca de 600 trasplantes, con un incremento dramático en el último año. De los trasplantes, aproximadamente 25% fueron de un hermano consanguíneo y 75% no relacionados (CBR, 1997). Existen diversos países que cuentan con bancos de SCU: EUA, Alemania, Italia, Francia, España, Bélgica, Holanda, Australia, Reino Unido, Israel y Austria entre otros (CRIR, 1997). Recientemente se han reportado casos involucrados con el trasplante de SCU que resultan alentadores, como es el caso del primer trasplante de SCU a un adulto con un peso de 80 kg, así también como la idea de reinfundir células hematopoyéticas de SCU de bebés HIV positivos genéticamente modificadas para desarrollar células HIV resistentes (ICBF, 1995).

A pesar de las ventajas que puede representar la SCU, el número total de progenitores que pueden ser recuperados de una muestra es inferior al de MO, aunque el número de progenitores por unidad de volumen sea similar en MO y SCU. Debido al número limitado de progenitores hematopoyéticos en SCU y a los altos requerimientos se hace necesario desarrollar protocolos para expandir estas células.

2.2. Aspectos particulares en el cultivo de células hematopoyéticas

2.2.1 Cultivos a Largo Plazo

El cultivo de células hematopoyéticas (CH) se inició a mediados de los setentas, cuando Dexter *et al.* (1977) desarrollaron un sistema para cultivar células murinas del bazo. La principal estrategia fue desarrollar una capa estromal proveniente de médula ósea por cerca de 1 a 3 semanas, capaz de sustentar la hematopoyesis. Esta capa contenía fibroblastos, macrófagos y adipocitos, y las células hematopoyéticas eran adicionadas posterior a la formación del estroma artificial. La proliferación observada de las células progenitoras fue dependiente de la presencia de la capa adherente. Este sistema representó *in vitro* el microambiente hematopoyético en dos dimensiones cuando *in vivo* está organizado en tres

dimensiones. Garnet y Kaplan (1980) adaptan este sistema a células humanas; sin embargo, a diferencia de los cultivos murinos, los cuales llegan a durar hasta un año, los cultivos con células hematopoyéticas humanas decaen desde el inicio y duran hasta un máximo de 3 meses. A estos cultivos se les ha llamado Cultivos Tipo Dexter o Cultivos a Largo Plazo (CLP).

CLP es un término operacional para designar aquellos cultivos en los cuales CH muy primitivas pueden sobrevivir, proliferar y diferenciarse a precursores de diferentes linajes sin la adición de factores de crecimiento, pero con la presencia de células estromales (Eaves *et al.*, 1991). El protocolo de recambio se estableció empíricamente cada 7 días (semanal): la mitad del medio semiagotado es remplazado por un volumen igual de medio fresco, evitando la manipulación excesiva y el desprendimiento de la capa estromal formada. Se observó que con este protocolo es posible sustentar la hematopoyesis y aparentemente la viabilidad de las células seminales por largos periodos (Eaves *et al.*, 1991). No se tienen reportes de que se haya realizado una caracterización respecto al consumo de nutrimentos y desechos metabólicos en este tipo de cultivos.

Estudios hechos en los CLP han sugerido que la matriz extracelular, principalmente las moléculas de colágeno, provistas por el estroma formado tienen una función importante. Se ha propuesto que los proteoglicanos en este sistema pueden unir GM-SCF, IL-3 y posiblemente otros factores de crecimiento, presentandolos a las células hematopoyéticas. Por otra parte, a partir de este tipo de cultivos se han aislado líneas estromales, generando evidencia de que probablemente exista un progenitor común de éstas (Quesenberry, 1991). Sin embargo, los CLP humanos no tienen la productividad y longevidad que se ha observado en otras especies, el decremento exponencial de células totales y progenitoras hace de estos cultivos inapropiados para la expansión (Koller y Palsson, 1993). Por otra parte este sistema ha sido reportado frecuentemente para estudiar el sistema hematopoyético de padecimientos como leucemias y otras enfermedades sanguíneas relacionadas y evaluar la efectividad de protocolos clínicos basados en la quimio/radioterapia.

El efecto del estroma sobre células hematopoyéticas de MO, ha sido estudiado por Verfaillie y Catanzaro, (1996) en CLP. Ellos sugieren que el contacto directo entre progenitores y el estroma inhibe la proliferación. Esto lo comprobaron con un sistema en donde las células hematopoyéticas son cultivadas sobre estroma preformado pero físicamente

separadas por una membrana microporosa de 0.4 μm . Observaron una mayor proliferación en aquellos cultivos que estuvieron físicamente separados del estroma. Ellos sugieren que esta inhibición de la proliferación, se debe a los factores inhibitorios secretados por el estroma y por las señales mediadas por la adhesión a la matriz extracelular.

Sin embargo la información con respecto a la funcionalidad del estroma es contradictoria. Como anteriormente se mencionó, en CLP es necesaria la presencia del estroma para mantener a la célula seminal en aparente autorenovación. En CLP con células seleccionadas, sangre periférica y con SCU (en donde no se ha comprobado ampliamente el contenido de precursores estromales), la capa adherente se desarrolla previamente de una línea celular modificada genéticamente o de una fuente de MO (Verfaillie, 1993; McKenna *et al.*, 1995; Nicol *et al.*, 1995; Emerson, 1996). Además se ha reportado que la expansión de CI-CLPs es dependiente de las células accesorias que se encuentran presentes en el inóculo, y se ha sugerido que la pérdida de éstas, durante la selección inicial de las células (por citometría de flujo), conlleva a un decremento en el total de UFC-GM cuando son comparados con cultivos no seleccionados (Koller *et al.*, 1995).

Con respecto a la funcionalidad del estroma formado por células hematopoyéticas de cordón umbilical, se encuentra el trabajo de Ye *et al.* (1994). Ellos caracterizaron el estroma formado a partir de SCU, demostrando que éste, contiene una población significativa de células accesorias, las cuales forman una capa adherente bajo ciertas condiciones. Esta capa adherente o estroma fue formado en CLP bajo el soporte de un cubreobjetos especial para cultivo, el cual mostró ser preferido por las células a la superficie de plástico estándar (poliestireno). No observaron presencia de adipocitos pero sí de fibroblastos, macrófagos y células endoteliales, los cuales se mantenían firmemente unidos al cubreobjetos. Además, observaron células hematopoyéticas mieloides y eritroides unidas a la capa adherente. Concluyen que con las condiciones evaluadas (cubreobjetos y adición de factores hematopoyéticos) se puede desarrollar un estroma funcional capaz de soportar hematopoyesis por cerca de 4 meses. Sin embargo, en condiciones normales (sin cubreobjetos), no se tienen reportes de formación de estroma en CLP a partir de SCU.

2.2.2 Cultivos con células seleccionadas

Las células que expresan el antígeno de superficie CD34⁺, constituyen una población heterogénea, que incluye a progenitores no comprometidos (probablemente las células seminales), y progenitores comprometidos a diferentes linajes. En MO fetal y adulta las células CD34⁺ corresponden aproximadamente del 2 al 5% y en SCU al 1% de las células mononucleares. De las células CD34⁺, en MO fetal un 25% presentan alta expresión (CD34^{alto}) y en SCU un 83%, lo cual indica probablemente un mayor potencial de proliferación (DiGiusto *et al.*, 1996).

En la población de células hematopoyéticas CD34⁺ se han caracterizado subpoblaciones, por ejemplo las células CD34⁺CD45RA^{bajo}CD71^{bajo}, son ricas en progenitores multipotentes (42%), mientras que las CD34⁺CD45RA^{alto}CD71^{bajo}, en progenitores mieloides (90%) y las CD34⁺CD45RA^{bajo}CD71^{alto} en progenitores eritroides (70%) (Mayani *et al.*, 1993). De esta forma algunos grupos de investigación se han dedicado a seleccionar y cultivar específicamente células CD34⁺ con la finalidad de estudiar la hematopoyesis *in vitro*. Las formas de seleccionar las CD34⁺ son variadas e incluyen la selección por citometría de flujo (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), por separación mediante esferas magnéticas, inmunoadsorción o mediante métodos enzimáticos. La pureza de las CD34⁺ corresponde al 39% con esferas magnéticas, 43% con métodos enzimáticos (glicoproteasas) y 88% con citometría de flujo; con rendimientos de 30, 40 y 40%, respectivamente (DiGiusto *et al.*, 1996).

Cultivando células CD34⁺, se reduce la complejidad del sistema y es factible realizar cultivos libres de suero con adición de factores hematopoyéticos. Sin embargo, este sistema conlleva enormes desventajas, como son el alto costo debido al uso de anticuerpos monoclonales, la necesidad de equipo poco convencional y los bajos rendimientos de purificación. Además se ha observado que también decrece el rendimiento en la obtención del número final de células UFC-GM y CI-CLP (Collins *et al.*, 1996). Por otra parte, existen reportes donde se muestra que la selección de CD34⁺ no se requiere para obtener expansiones extensivas de progenitores como UFC-GM (Sandstrom *et al.*, 1995). Y se ha encontrado que aún cuando la expansión en células totales es mayor para cultivos iniciados con células CD34⁺, el número total de células UFC-GM y CI-CLP es mayor en los cultivos con células

mononucleares que con la misma muestra seleccionada y cultivada (Sandstrom *et al.*, 1995). En el ámbito clínico la selección de células CD34⁺ tiene una importante ventaja sobre las no seleccionadas, por ejemplo, el número de células neoplásicas sanguíneas son aparentemente eliminadas, debido a que éstas no presentan dicho antígeno.

Es interesante notar que existen reportes recientes los cuales sugieren que existe una población de células CD34⁺, carente a su vez de marcadores para los diferentes linajes hematopoyéticos, que es probablemente precursora de las células CD34⁺. Esta población ha mostrado además, altos niveles de hematopoyesis humana en un modelo de trasplante xenogénico humano/oveja (CHH de MO y la oveja como hospedero) con una gran cantidad de CD34⁺ entre sus productos (Zanjani *et al.*, 1998).

2.2.3 Cultivos en bioreactores

En esta área el número de reportes existentes va en aumento, no obstante los pocos grupos de investigación que están realizando cultivo y expansión de células hematopoyéticas de diferentes fuentes (sangre periférica, MO y SCU). El estrés al que están sujetas las células en cultivos agitados, además de la aparente necesidad de un soporte, hace difícil el desarrollo de estos sistemas para el cultivo de CH.

2.2.3.1 Cultivos en Perfusión

La perfusión es el modo de operación más utilizado en el cultivo de CH. Esta consiste en la alimentación y retiro continuo de medio de cultivo del bioreactor, manteniendo las células dentro de éste mediante distintos dispositivos. Un arreglo particular estudiado es el reactor de placas paralelas en donde las células se encuentran atrapadas mediante algún filtro. Este sistema ofrece la ventaja de mantener un estroma ya sea formado a partir de la misma muestra, en el caso de MO, o de un estroma preformado de alguna línea celular, en el caso de sangre periférica o de SCU; manteniendo de esta forma a las CH en suspensión. Las ventajas que presenta son la baja concentración de desechos metabólicos y la concentración de nutrimentos prácticamente constante. Sin embargo, esta operación resulta costosa, debido a la gran cantidad de medio alimentado, el cual es subutilizado. Además, el monitoreo *in situ* no es factible. A continuación se resumen los trabajos más sobresalientes en este sistema, así como algunos reportes en cultivos estáticos.

Palsson *et al.* (1993) reportan sobre algunos aspectos como son inóculo inicial por unidad de área, y utilidad del uso de suero autólogo (suero del mismo paciente) utilizando MON. Ellos observaron que el inóculo es inversamente proporcional a la expansión celular y a la expansión de UFC-GM, pero no parece tener efecto sobre los progenitores eritroides. En la evaluación del suero autólogo mostraron que el uso de suero animal promueve una mayor expansión celular que el autólogo, pero no así en la expansión de progenitores mieloides y eritroides, en donde el suero autólogo presentó de 1.16-1.5 veces y de 2.5 a 7 veces más progenitores mieloides y eritroides respectivamente.

El porcentaje óptimo de oxígeno en la fase gaseosa fue también evaluado por Palsson *et al.* (1993) los cuales analizaron tres diferentes concentraciones: 5, 20 y 60 %. La evaluación se hizo sobre la expansión de células totales, progenitores UFC-GM y UFB-e, en donde 20% de O₂ en las tres variables analizadas resultó ser la concentración óptima. Sin embargo, esto último está en contradicción con otro reporte (Koller *et al.*, 1992) en donde evalúan 5 y 20% O₂ con SCU en CLP, usando estroma preformado. Estos últimos observaron que a 5% de O₂ en cultivos suspendidos el decremento celular en CLP es menor que a 20%, así también el número de progenitores UFC-GM y UFB-e es mayor, concluyendo que el efecto positivo de una baja tensión de oxígeno en cultivos suspendidos es comparable al efecto que tiene sobre el cultivo la presencia de un estroma preformado. En este mismo reporte, en cultivos con estroma preformado no se observa diferencia significativa en el número de células viables entre 5 y 20 %, pero en UFC-GM y en progenitores eritroides la expansión es mayor a 5 % de O₂. Concluyen que los bajos niveles de oxígeno incrementan y mantienen a los progenitores UFC-GM, UFB-e y a los más primitivos UFC-Mix, y que estos niveles se encuentran lo más aproximado a los normales en el microambiente *in vivo*. La explicación sobre este efecto positivo es que a bajos niveles de oxígeno se tienen también bajos niveles de glutatión y otros agentes oxidantes, en cambio a altas concentraciones se estimula la formación de niveles altos de metabolitos derivados del oxígeno los cuales inhiben el crecimiento celular. La producción de factores de crecimiento hematopoyéticos es afectada por la tensión de oxígeno y está reportado que la producción de factores inhibitorios como el Inhibidor de la Actividad Granulopoyética y TNF- α puede ser reducida a bajos niveles de oxígeno (Koller *et al.*, 1992).

Por otra parte se ha observado que con MO, el 60% de las células totales se mantienen totalmente suspendidas, 35% ligeramente adheridas (las cuales se desprenden sin

necesidad de tripsinizar) y 5% se adhieren fuertemente (Koller *et al.*, 1993b). La mayoría de los UFC-GM se encuentran en suspensión (99.5% contra 0.47% adheridos) al inicio del cultivo, disminuyendo hacia el final del cultivo (70% en suspensión, 27% ligeramente adheridos y 1.9% totalmente adheridos), a diferencia de los progenitores eritroides los cuales se mantienen adheridos en mayor porcentaje: 18% al inicio y 64% al final del cultivo.

Por otra parte, Schwartz *et al.* (1991) reportan que el cambio rápido de medio en cultivos con MO (50% del volumen diario), incrementa la mielopoyesis si es acompañado de factores estimuladores de crecimiento como IL-3, GM-CSF y EPO, a comparación del control sin recambio rápido. Observan que la producción de UFC-GM se prolongó a través de las 18 semanas que duró el cultivo y obtuvieron 2 veces más progenitores totales que el control a través de 17 semanas. La producción total de UFB-e fue de 1-7 veces mayor que los controles, observada a lo largo del cultivo. Sugieren que el recambio rápido estimula la hematopoyesis mediante un mecanismo independiente y sinérgico a los efectos de los factores añadidos, provocado por el estroma formado, y probablemente a través de la producción de SCF, entre otros.

Reportes sobre el uso de cultivos en perfusión con SCU son escasos debido a que en general se considera necesario tener un estroma preformado de MO, con la finalidad de favorecer el soporte de las CH. Se ha observado que las CH de SCU presentan adherencia temprana a un estroma preformado, y que el porcentaje de progenitores UFC-GM, UFC-e y UFC-Mix es de 26, 39 y 89.3% respectivamente (Koller *et al.*, 1993a). Esta población ha sido usada en cultivos en perfusión usando IL-3, IL-6 y SCF sobre estroma preformado de MON (Koller *et al.*, 1993a). Las expansiones obtenidas en el número total de células fue de 2 veces mayor comparado con el control sin perfusión. La expansión máxima de progenitores encontrada fue de 12 veces para UFC-GM, 5.3 veces para UFC-Mix y 2.3 veces para UFB-e, en cambio para el control únicamente se observó expansión en UFC-GM de 6 veces. Así también la expansión de las CI-CLP en los cultivos en perfusión fue de 2 a 3 veces más que en el control.

2.2.3.2 Cultivos agitados

Debido a que las células animales son frágiles, no es posible exponerlas a esfuerzos de corte altos, como los que se presentan normalmente en el cultivo de bacterias o levaduras.

Así también el suministro de gases debe ser superficial y no por burbujeo para evitar que el rompimiento de las burbujas dañe a las células. Son escasos los trabajos que se han publicado desde 1990 a la fecha usando células hematopoyéticas en cultivos agitados. Estos incluyen cultivos en sistemas agitados, con microacarreadores, con células encapsuladas y bioreactores tipo airlift.

El único trabajo reportado con CH encapsuladas corresponde a Levee *et al.* (1994) quienes realizaron cultivos agitados con células de MO encapsuladas en alginato. Obtuvieron en este sistema expansiones celulares de hasta 24 veces. Observaron formación de colonias de los linajes mieloides y eritroides dentro de las cápsulas y determinaron los tiempos máximos de producción para ambos linajes. Encontraron que los progenitores eritroides son los primeros en aparecer, pero al final del cultivo el 94% de las células fueron de la línea mieloide.

Si bien se sabe que uno de los elementos principales de los CLP es el soporte que brinda a las CH el estroma, éste ha sido estudiado a través del uso de microacarreadores en cultivos en suspensión en el trabajo de Zandstra *et al.* (1994) y en el de Sardonini y Wu (1993). En estos reportes se utilizan frascos agitados con volumen de trabajo de 100 y 250 ml, respectivamente, células de MO no seleccionadas y adición de citocinas. Para evitar el agotamiento de nutrimentos en ambos trabajos se realizaron recambios de medio en diferente proporción y tiempo. El uso de microacarreadores no causó efecto inhibitorio ni estimulador en células totales (Sardonini y Wu, 1993), ni en progenitores evaluados a través del número de UFC o de CI-CLP (Zandstra *et al.*, 1994). Estos cultivos no mostraron diferencias significativas con respecto al control estático (Sardonini y Wu, 1993). Las cinéticas de células totales así como de UFC mostraron un incremento marcado en los primeros 14 días del cultivo, y la expansión neta fue dependiente de la concentración celular inicial, sugiriendo una contribución importante de estimuladores producidos endógenamente.

El sistema airlift ha sido estudiado únicamente por Sardonini y Wu (1993), quienes trabajaron con MO y observaron una expansión celular inferior al control estático. Una de las desventajas que observaron fue formación de espuma y sugieren que la presencia de burbujas afectó negativamente a las células.

Los cultivos agitados son, además de los cultivos en perfusión, en los que se han encontrado mejores expansiones. Sin embargo, son escasos los reportes que se tienen al respecto. Uno de ellos corresponde a Sardonini y Wu, (1993), quienes realizaron cultivos

agitados con MO y adición de citocinas en frascos agitados de 250 ml y los comparan con cultivos estáticos. Reportan expansiones celulares del 60% superiores al control estático. Con respecto a progenitores UFC-GM y UFB-e, la máxima expansión con respecto al número inicial fue de 2.5 y 1.5 veces en los cultivos agitados que en cultivos estáticos respectivamente.

Tabla 4. Datos cinéticos de cultivos de células hematopoyéticas en diferentes sistemas.

Fuente	Sistema utilizado	Expansión celular total	Expansión UFC-GM	μ	Referencia
MON	Estático, cambio frecuente de medio con retiro parcial celular, (+).	3 (acumulada)	8.5 (acumulada)	-	Schwartz <i>et al.</i> , 1991
SCU MON	CLP estáticos, estroma preformado.	-	3.46 (SCU)	-	Koller <i>et al.</i> , 1992
SCU	Perfusión, (+).	2	12	0.069	Koller <i>et al.</i> , 1993a
MON	Perfusión, (+).	11.3	16.5	0.204	Koller <i>et al.</i> , 1993b
MON	Agitados (+)	17	2.5	-	Sardonini y Wu, 1993
MON	Agitados con células encapsuladas, (+).	24	-	0.198	Levee <i>et al.</i> , 1994
MON	Agitados con recambio de medio, (+).	16	-	0.36	Zandstra <i>et al.</i> , 1994
SCU	Agitados, (+)	1.3	-	0.1	De León <i>et al.</i> , 1998

(+) = adición de citocinas. μ = velocidad específica de crecimiento.

Recientemente se ha publicado un trabajo en el cual se diseñó, caracterizó y se aplicó un bioreactor de baja escala (120 ml) para el cultivo de células hematopoyéticas. En este trabajo se usaron CHH de SCU, las cuales se mantuvieron en suspensión y sin la presencia de células estromales. Por medio de este sistema instrumentado, De León *et al.*, (1998) pudieron inferir la concentración y el estado celular del cultivo a través de determinaciones del oxígeno disuelto y del potencial redox del cultivo. Las expansiones celulares fueron de 1.2 y de 1.88

veces en el bioreactor y en el control estático respectivamente. Sin embargo, con respecto a progenitores hematopoyéticos las expansiones fueron de 6 y de 3.6 veces respectivamente.

Collins *et al.* (1997) reportan en cultivos agitados de 100 ml con sangre periférica y SCU, un método para determinar el contenido de UFCs en tiempo real. En este trabajo se observó que las velocidades específicas de consumo de glucosa y producción de lactato (q_{glc} , q_{lac}), correlacionan con el número de progenitores en cultivo. Ellos dividen arbitrariamente al cultivo en dos poblaciones: las UFC y todas las demás células que no son progenitoras y se encuentran en proceso de maduración y diferenciación. Concluyen que las primeras, durante el crecimiento y proliferación, consumen y producen mayor cantidad de glucosa y lactato, respectivamente, que las segundas. Con lo anterior desarrollaron un modelo describiendo la velocidad específica de producción de lactato global en función de la producción específica para cada una de las poblaciones, considerando que las UFC ya no se encontraban en estado quiescente. Con este modelo podría ser posible inferir la concentración de progenitores, sin embargo es necesario conocer los valores de las constantes involucradas en las ecuaciones y que están en función de ciertas condiciones como son: inóculo, tipos y concentraciones de factores de crecimiento, y fuente de CH. Todo lo anterior debe ser determinado en experimentos previos (Collins *et al.*, 1997).

En la Tabla 4 se resumen algunas características de los reportes referidos. Debido a las diferencias en el medio de cultivo, tipo de interleucinas y su concentración, fuente de CH, protocolo de mantenimiento celular y en especial al tipo de sistema usado, la comparación entre los diferentes trabajos debe realizarse con precaución.

2.2.4 Metabolitos tóxicos: amonio y lactato

El amonio es un desecho tóxico en cultivos de eucariotes superiores, se genera intracelularmente durante el metabolismo de la glutamina, y por descomposición espontánea y degradación enzimática de la misma. La inhibición por amonio puede reflejarse como un efecto citotóxico (aumento en la velocidad específica de muerte), un efecto metabólico (disminución de rendimientos) o un efecto cinético (disminución de la velocidad específica de crecimiento) (Ramírez, 1996). La toxicidad y otros efectos del amonio varían dependiendo de la línea celular. Se ha reportado inhibición en el crecimiento celular desde 1 mM para fibroblastos murinos L, 3T3 y células BHK, y hasta de 10 mM para hibridomas. En

hibridomas murinos, se han reportado velocidades específicas de consumo/producción aceleradas de glucosa, glutamina, amonio, lactato y de aminoácidos al aumentar la concentración de amonio (Oztuk *et al.*, 1992). Además algunos trabajos reportan cierta adaptación a concentraciones altas de amonio (Schneider *et al.*, 1995). Se ha observado también que el amonio no tiene influencia sobre la producción específica de anticuerpos (Ozturk *et al.*, 1992) ni sobre el consumo específico de oxígeno (Ozturk *et al.*, 1992; Kimura *et al.*, 1987), sin embargo altas concentraciones de amonio pueden perturbar el procesamiento y la secreción de proteínas así como la glicosilación (Schneider *et al.*, 1995).

Otro metabolito tóxico, el lactato, es principalmente producido por el metabolismo de la glucosa pero también puede ser producido en pequeñas cantidades a partir de glutamina. Se ha reportado que el lactato inhibe el crecimiento celular en sistemas sin control de pH y que esta inhibición es atribuida principalmente a la acidificación del medio. También su inhibición se le atribuye a un aumento en la osmolaridad. Se ha observado que a concentraciones relativamente altas, 55 mM, el lactato reduce el crecimiento celular en hibridomas (Ozturk *et al.*, 1992), en cambio para algunas líneas celulares dependientes de un soporte, el lactato es inhibitorio para el crecimiento celular por arriba de 22 mM (Hassell *et al.*, 1990).

No se tienen reportes de estudios sobre la inhibición del amonio o el lactato en CHH sanas. Sobre las líneas celulares HL-60 (células humanas leucémicas promielocíticas) y la RPMI 8226 (células hematopoyéticas humanas), la inhibición de amonio sobre el crecimiento celular fue de 12 y 10 mM respectivamente (Kimura *et al.*, 1987), estas concentraciones son altas comparadas con aquellas bajo las cuales resultan inhibitorias para otras líneas celulares no hematopoyéticas. La inhibición del lactato sobre las mismas líneas celulares resultó en 16 y 15 mM para HL-60 y de RPMI 8226, respectivamente (Kimura *et al.*, 1987). La falta de información en esta área indica que son necesarios mayores estudios sobre el efecto del amonio y lactato en cultivos de CHH.

2.2.5 Fuente de carbono: glutamina y glucosa

La glutamina junto con la glucosa, son las principales fuentes de carbono y de energía para células animales. En las líneas celulares los patrones metabólicos son diferentes de las células normales con bajo crecimiento, siendo más alta la glicólisis aerobia y la glutaminólisis

en las primeras (Schneider *et al.*, 1995). Así también las células normales en rápido crecimiento, exhiben un metabolismo similar.

La glutamina se encuentra en el medio de cultivo para células hematopoyéticas a concentraciones de 2 a 5 mM, concentración mucho más alta que otros aminoácidos. La glutamina es requerida para la síntesis de purinas, como fuente de energía, así como precursor de α -cetoglutarato en el ciclo tricarboxílico (Crawford y Cohen, 1985). Un alto consumo de glutamina está acoplado aparentemente con un metabolismo ineficiente de glucosa, donde la glucosa es rápida y predominantemente metabolizada hacia la vía glicolítica y excretada como lactato (Schneider *et al.*, 1995). El mayor requerimiento de la glucosa parece ser como fuente de carbono para carbohidratos en el metabolismo anabólico, tales como la síntesis de ácidos nucleicos y polisacáridos. Una considerable cantidad es metabolizada por la vía de las pentosas-fosfato para promover la ribosa-5 fosfato. En células hematopoyéticas la glutamina se ha observado que es esencial en la transformación linfoblástica y en la diferenciación de células plasmáticas, donde se requiere probablemente como fuente de energía y en la síntesis de purinas y pirimidinas (Crawford y Cohen, 1985).

El análisis detallado de estos dos metabolitos así como de la toxicidad del amonio y el lactato no ha sido ampliamente estudiado en cultivos de células hematopoyéticas humanas, debido probablemente a que la atención principal se centra sobre el efecto de los diferentes factores hematopoyéticos. Por lo general en los reportes se usan medios definidos en suero, glucosa (1 g/L) y glutamina (4 mM). En algunos reportes de patentes se limitan a mantener ciertos niveles: glucosa entre 0.9-3.6 g/L, glutamina entre 1-3 mM, lactato por abajo de 35 mM y amonio por abajo de 2.5 mM, siendo el interés principal la expansión de las células hematopoyéticas y la evaluación de la presencia y mantenimiento de células hematopoyéticas muy primitivas.

2.2.6 Suero fetal bovino

El suero fetal bovino (SFB) provee hormonas y nutrimentos esenciales, moléculas de transporte (lipoproteínas y transferrina), macromoléculas que protegen a las células de esfuerzos de corte y cambios de pH fuertes. El SFB contiene enzimas que pueden modificar nutrimentos esenciales, así como factores de crecimiento requeridos para el mantenimiento, diferenciación y proliferación celular. Además el suero altera las propiedades físicas y

fisicoquímicas del medio requeridas para el mantenimiento celular. Su adición al medio de cultivo, provoca que éste resulte de composición indefinida, añade variabilidad, además de que restringe su uso en el área clínica (Sandstrom *et al.*, 1994). Para muchas líneas de células animales, el SFB ha sido eliminado exitosamente al reemplazarlo por una mezcla de componentes definidos, tales como fructuosa, piruvato, transferrina, insulina, etanolamina, selenito y albúmina de suero bovino. No obstante, tales suplementos no han favorecido el crecimiento de CHH, así como tampoco la proliferación de progenitores en cultivo en comparación con aquellos con adición de suero. En cambio la adición de lípidos como colesterol, lecitina o su combinación al medio libre de suero suplementado promueve el crecimiento de CHH, así como la proliferación de progenitores, a niveles comparables a aquellos cultivos adicionados con suero (Oh y See, 1995).

Se han desarrollado diferentes protocolos para elaborar medios libres de suero y su uso en diferentes cultivos celulares, incluyendo linfocitos, monocitos/macrófagos y CH inmaduras (Sandstrom *et al.*, 1994). En cultivos de CHH, el medio libre de suero se ha utilizado principalmente en la caracterización de células CD34⁺ y de subpoblaciones (Mayani *et al.*, 1993). El suero es usado a diferentes concentraciones por diferentes grupos de investigación para el cultivo de CHH. Mientras que en CLP la concentración usada es de 25% (Mayani *et al.*, 1998), en cultivos en perfusión es de 10 % SFB (Sardonini y Wu, 1993), 20% (Koller *et al.*, 1995) o 25% (Sandstrom *et al.*, 1995). Sin embargo, a la fecha, no se tienen reportes del efecto de la suero sobre cinéticas de CH.

No obstante la importancia creciente que tiene el cultivo de CH de SCU, la información referente a cinéticas de crecimiento, consumo de nutrientes y toxicidad de metabolitos, es aún escasa. En este trabajo se caracterizaron algunos aspectos del cultivo de CH de SCU a largo plazo y en lote, pretendiendo con lo anterior ampliar la información en estos aspectos.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Establecer el cultivo y la expansión *in vitro* de células hematopoyéticas humanas obtenidas de sangre de cordón umbilical.

3.2 Específicos

- 1.- Establecer las metodologías para la recolección y procesamiento de muestras de sangre de cordón umbilical, así como para los cultivos clonogénicos de células hematopoyéticas.
- 2.- Establecer el cultivo y la expansión de células hematopoyéticas humanas en Cultivos a Largo Plazo, así como la caracterización de sus cinéticas de crecimiento, consumo de nutrientes y producción de desechos metabólicos tóxicos.
- 3.- Establecer el cultivo y la expansión de células hematopoyéticas humanas en Cultivos Lote Estáticos, así como la caracterización de sus cinéticas de crecimiento, consumo de nutrientes y producción de desechos metabólicos tóxicos.
- 4.- Determinar el efecto de la concentración de substratos, suero fetal bovino, glucosa y glutamina, en cultivos de células hematopoyéticas humanas.
- 5.- Determinar el efecto de los subproductos tóxicos, como el amonio, en cultivos de células hematopoyéticas humanas.
- 6.- Determinar el efecto de la concentración de inóculo en cultivos de células hematopoyéticas.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Recolección de la muestra

Las muestras de sangre de cordón umbilical (SCU) fueron recolectadas en diferentes hospitales a lo largo del proyecto: Hospital 1° de Octubre del ISSSTE en el Distrito Federal, Hospital Militar Regional de Puebla y Hospital Regional Familiar 1 del IMSS de la Ciudad de Cuernavaca.

La recolección de la muestra se realizó de la siguiente forma. Inmediatamente después del parto, el médico ginecoobstetra procede a pinzar el cordón umbilical aproximadamente de 7 a 10 cm del recién nacido y 5 cm de la primera pinza, corta entre las dos pinzas y el recién nacido es retirado para su auscultación por el pediatra (Fig. 2). En ese momento y antes de que la placenta salga del útero, el ginecoobstetra despinza el cordón del lado materno. Debido a los movimientos de contracción de la placenta, la sangre es expulsada por el cordón y recolectada en un tubo de centrífuga estéril (Costar, 3252) o una jeringa estéril con EDTA al 3% (0.8 ml/40 ml sangre) el cual sirve como anticoagulante.

Las muestras que fueron procesadas en las próximas 8 horas fueron mantenidas a temperatura ambiente, y a 4 °C en los casos en los que fue necesario procesarlas hasta un máximo de 24 horas después.

4.2 Procesamiento de la muestra

La muestra se centrifugó a 400g, temperatura ambiente, por 7 min para separar el paquete celular del plasma. Al finalizar, se formaron dos fases, la más pesada en la que se encuentran los eritrocitos y la ligera, formada por plaquetas y plasma principalmente. La interfase entre ellas es llamada "*buffy coat*", y está compuesta por leucocitos entre los que se encuentran los linfocitos y el resto de células mononucleadas (Fig. 3). Esta interfase es una capa muy delgada de color blanco y en ocasiones difícilmente apreciable. Las células mononucleadas (MN) son aquellas que se encuentran principalmente en proceso de diferenciación y maduración (blastos) y dentro de las cuales se encuentran los progenitores hematopoyéticos en sus diferentes etapas.

La interfase fue retirada con una pipeta Pasteur cuidando evitar extraer la zona roja o eritrocitos. Posteriormente esta suspensión celular se diluyó 1:2 con medio IMDM al 2% de

SFB o con solución salina de fosfatos (PBS), la cual está compuesta por KH_2PO_4 (0.21 g/L), NaCl (9 g/L) y Na_2HPO_4 (0.726 g/L). Se determinó la concentración de células MN como se menciona posteriormente.



Fig. 2. Momento previo a la toma de muestra de sangre de cordón umbilical.

Para la separación de las células MN del resto de los leucocitos, se realizó un gradiente de Ficoll. La interfase diluida se colocó sobre Ficoll (Ficoll-Paque PLUS, Pharmacia Biotech 17-1440-02) previamente añadido a tubos de centrifuga de 15 ml (Costar, 3218), de tal forma que resbalase por las paredes del tubo cuidando de no mezclar la muestra con el reactivo. La relación volumen de Ficoll/suspensión celular fue aproximadamente de 4:8. El gradiente se centrifugó a 700g por 20 min. El Ficoll-Paque tiene una densidad de 1.077 ± 0.001 g/ml, la cual está por arriba de la densidad de las plaquetas y células MN, muy cercana a la de los granulocitos y monocitos, y por abajo de la densidad de los eritrocitos. El gradiente se observa en la Fig. 3, donde el plasma conteniendo a las plaquetas se encuentra en la parte superior seguido de una capa delgada compuesta por las células MN, sobre el Ficoll, en éste están contenidos los monocitos. Finalmente en el fondo del tubo se forma un paquete celular rojo compuesto por los eritrocitos. Las células MN fueron separadas de eritrocitos remanentes, plaquetas, macrófagos y granulocitos. Las células MN se lavaron dos veces colocando PBS o medio IMDM al 2% de SFB en la suspensión celular hasta completar aproximadamente 12 ml. Se centrifugó a 400g por 7 min. El paquete celular final se resuspendió en medio IMDM al 2 ó

10% de SFB, y se determinaron células MN, totales (to: células MN más eritrocitos), viabilidad y relación MN/to como se menciona posteriormente.

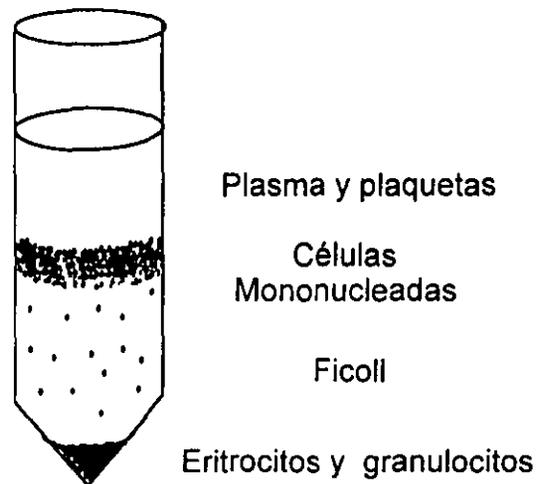


Fig. 3. Gradiente de Ficoll

4.3 Medio de cultivo

Se utilizaron tres diferentes tipos de medios para los cultivos líquidos: medio LTBMCM, IMDM y DMEM suplementado. Para los cultivos semisólidos se utilizó medio Metho Cult.

El medio LTBMCM (Long Term Bone Marrow Culture, Myelo Cult H5100; Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá), está constituido por medio Alpha MEM, 12.5 % suero de caballo, 12.5% SFB, 0.2 mM p-inositol, 20 μ M ácido fólico, 10^{-4} M 2- β mercaptoetanol, 2 mM L-glutamina y fue suplementado posteriormente con hidrocortisona (1×10^{-6} M). Este medio fue utilizado principalmente en CLP sin adición de citocinas, debido a que la combinación de sueros favorece la formación de estroma.

El medio de cultivo base en los cultivos lote fue IMDM (Medio Dulbecco modificado por Iscove, Sigma I 7633), la composición se muestra en el apéndice A. Este se prepara disolviendo en agua MiliQ estéril el contenido del frasco y suplementándolo con bicarbonato de sodio (3.02 g/L), solución antibiótica/antimicótica (Sigma A-9909) (1% v/v), 2 β -mercaptoetanol (1×10^{-7} M) y excepto cuando se mencione lo contrario, suero fetal bovino (Sigma F2442) (10 % v/v). En todos los cultivos se utilizó el mismo lote de SFB, con la finalidad de evitar variaciones experimentales por la fuente de SFB utilizada. Se esteriliza por filtración (membrana Millipore, 0.22 μ m) y se conservó a 4 °C, o sin adición de SFB a -20 °C.

Debido a los requerimientos experimentales, fue necesario utilizar un medio libre de glucosa y glutamina. No se encontró en el mercado IMDM con las anteriores características por lo que se utilizó medio DMEM, (Medio Eagle modificado por Dulbecco, Sigma D-5030) cuya composición se muestra en el apéndice A, y se suplementó (DMEM-suplementado) con rojo de fenol, ácido pirúvico, HEPES, nitrato de potasio, selenito de sodio, L-alanina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-ácido glutámico, L-prolina, L-biotina y cianocobalamina (B12), a las mismas concentraciones que las encontradas en el IMDM. Se mantuvieron las diferencias en 3 componentes: cloruro de calcio, cloruro de potasio y nitrato férrico, las cuales fueron mínimas. El medio DMEM se prepara de la misma forma que el IMDM, y fue usado en cultivos lote. Soluciones concentradas de glucosa y glutamina fueron adicionadas posteriormente de acuerdo a las necesidades experimentales.

El medio Metho Cult (GF H4434, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá), está constituido por 0.9% metilcelulosa en IMDM, 30% SFB, 1% albúmina bovina de suero, 10^{-4} mM 2 β -mercaptoetanol, 2 mM L-glutamina, y las siguientes interleucinas recombinantes humanas: 50 ng/ml SCF, 10 ng/ml GM-CSF, 10 ng/ml IL-3 y 3 U/ml EPO. Se conserva a -20 °C. Este medio se utilizó para realizar ensayos clonogénicos de progenitores hematopoyéticos y también fue usado para enriquecer los medios IMDM, LTBMCM y DMEM suplementado como fuente alternativa de factores de crecimiento.

El medio condicionado comercial (Human Giant Cell, Sigma M7657) se utilizó como fuente de factores de crecimiento en cultivos a largo plazo, sin embargo, no se tuvo la composición debido a que es confidencial y no fue proporcionada por el proveedor.

4.4 Enriquecimiento de medios

Los medios DMEM-suplementado, IMDM y LTBMCM se enriquecieron de acuerdo a los requerimientos experimentales con medio Metho Cult, medio condicionado o con interleucinas humanas recombinantes solubles. Para lo anterior el medio Metho Cult y el medio condicionado comercial fueron utilizados al 8 y 10%. La composición final de interleucinas con Metho Cult al 10% fue de SCF: 5 ng/ml, GM-CSF: 1 ng/ml, IL-3: 1 ng/ml y se ajustó EPO a 3 U/ml. En las ocasiones que se utilizaron interleucinas humanas recombinantes solubles, estas fueron IL-3 e IL-6 (Promega, Co.), SCF (Peprotech), EPO (Silag) y GM-CSF (Probiomed, S. A. de C. V.).

4.5 Criopreservación celular

Después del tratamiento inicial y de la separación con Ficoll-Paque, el botón celular se resuspendió en solución salina Hanks (Gibco 14175-095) hasta tener un volumen de 4 ml, al cual se le añadieron 2 ml de SFB. Se le agregó Dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma D-2650) a una concentración final de 10% v/v y fue alicuotado en viales para congelar. Estos se congelaron gradualmente, hasta llegar a una temperatura de -140° C, conservándose en nitrógeno líquido.

4.6 Descongelación celular

En aquellos casos en que se utilizaron células MN criopreservadas, se siguió el siguiente procedimiento. El vial conservado en nitrógeno líquido se transfirió a un baño de 37 °C. Una vez descongelado por completo, la suspensión celular se depositó inmediatamente y con cuidado en 3 ml SFB, con el cual se homogeneizó; ya resuspendida se añadió IMDM hasta completar 12 ml. Nuevamente se homogeneizó y se lavó dos veces con IMDM al 2% de SFB a 400g por 7 min.

4.7 Determinación de progenitores hematopoyéticos

4.7.1 Ensayos clonogénicos

La suspensión celular con el número de células MN deseada se inoculó en 1 ml de medio Metho Cult previamente alicuotado en viales. Para la determinación de progenitores en la muestra ya procesada, el inóculo para los ensayos clonogénicos fue de 40000 a 50000 células MN/ml. Para la determinación de progenitores en los cultivos líquidos, el inóculo para los ensayos se ajustó de 20000 a 40000 células MN/ml. Este inóculo se ajustó de acuerdo a las características celulares observadas durante los experimentos y que dependieron del tipo de cultivo (largo plazo o lote, con o sin adición de citocinas), del día del cultivo (considerando que en cultivos con adición de citocinas, de los días 8 al 13 la relación progenitores/células MN aumenta) y de la viabilidad y el aspecto físico. Se evitó inocular un número excesivo de células para evitar la sobreposición de las colonias y poder diferenciarlas visualmente unas de otras.

Una vez inoculadas las células, se agitó la suspensión vigorosamente con ayuda de un vortex por algunos segundos (2-3 s), con el fin de homogeneizarla. Lo anterior es

recomendable debido a la consistencia viscosa del medio Metho Cult. El volumen del inóculo al medio Metho Cult no excedió los 100 μ l con la finalidad de mantener la consistencia adecuada del cultivo y evitar la posterior disgregación de las colonias. El medio inoculado se colocó uniforme y lentamente en una caja Petri de 35 mm (Costar, 3035), evitando la formación de burbujas y de tal forma que no quedara medio en la punta de la pipeta. La caja inoculada se colocó dentro de otra de 120 x 20 mm (Costar, 3100) con agua destilada estéril en una segunda caja Petri de 35 mm, para mantener el ambiente lo más húmedo posible. Los cultivos se mantuvieron a 37° C y 5 % CO₂ por 14 días, fecha en la que se contaron las colonias reconocibles por su morfología.

4.7.2 Identificación y cuantificación de progenitores

No obstante que en la literatura se han establecido los criterios generales de identificación para las UFC (Eaves y Eaves, 1984; Coutinho *et al.*, 1993) cada laboratorio establece sus criterios particulares. Aunado a esto, el tipo y concentración de interleucinas difiere al realizar los ensayos clonogénicos entre laboratorios. Por lo tanto, la comparación de resultados con respecto al número y tipo de UFC entre diferentes laboratorios o grupos debe realizarse con precaución. Para disminuir el error experimental, dentro de nuestros propios análisis se usó un solo tipo de medio comercial (MethoCult). No es posible identificar los progenitores megacariocíticos bajo estas condiciones, debido a que no es el medio ideal para su crecimiento.

Los criterios que se usaron para la identificación visual de colonias hematopoyéticas fueron: color de la colonia (rojizo o blanco-transparente), número aproximado de células o tamaño aparente de la colonia y morfología de las células. La identificación de las colonias se realizó en el día 14 del ensayo clonogénico. Es importante no exceder este tiempo debido a que las células empiezan a morir y la morfología y apariencia de la colonia cambia. El objetivo del microscopio normalmente usado fue 4X y en aquellos casos en los que fue necesario establecer diferencias entre colonias fueron útiles los objetivos 10X y 20X. Los progenitores de la línea linfóide, no forman colonias en medio Metho Cult, por lo cual no fueron considerados. A continuación se describen las características de los progenitores evaluados cuya nomenclatura se presenta en la página ix. Al final de este capítulo se muestran fotos de las colonias características observadas en estos cultivos.

Progenitores eritroides: forman colonias de tonalidades rojas en cultivos semisólidos de metilcelulosa o agar. Las UFB-e representan a progenitores muy primitivos con un gran potencial de proliferación, generalmente forman colonias grandes y muy densas en uno o más grupos los cuales varían en número (Figs. 4 y 5). Entre mayor es el número de grupos o cuando son colonias con una gran concentración celular, los progenitores eritroides son más primitivos. Las UFC-e, provienen de progenitores tardíos y son colonias con una baja densidad celular, forman de 1 a 2 grupos y contienen menos de 100 células. Después de 14 días en cultivo, las colonias eritroides empiezan a envejecer y las células que lo conforman a morir, dando lugar a colonias de tonalidades rojas-cafés. Estas son cada vez más oscuras y difíciles de cuantificar, y pueden confundirse con colonias de granulocitos.

Progenitores monocíticos y granulocíticos: forman colonias blancas- translúcidas. Las UFC-M están formadas por monocitos (Fig. 6). Estos son células grandes cuyo diámetro es de 15 a 20 μm . Dependiendo del potencial, estos progenitores pueden formar colonias densas, y por lo tanto semiobscuras, o bien colonias dispersas con un número reducido de células. En los extremos de las colonias se pueden observar células con ligeras características fibroblastoides. Las UFC-G están formadas por granulocitos y se observan como agregados de células pequeñas, transparentes y generalmente concéntricas (Fig. 7). Tanto las UFC-M como las UFC-G son progenitores tardíos y comprometidos a un linaje específico.

Las *UFC-GM* son progenitores tempranos y semicomprometidos a los dos linajes anteriores: granulocitos y monocitos, así que sus colonias contienen ambos tipos celulares (Fig. 8). En estas colonias las células granulocíticas generalmente se aglomeran al centro y las monocíticas en la periferia. Las UFC-GM también pueden formar colonias dispersas y homogéneas.

Las *UFC-Mix* son progenitores primitivos que dan lugar a células eritroides y mieloides (granulocitos y monocitos). Por lo que sus colonias tienen tanto tonalidades rojas (de eritrocitos hemoglobinizados) como blancas (de mieloides) (Fig. 9). Son por lo tanto precursores de las UFC-GM. La parte mieloides de las UFC-Mix está conformada mayoritariamente por alguna de las dos líneas: granulocítica o monocítica. Es común que las UFC-Mix tengan una gran proporción de eritroides por lo que pueden ser equivocadamente confundidos como UFB-e.

4.8 Cultivos a Largo Plazo

Se inocularon 3×10^6 células MN/ml en 1 ml de medio LTBMCM y se colocaron en los pozos centrales de una placa de 24 pozos (Costar, 2524). De cada una de las muestras, se inocularon 8 pozos. En el día 0, se realizaron ensayos de colonias, como se describió anteriormente. Las condiciones de los cultivos fueron: 5 % de CO_2 a 37°C por tres días y a 33°C el resto del tiempo en que duró el cultivo. El cambio a una temperatura menor (33°C) al tercer día ha sido definido empíricamente y aparentemente es benéfico para el desarrollo del estroma en cultivos de MON (Eaves *et al.*, 1991). En los días 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 y 63 se homogeneizaron los cultivos con una micropipeta, evitando tocar con la punta de la misma el fondo del pozo donde se encontraba la capa estromal. En estos días se recambió el medio: la mitad de la suspensión celular por 0.5 ml de medio fresco. De la suspensión celular se determinó, concentración celular, viabilidad y progenitores hematopoyéticos. Se centrifugó la suspensión celular para determinar glucosa y lactato del sobrenadante.

En los días 21, 35, 49 y 63, se determinaron células adherentes de la siguiente forma: se retiró el total de la suspensión celular, se incubó con tripsina el pozo por 7-10 min, se inactivó con suero o con medio IMDM al 2% de SFB, se desprendió la capa adherente con ayuda de un raspador (Costar, 3010), y se procedió al contéo de células adherentes. Se realizó ensayo de colonias para determinar progenitores hematopoyéticos adheridos al estroma formado.

4.9 Cultivos a Largo Plazo con adición de citocinas

En el día 0, se realizó ensayo de colonias, como se describió anteriormente. Para evaluar el efecto del medio condicionado a diferentes concentraciones en células criopreservadas, se realizaron CLP bajo las condiciones anteriormente descritas (1 ml volumen inicial, 37°C y 5 % de CO_2 , y cambio a 33°C al tercer día). Para evaluar el efecto del medio condicionado y del medio Metho Cult en células sin criopreservar, se realizaron CLP con medio LTBMCM enriquecido con ambos medios al 8 y 10 %. Las condiciones de cultivo fueron: volumen 1 ml en placas de 24 pozos a 37°C y 5 % de CO_2 . Estos cultivos se realizaron a 37°C considerándose que el efecto principal sobre las células sería la presencia de los factores hematopoyéticos. En los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42 se homogeneizó el cultivo con micropipeta y se recambió el medio: la mitad de la suspensión celular por 0.5 ml de medio fresco. De la

suspensión celular se determinó, concentración celular, viabilidad y progenitores hematopoyéticos. Se centrifugó la suspensión celular y del sobrenadante se determinó glucosa y lactato. Por inspección visual en el microscopio no se observó formación evidente de capa adherente por lo que no se determinó la concentración celular en esta zona.

4.10 Cultivos Lote

El inóculo varió entre 0.7 y 3×10^6 células MN/ml. Para la evaluación del tamaño del inóculo, este varió entre 0.06 y 0.8×10^6 células MN/ml. Se inoculó 1 ml en placas de 24 pozos a 37 °C y 5 % de CO₂. El tiempo de duración de estos cultivos no fue mayor a 35 días. Para la caracterización de las cinéticas en cultivos lote se utilizaron los medios: IMDM 10% SFB y LTBMCM, sin citocinas o con citocinas enriqueciendo los medios con Metho Cult al 10% o bien con la adición de citocinas solubles. Para determinar células adherentes en placas multipozos se utilizó uno de ellos de la forma anteriormente descrita. De la muestra se determinaron: células suspendidas MN, to y viabilidad. La suspensión celular se centrifugó a 400g por 7 min, el sobrenadante se almacenó a -20 °C de donde se determinaron posteriormente glucosa, lactato, glutamina y amonio. En los experimentos en los que se evaluó el efecto de la concentración inicial de glucosa y glutamina, se utilizó el medio DMEM-suplementado y se le añadió soluciones concentradas de glucosa (D-glucosa, Sigma G-7021) y glutamina (L-glutamina, Sigma G1517) de acuerdo a los requerimientos experimentales. En los experimentos en los que se evaluó el efecto tóxico del amonio, se adicionó al cultivo una solución concentrada de cloruro de amonio (Sigma, A0171).

4.11 Métodos analíticos

4.11.1 Determinación de la concentración celular

La concentración de células MN fue determinada por el conteo de células previamente diluidas con una solución de ácido acético al 3%, conocida como líquido de Turk, usando un hematocitómetro. Esta solución rompe a los eritrocitos y el resto de las células se identifican como células MN. Esta solución aparentemente no rompe a las células muertas y cuando la viabilidad de la muestra es inferior al 90% puede caer en errores en el conteo de células vivas MN. En los cultivos en los que no se añadió citocinas (en los que la viabilidad podía decrecer significativamente) y en las etapas en las que la mayoría de las células rojas habían

desaparecido (observación visual), se decidió utilizar para el conteo celular, el método de exclusión con azul de tripano.

Con este método se determinó la viabilidad celular y el número de células to vivas, en donde las células muertas se tiñeron de azul. La viabilidad es el porcentaje de las células vivas del total de células (vivas y muertas). Se utilizó para ambas determinaciones un microscopio Fisher Micromaster a 10X y un hematocitómetro.

4.11.2 Determinación de glucosa, lactato, glutamina y glutamato

Las concentraciones de glucosa, lactato y glutamina fueron determinadas enzimáticamente en un analizador YSI (2700 Select, Yellow Systems Instruments). Este analizador utiliza membranas con enzimas inmovilizadas, las cuales son específicas para cada uno de los metabolitos. Las enzimas catalizan la reacción entre la muestra y oxígeno, formando entre otros componentes, peróxido de oxígeno. El sensor cuantifica el peróxido de oxígeno el cual es proporcional al metabolito de interés.

4.11.3 Determinación de Amonio

El amonio es cuantificado de acuerdo a la metodología desarrollada por Villaseñor (1998) basada en el método del indofenol propuesto por Kaplan y modificada para intensificar la sensibilidad del método a concentraciones menores a 6 mM (Villaseñor, 1998).

4.11.4 Determinación de Aminoácidos

El análisis de otros aminoácidos fue realizado en un Analizador de Aminoácidos Beckman. El protocolo utilizado se realizó de acuerdo a lo reportado previamente (Higareda, 1994). Las concentraciones de aminoácidos se determinaron en base a las curvas patrón (Higareda, 1994).

4.12 Consideraciones matemáticas

4.12.1 Determinación de la velocidad específica de crecimiento y de muerte aparentes

La velocidad específica de crecimiento aparente (μ) se refiere a una tasa de crecimiento celular observada. De la misma forma, la velocidad específica de muerte aparente (k_d) es una tasa de muerte celular. La μ o la k_d fueron evaluadas en CLP entre cada uno de los recambios de medio de acuerdo a la ecuación:

$$\ln \frac{x_i}{x_0} = \mu(t) \quad (1)$$

donde μ es la pendiente de la recta formada por el logaritmo natural de x_i/x_0 contra el tiempo; x_i , es la concentración celular antes del recambio de medio, y x_0 es la concentración celular calculada en el periodo anterior después del recambio. Si la pendiente es negativa, entonces el cultivo muere y nos referimos a la k_d .

En cultivos lote, la μ fue evaluada en la fase exponencial, donde x_i es la concentración celular en el tiempo i (t_i), y x_0 es la concentración celular al inicio de ésta fase.

4.12.2 Expansión celular

La expansión celular en un determinado tiempo es la relación entre la concentración celular final y la inicial, en CLP se calculó de la siguiente forma:

$$\text{expansión} = \frac{x_i}{x_{\text{calc. } i-1}} \quad (2)$$

donde x_i es la concentración celular antes del recambio, y $x_{\text{calc. } i-1}$ es la concentración celular en el periodo previo después del recambio. $x_{\text{calc. } i-1}$ es un valor calculado ya que por limitación de muestra, solamente se determina la concentración celular antes del recambio para cada periodo. La expansión celular es calculada entre dos periodos, es decir cada 7 días.

En cultivos lote, $x_{\text{calc. } i-1}$ es igual a x_0 , donde x_0 es la concentración celular del inóculo.

4.12.3 Expansión de progenitores

La expansión de progenitores fue calculada con respecto al número encontrado al día 0 de la siguiente manera:

$$\text{expansión} = \frac{\text{UFC}_i}{\text{UFC}_0} \quad (3)$$

4.12.4 Consumo o producción volumétricos de glucosa o lactato

El consumo volumétrico de glucosa en CLP se calculó de la siguiente forma entre cada uno de los recambios:

$$Q_{\text{glc}} = \frac{((V_{\text{rec}} * \text{Glc}_i + V_{\text{rec}} * \text{Glc}_{\text{medio}}) - V * \text{Glc}_j)}{V * t} \quad (4)$$

donde Q_{glc} , es el consumo volumétrico de glucosa, V_{rec} , es el volumen de recambio y es igual $0.5V$; V es el medio total del cultivo; Glc_i , es la concentración de glucosa remanente antes del

recambio en el primer periodo; Glc_{medio} , es la concentración de glucosa en el medio de cultivo; Glc_j es la concentración de glucosa al final del periodo siguiente; y t es el lapso de tiempo entre cada uno de los recambios el cual es igual a 7 días.

De la misma forma para la producción de lactato:

$$Q_{lac} = \frac{(V * Lac_j - (V_{rec} * Lac_i + V_{rec} * Lac_{medio}))}{V * t} \quad (5)$$

donde Q_{lac} , es la producción volumétrica de lactato; Lac_i , es la concentración de lactato remanente antes del recambio en el primer periodo; Lac_{medio} , es la concentración de lactato en el medio de cultivo y Lac_j es la concentración de lactato al final del periodo siguiente.

4.12.5 Consumo o producción específicos de glucosa o lactato

El consumo específico (q_{glc}) de glucosa o la producción específica de lactato (q_{lac}) se calculó de la siguiente forma en CLP:

$$q_i = \frac{Q_i}{X_{prom}} \quad (6)$$

donde Q_i es el consumo o producción volumétrico del compuesto i (glucosa o lactato), y X_{prom} es la concentración de células promedio en cada periodo.

En cultivos lote:

$$q_{glc} = \mu Y_{glc/x} \quad (7)$$

donde $Y_{glc/x}$, es la pendiente de un gráfico de la concentración de glucosa contra el número de células correspondiente.

4.12.6 Consumo o producción específicos de glucosa o lactato de células adherentes

Se desarrolló un análisis para calcular los consumos y producción específicos de glucosa y lactato respectivamente para células suspendidas y adherentes, de acuerdo a:

$$q_t = q_s + q_a \quad (8)$$

donde q_t el consumo específico global y es igual a la contribución de los consumos específicos de células suspendidas, q_s , y de células adherentes, q_a . Las contribuciones parciales fueron calculadas para el periodo comprendido entre el día 28 y el 35, mediante el método de Gauss-Jordan.

4.12.7 Rendimiento de lactato con respecto a glucosa

El rendimiento de lactato con respecto a glucosa, $Y_{lac/glc}$, es la pendiente de un gráfico de lactato contra glucosa.

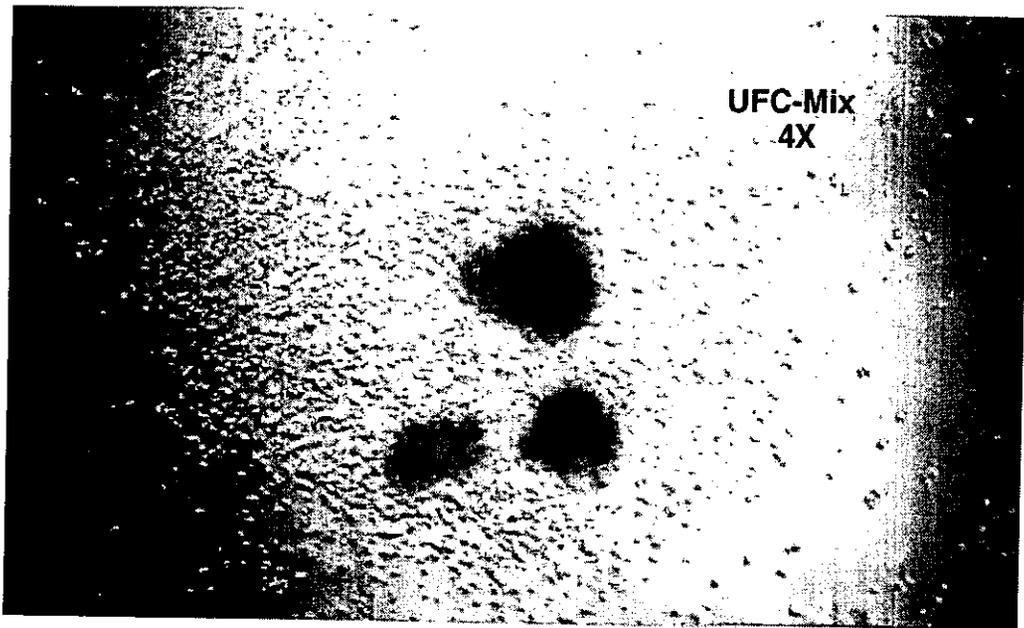


Fig. 4. Unidad Formadora de Colonias Multipotentes (UFC-Mix). Colonias de alta densidad celular. Al centro se observan tres grupos eritroides, alrededor, células del linaje mieloide, las cuales son principalmente monocíticas. Ampliación 4X.

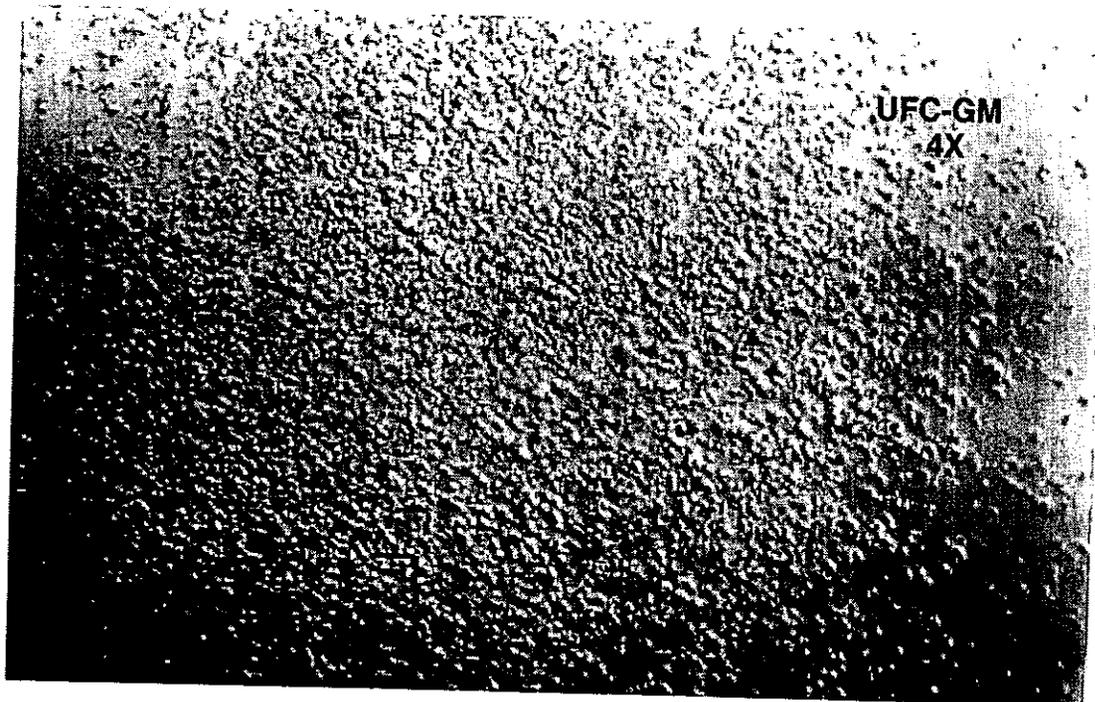


Fig. 5. Unidad Formadora de Colonias Monocíticas-Granulocíticas (UFC-GM). Colonias primitivas de alta densidad celular. Al centro células principalmente del linaje granulocítico. En la periferia, células principalmente del linaje monocítico. Ampliación 4X.

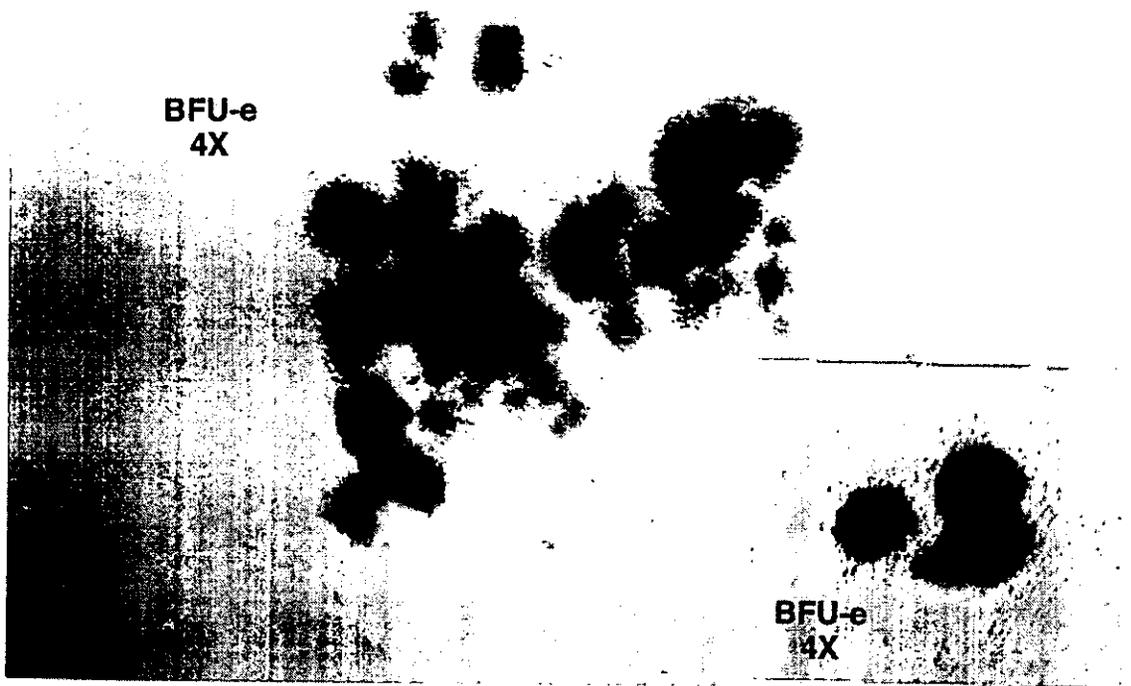


Fig. 6. Unidad Formadora de Colonias Eritroides Primitiva (UFB-e) 4X. Colonias de tonalidades rojas con alta densidad celular. La colonia de la izquierda es más primitiva, con un mayor número de grupos celulares. La colonia de la derecha es más joven debido a su tono brillante. Ampliación 4X.



Fig. 7. Unidad Formadora de Colonias Eritroides Primitiva (UFB-e) 10X. Colonia primitiva y joven formada por tres principales grupos. Ampliación 10X.

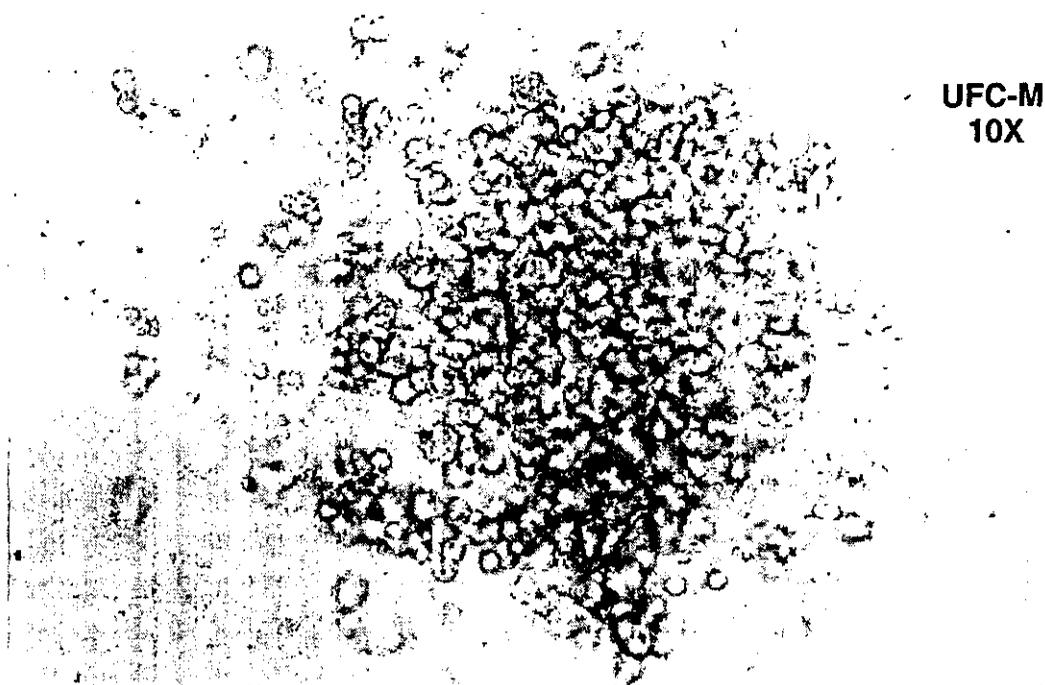


Fig. 8 Unidad Formadora de Colonias Monocíticas (UFC-M).
Colonias de baja densidad celular formada por células grandes
y dispersas. Ampliación 10X.

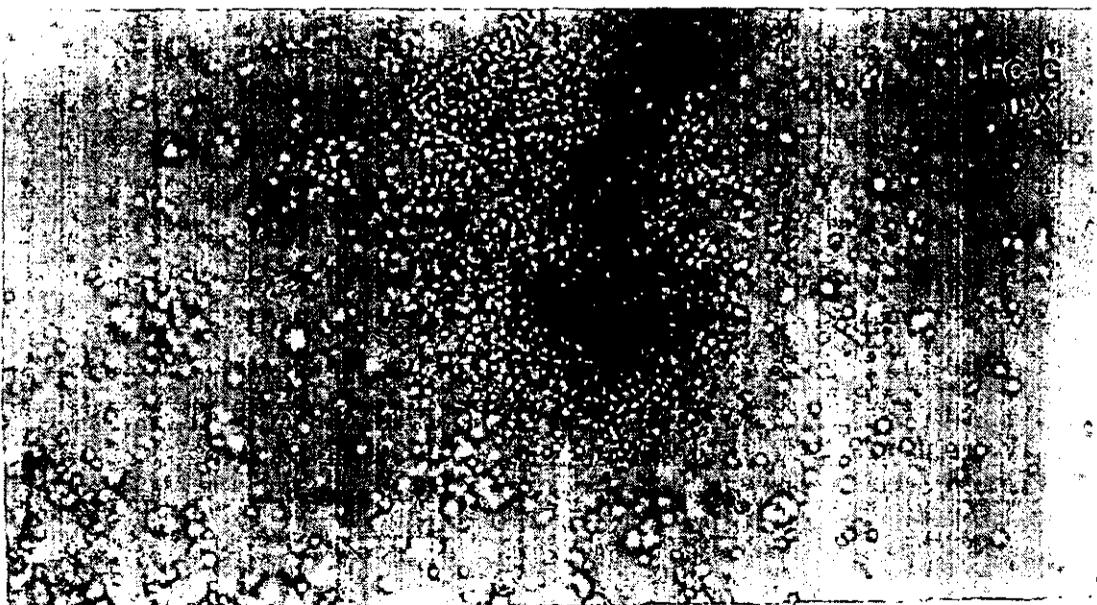


Fig. 9 Unidad Formadora de Colonias Granulocíticas (UFC-G).
Colonias formadas por células pequeñas, redondas y brillantes.
Ampliación 10X.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Establecimiento de técnicas de recolección y procesamiento de muestras de sangre de cordón umbilical

5.1.1 Recolección de las muestras

La recolección de las muestras presentó problemas inherentes, algunos de ellos repercutieron en los tiempos disponibles para el desarrollo de los experimentos. Un problema constante para la recolección de muestras de sangre de cordón umbilical (SCU), fue la obtención de permisos en algunos hospitales para el acceso al área de ginecoobstetricia. Las primeras muestras se obtuvieron en el Hospital 1° de Octubre del ISSSTE en la Ciudad de México. Posteriormente, se buscaron fuentes alternas como el Hospital Militar Regional de la Ciudad de Puebla (aumentando el tiempo y costo de la toma de muestra), y el Hospital Regional Familiar 1 (HRF-1) del IMSS, de la Ciudad de Cuernavaca. En éste ultimo, se estableció un convenio de colaboración entre el Instituto de Biotecnología-UNAM a través del Grupo del Dr. O. Tonatiuh Ramírez y el HRF1-IMSS. Actualmente se cuenta con la autorización formal de la Dirección del HRF1-IMSS a través del Jefe de Enseñanza.

Otra característica inherente fue con respecto a los periodos de nacimientos, los cuales son impredecibles y se ha observado que existen épocas en el año en que se incrementan o decrecen. Por otra parte, en los partos por cesárea no se recolecta la SCU por restricciones del hospital. Por lo tanto, la probabilidad de obtener una muestra en un día de baja natalidad es reducida.

El volumen de sangre recolectado directamente del cordón umbilical fue variable y dependió de la extensión del mismo y de los requerimientos del experimento particular a realizar. En general para los experimentos realizados, una muestra de 40 ml fue suficiente. En la Tabla 5, se mencionan las características observadas en las muestras de SCU.

La recolección de muestras de SCU se realizaron generalmente en un solo tubo de 50 ml. Algunas de las muestras con un volumen superior, no fueron recolectadas en su totalidad. En aquellas ocasiones en que se recolectó el total de la muestra, se observó que el volumen máximo posible puede ser hasta de 100 ml, dependiendo del tamaño del cordón umbilical.

Tabla 5. Características generales de muestras de sangre de cordón umbilical.

Características	Promedio \pm desviación estándar
Volumen recolectado, n= 20	39.8 \pm 8.9 ml
Número de células MN recuperadas en la primera separación /ml de muestra original, (centrifugación inicial), n=14	6.35 \pm 4.7 x 10 ⁶ MN/ml
Número de células MN totales en la segunda separación (Ficoll Paque PLUS)/ml de muestra original, n= 14	2.1 \pm 1.5 x10 ⁶ MN/ml
Porcentaje de recuperación de células MN al final del procesamiento, n=13	39.1 \pm 25.9 %
Porcentaje de células MN recuperadas en muestras criopreservadas con respecto al número inicial almacenado, n=2	44.9 \pm 6.5 %
Viabilidad en muestras criopreservadas, n=2	80.7 \pm 0.7 %
Contaminación en el momento de recolección o durante el procesamiento de la muestra, n=37	5.4 %

MN=células mononucleares, n= número de muestras de SCU.

La recolección del total de la muestra de un cordón umbilical en varios tubos, puede implicar una mayor manipulación, lo cual equivale a aumentar el riesgo de contaminación. Para evitar tal efecto sería recomendable usar tubos, frascos o bolsas estériles con mayor capacidad.

5.1.2 Características de las muestras

El volumen recolectado de SCU promedio fue de 39.8 \pm 8.9 ml. Los niveles promedio observados en otros países por otros grupos de investigación han sido alrededor de 100 ml (Wagner, 1994; McAdams *et al.*, 1996b) y 79 \pm 26 ml (n=574) (Kogler y Callejas, 1996), algunos otros reportan volúmenes menores: 56.3 \pm 2.4 ml (Broxmeyer *et al.*, 1989). El número de células mononucleares (MN)/ml recuperadas en la centrifugación inicial (también denominadas como células no fraccionadas) comparado con lo reportado por Broxmeyer *et al.* (1989) resultó en 2.2 veces menor. El número promedio de células MN totales recuperado de las muestras de SCU fue de 8.6x10⁷, donde el nivel menor se encontró en 2.3x10⁷ y el mayor

en 3.2×10^8 células MN totales en 40 y 52 ml de muestra respectivamente. En otros estudios se reportan recuperaciones de hasta $8.50 \pm 0.05 \times 10^8$ de células nucleadas¹ (n= 574), en volúmenes promedio de 79 ml (Kogler y Callejas, 1996).

Por otra parte el porcentaje de recuperación de células MN en la interfase de células ligeras (segunda centrifugación) con respecto a las recuperadas en la interfase celular primaria (buffy coat) (primera centrifugación) fue de 39.1 ± 25.9 %. El nivel inferior es comparable con otros estudios: 15.1 ± 0.9 %, en donde también se menciona (datos no mostrados) que esta recuperación es mucho menor para SCU que la observada para MO y sangre periférica (Broxmeyer *et al.*, 1989).

Se observó al final del procesamiento de algunas muestras una alta concentración de células eritroides en el inóculo. La contaminación por células eritroides es indeseable debido a que éstas consumen parte de los metabolitos y factores de crecimiento presentes (EPO) en el medio (cuando éste ha sido enriquecido con interleucinas). Esta contaminación se debe a que los eritrocitos inmaduros parecen tener una densidad muy cercana a la de las células MN, disminuyendo el porcentaje de las últimas en el momento de su selección en el gradiente de Ficoll. Para disminuir el número de células eritroides en el procesamiento de las muestras, durante la selección de las células MN con Ficoll-Paque se evitó tomar la zona donde se encontraba el Ficoll, es decir, por debajo de la zona de células MN.

5.1.3 Características de las células hematopoyéticas de SCU

El porcentaje de progenitores evaluados como unidades formadoras de colonias (UFC) encontrado en 25 muestras de SCU se observa en la Fig. 10. El mayor porcentaje corresponde a los eritroides totales (UFB-e y UFC-e) con 57.7%, el 31% corresponde a los progenitores mieloides tardíos (UFC-M y UFC-G) y los progenitores mieloides tempranos (UFC-GM) se encontraron en un 7.3%. Los progenitores multipotentes (UFC-Mix) tienen un bajo porcentaje entre los progenitores totales: 4.3%. Otros estudios han determinado que los progenitores UFC-GM en SCU se encuentran dentro del límite inferior de UFC-GM encontrados en MO (Broxmeyer *et al.*, 1989), los datos obtenidos en tal reporte no son

¹ El término nucleadas, en algunos reportes se refiere a lo que aquí se ha definido por células MN.

comparables a los encontrados por nosotros debido a que el medio para los ensayos clonogénicos fue diferente.

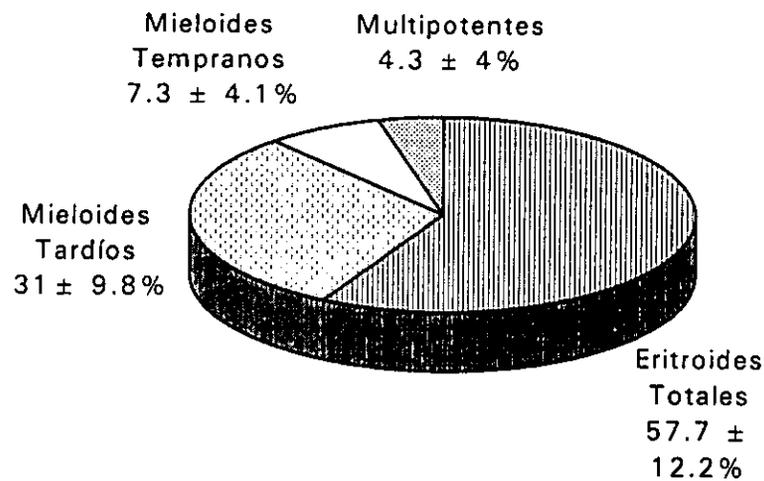


Fig. 10. Porcentaje de progenitores hematopoyéticos en muestras de sangre de cordón umbilical, n=23.

La concentración de progenitores totales encontrada en 9 muestras de SCU (muestras con datos de volumen y progenitores adquiridos), fue de $6.2 \pm 4.4 \times 10^3$ células/ml, de los cuales $0.36 \pm 0.4 \times 10^3$ células/ml fueron UFC-Mix (Fig. 11), $2.4 \pm 1.6 \times 10^3$ células/ml progenitores mieloides totales (UFC-G, UFC-M y UFC-GM), y $3.5 \pm 3.0 \times 10^3$ células/ml progenitores eritroides totales. La gran variabilidad entre las muestras, observada también por Broxmeyer *et al.* (1989), está implícita en las desviaciones estándar mostradas.

El número mínimo de células MN necesarias para ser transplantadas a un paciente es de $0.9-2 \times 10^8$ células/kg de peso corporal o bien por lo menos de 0.5 a 2×10^5 UFC-GM/kg ó 0.5×10^6 CD34⁺/kg de peso corporal respectivamente (Broxmeyer *et al.*, 1992; Koller y Palsson, 1993; McAdams *et al.*, 1996b). Estos valores han sido establecidos en base a resultados clínicos y estadísticos obtenidos de trasplantes de MON.

Haciendo una comparación en base a las necesidades mínimas celulares para un paciente promedio (70 kg en EUA), y los niveles máximos alcanzados en SCU, se observa que

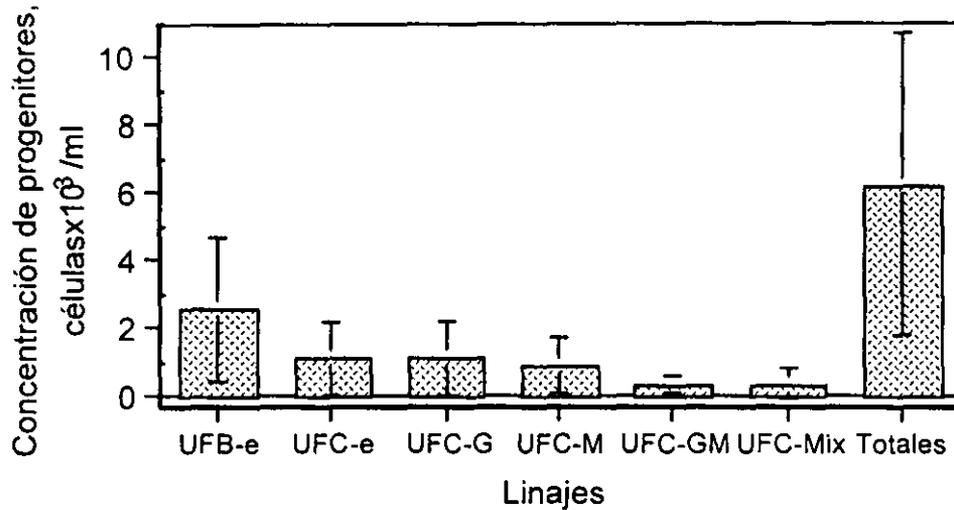


Fig. 11. Concentración de progenitores en muestras de sangre de cordón umbilical. (volumen prom: 40.2 ml, n=9), las barras indican desviación estándar.

los requerimientos mínimos en células MN (63×10^8 células MN), rebasan por cerca de 17 veces los niveles alcanzados en SCU (3.57×10^8 células MN). En relación a los UFC-GM totales, los requerimientos celulares mínimos (35×10^5 UFC-GM) rebasan en aproximadamente 6 veces los niveles alcanzados en SCU (5.6×10^5 UFC-GM totales). Sin embargo, se tienen reportes de que los progenitores hematopoyéticos de SCU tienen mayor capacidad proliferativa que los encontrados en MON (Broxmeyer *et al.*, 1989; Broxmeyer *et al.*, 1992; Lansdorp *et al.*, 1993; Mayani *et al.*, 1998). En base a lo anterior, se han realizado trasplantes exitosos de células hematopoyéticas (CH) de SCU sin previa expansión en niños, e incluso en adultos de bajo peso (Broxmeyer *et al.*, 1992; Wagner, 1994). Es por lo anterior que resulta fundamental la expansión *in vitro* de las CH de SCU, para poder usarlas en el resto de los pacientes. Actualmente existe solo un reporte de las características celulares (recuperación, número de células MN y de progenitores, porcentajes de progenitores, etc.) en SCU en México (ver apéndice D).

Los procedimientos de recolección y procesamiento de muestras de SCU están ya bien definidos en aquellos países donde su almacenamiento en bancos de sangre es un hecho. En México aún no se cuenta con la infraestructura necesaria para su almacenamiento. Este trabajo forma parte de un proyecto que es pionero en este tipo de procedimientos en México, así como de iniciar la información de SCU en la población mexicana.

5.2 Cultivos a Largo Plazo

La cinética de crecimiento de células suspendidas en cultivos a Largo Plazo (CLP) de SCU evaluada hasta el día 63, sin adición de factores hematopoyéticos, muestra un declive constante. Esta se presenta de la forma en que tradicionalmente se reporta sin mostrar los recambios de medio (Fig. 12a), y sigue la misma tendencia que lo observado en la literatura para cultivos de MON (Koller *et al.*, 1992; Nicol *et al.*, 1995). La variabilidad de las muestras está implícita en las amplias barras de error. Esta cinética se compara con una de MON bajo las mismas condiciones (Mayani *et al.*, 1998), se observa que en células suspendidas no existe diferencia significativa. Sin embargo, la cinética de células adherentes desde el día 21 hasta el 63, con intervalos de 15 días cada uno (Fig. 12b), muestra diferencias entre CH de SCU y MON, es claro que en la segunda se observa un mayor número de células adherentes.

A partir de SCU se encontró formación de estroma, lo cual fue un suceso novedoso debido a los escasos reportes al respecto (Ye *et al.*, 1994). Este estroma no fue confluyente y el número de células adherentes fue aproximadamente de 2 a 4 veces menor que el desarrollado a partir de MON (Mayani *et al.*, 1998). Las células adherentes fueron probablemente monocitos, macrófagos y algunas de tipo dendrítico. Los adipocitos normalmente encontrados en cultivos con MON (Mayani, 1996; Mayani *et al.*, 1998), no se observaron en cultivos con CH de SCU, y concuerda con lo reportado por Ye *et al.*, (1994) para cultivos de SCU en otras condiciones. La diferencia entre la formación de estroma en MO y de la escasez de ella en SCU se debe a que la primera, dado su origen, contiene precursores estromales tanto de fibroblastos como de adipocitos. En cambio se desconocía si en SCU se encuentran este tipo de precursores y en qué niveles.

El declive mostrado en la Fig. 12a probablemente se debe a dos eventos: la muerte de células maduras y diferenciadas, entre las cuales puede existir una alta proporción de eritroides, y por otra parte al recambio del medio semiagotado (en el cual se retiran células, nutrientes y metabolitos tóxicos); ambos eventos se pueden observar en la Fig. 13. En esta figura se presenta para una de las muestras el comportamiento real que tuvieron los cultivos durante los recambios de medio, el cual normalmente no se reporta. El recambio de medio se encuentra indicado por las flechas. En esta cinética de crecimiento de células en suspensión se

observa claramente una estabilización en cuanto a concentración celular (p. ej. del día 7 al 14), y en otras incluso un breve crecimiento (p. ej. del día 28 al 35).

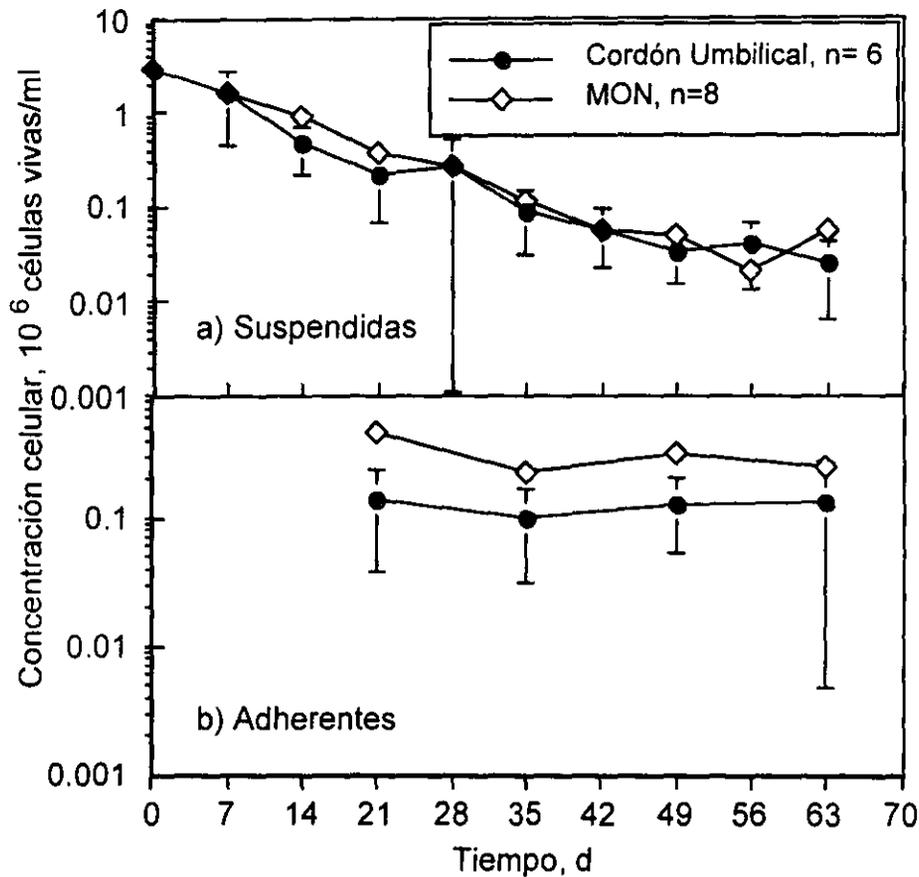


Fig. 12. Cinética de crecimiento de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical en cultivos a Largo Plazo. a) células suspendidas, b) células adherentes. Los datos de MON son de Mayani *et al.* (1998).

La formación de estroma a partir de CH de SCU se ha reportado previamente (Ye *et al.*, 1994), como se mencionó en capítulos anteriores, pero en condiciones inusuales en CLP. El estroma observado en este trabajo fue en condiciones normalmente usadas para CLP sin adición de citocinas, y aunque represente un porcentaje menor que el formado a partir de MON, sienta las bases para estudios subsecuentes acerca de la funcionalidad de este, tanto en CLP como en cultivos lote.

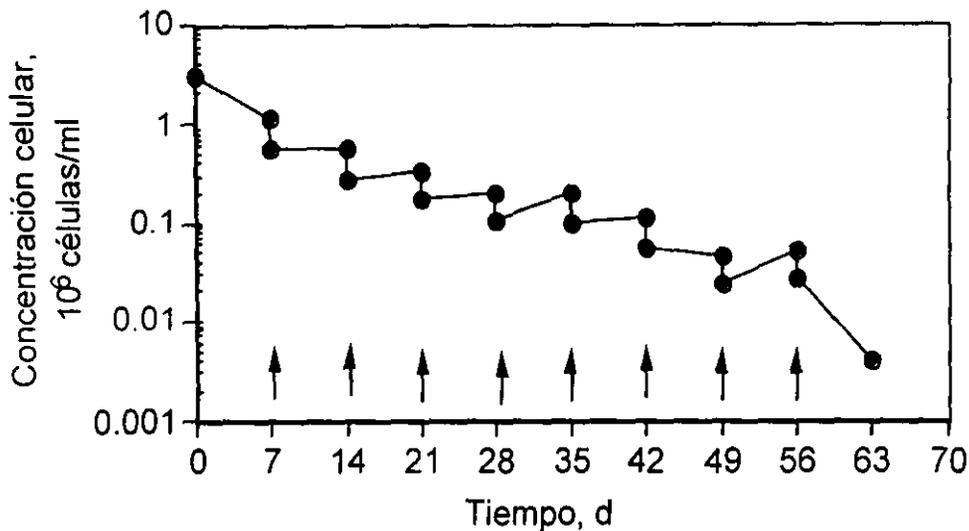


Fig. 13. Perfil de la concentración de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical en cultivos a Largo Plazo. Análisis para una muestra. Las flechas indican recambio de medio.

La Fig. 14 muestra la velocidad específica de crecimiento aparente (μ) y la velocidad específica de muerte aparente (k_d). Los valores negativos, (por debajo de la línea punteada), indican muerte celular mientras que los positivos, (sobre la línea punteada), indican crecimiento.

El comportamiento entre las 6 diferentes muestras es muy variable. En las primeras 2 semanas (días 0-14), la tendencia de la mayoría de las muestras es hacia la muerte celular. Probablemente lo anterior se debió por una parte, a que una gran proporción de células en el inóculo se encontraba en etapas finales de su desarrollo y durante este lapso tendió a morir y a desaparecer, por otro lado a la falta de citocinas en el medio. La k_d máxima en la primera semana fue de 0.168 h^{-1} y se observó en la muestra 5. Hacia las semanas 3 y 4 (días 14-28) en la mayoría de las muestras se observó un leve crecimiento, por ejemplo en las muestras 1, 3 y 5. La μ máxima en este periodo se observó en la muestra 5 con 0.41 h^{-1} . Las muestras 3, 4 y parcialmente la muestra 1 tienen un ligero crecimiento hacia las semanas 5 y 6 (días 28-42). Para las últimas semanas no se observa una tendencia consistente en la mayoría de las muestras en cuanto a crecimiento o muerte.

El protocolo de recambio (cada 7 días) e inóculo, se establecieron empíricamente por Garnet y Kaplan (1980) y por grupos sucesivos (Eaves *et al.*, 1991), y ha sido ampliamente

usado para CLP de MON. Un inóculo grande (3×10^6 células MN/ml de MON) aparentemente contendría los suficientes precursores estromales que desarrollarán en las siguientes semanas una capa confluyente para sustentar la hematopoyesis (Eaves *et al.*, 1991). Es debido a ello y para tener parámetros de comparación que se siguieron las mismas condiciones de inóculo y de recambio de medio. En CLP de SCU como se mencionó anteriormente, solamente ha sido usado estroma preformado (Nicol *et al.*, 1995) de MON o de alguna línea celular de ratón.

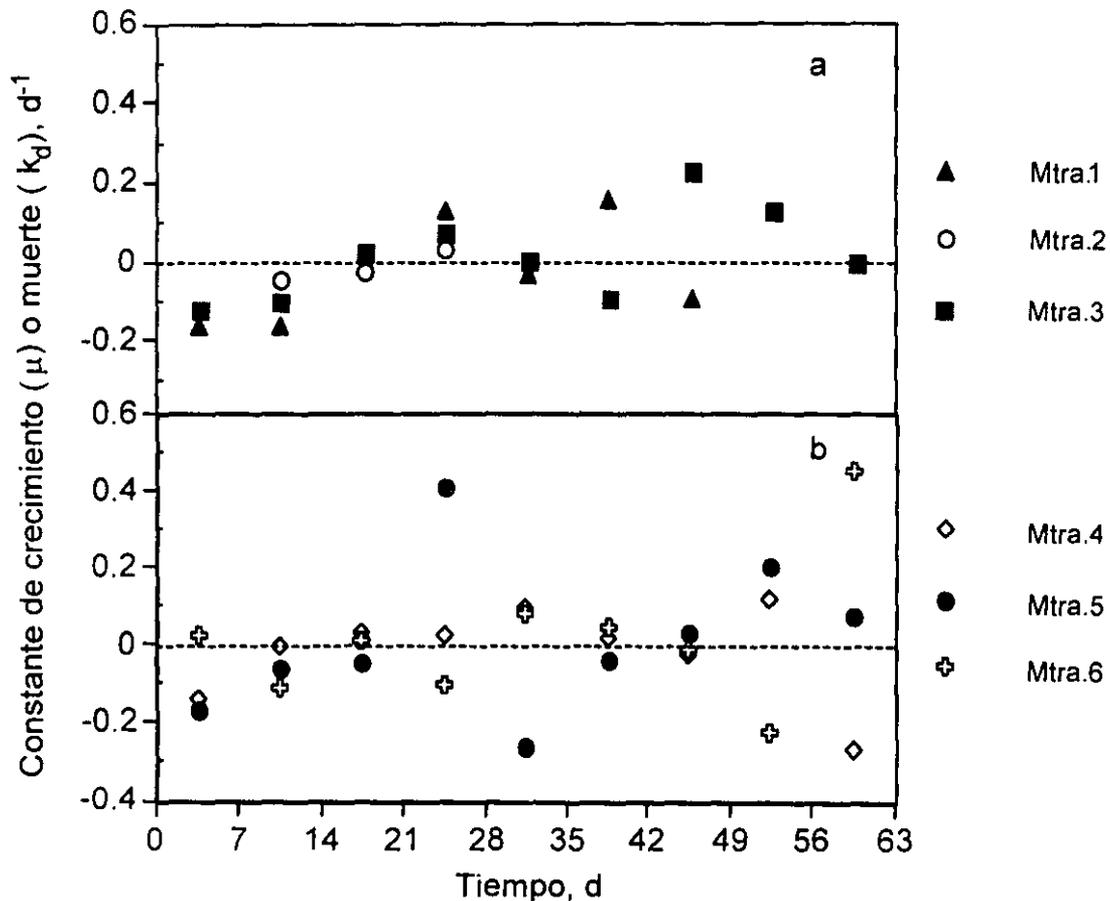


Fig. 14. Constante de crecimiento o de muerte aparente evaluadas entre cada uno de los recambios. Cultivos a Largo Plazo de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical. Valores negativos indican muerte (k_d) y positivos crecimiento celular (μ). a) Muestras 1,2 y 3; b) muestras 4, 5 y 6.

El crecimiento en células adherentes es difícil evaluarlo en términos de μ ó de k_d , debido a que en su determinación se consideraron también a aquellas células semi-adherentes que se encuentran parcialmente unidas al estroma. Para desprender el estroma se utilizó un

rastrillo o raspador celular y el error incurrido por su uso no fue determinado. El porcentaje de células adherentes en el estroma de SCU con respecto al total de células nucleadas fue evaluado en los días 21, 35, 49 y 63 (Tabla 6). Este aumentó del 39 al 77.5%, lo que corresponde a 5 veces más que las células suspendidas al final del cultivo. En estudios hechos por otro grupo de investigación se ha determinado que las células de la capa adherente no son fibroblastos sino mayoritariamente macrófagos, además de que aparentemente son responsables principales de la secreción de IL-6 y TNF- α , cuyos niveles se encuentran por arriba de los encontrados en el medio (comunicación personal con Gutiérrez R.).

Tabla 6. Porcentaje de células adherentes con respecto al total de células vivas.

Días	Porcentaje de células adherentes, %	n
21	39.1 \pm 4.0	6
35	51.3 \pm 19.8	6
49	77.2 \pm 8.3	5
63	77.5 \pm 19.5	4

n= número de muestras evaluadas.

La expansión generada en células suspendidas entre cada uno de los recambios de medio se observa en la Tabla 7, ésta es calculada entre dos periodos, es decir, cada 7 días. Una expansión menor a uno indica que la concentración celular decreció en este periodo. En CLP

Tabla 7. Expansión de células suspendidas en cultivos a Largo Plazo.

Días	Promedio \pm desviación estándar	n
7	0.53 \pm 0.3	5
14	0.52 \pm 0.2	6
21	0.92 \pm 0.3	6
28	1.27 \pm 0.8	5
35	1.43 \pm 0.9	6
42	1.37 \pm 0.9	5
49	1.68 \pm 1.6	5
56	2.28 \pm 1.4	4
63	0.95 \pm 0.6	3

n.- número de muestras. Evaluación entre cada uno de los recambios de medio.

ésta se incrementa hasta 2.29 ± 1.4 veces entre los días 49 y 56, indicando probablemente diferenciación celular.

Los progenitores hematopoyéticos se determinaron en cinéticas de CLP de SCU y los resultados se muestran en la Tabla 8. Comparando los datos al día 0, el promedio de progenitores mieloides fue menor en muestras de SCU que los reportados en la literatura para MON (Mayani *et al.*, 1998). El de progenitores eritroides fue similar y el de progenitores multipotentes fue notablemente mayor en SCU (6.7 veces más) que en muestras de MON.

A lo largo de los CLP los progenitores hematopoyéticos muestran en general un descenso significativamente mayor en SCU que en MON (Mayani *et al.*, 1998), con excepción para progenitores multipotentes para el día 35, donde la concentración es mayor para SCU. Este descenso sugiere que el estroma formado por SCU es de características inferiores, probablemente debido a una escasa producción de factores de crecimiento.

Tabla 8. Concentración de progenitores hematopoyéticos (células/ml) de sangre de cordón umbilical en cultivos a Largo Plazo sin adición de citocinas, n=6.

Días	Mieloides totales		Eritroides totales		Multipotentes	
	SCU	MON	SCU	MON	SCU	MON
0	4060± 2810	6150 ±890	5043 ±4210	5820±254	810±464	120 ±12
7	1822±1321	-	3521±1400	-	290.4±145.9	-
14	889.4±419.8	-	2299 ± 112	-	104±47.4	-
21	260 ±263	754 ± 86	181.7±198	200 ± 97	24.5±31.2	8 ± 2
28	172.7±105.6	-	130.5 ± 130	-	14±17.7	-
35	66.3±40.9	183 ±24	35.3±67.8	42 ± 59	1.6 ±1.1	2 ± 3
42	12.7±10.8	-	6 ± 7	-	0.25±0.4	-
49	26.2±20.9	264 ± 27	4.8±5.3	nd	nd	nd
56	2.3±3.3	-	9±15.6	-	nd	-
63	5.7±9.9	-	0.5±0.58	-	nd	-

nd.- no detectable. Los datos de médula ósea normal fueron tomados de Mayani *et al.* (1998).

La cinética de progenitores suspendidos y adheridos en CLP sigue el comportamiento general de la cinética de células nucleadas, decayendo durante todo el cultivo. La proporción de cada uno de los linajes hematopoyéticos en la fase suspendida (mayoritaria) en el transcurso del cultivo se observa en la Fig. 15. En el panel a), se muestran los

progenitores mieloides; la proporción de los UFC-M aumenta del 13.5 al 88 % hacia el día 63. Los UFC-G inician en 15.8 %, y su proporción aumenta a 20.6% al día 28, y al día 42 se observa el porcentaje más alto con 27.6%. Los UFC-GM inician en 10.9% y después disminuyen a 4% al día 14, posteriormente fluctúan entre 3 y 8% y finalizando en 4%. Es interesante observar que se puedan encontrar en etapas tardías del cultivo (día 63) progenitores mieloides tempranos. En el día 56, es probable que la identificación de los progenitores no haya sido confiable, por lo que los datos de los diferentes linajes no se muestran.

Con respecto a los progenitores eritroides mostrados en el panel b, se observa que los progenitores eritroides tardíos (UFC-e) aumenta su proporción del 9 al 30% hacia el día 14, de donde disminuye hasta 7.4%. Los progenitores eritroides tempranos (UFB-e) inician con el 41% disminuyendo al 8% en el día 63. Es interesante encontrar también progenitores eritroides tempranos a edades muy avanzadas del cultivo. Debe recordarse que estos cultivos se realizaron sin adición de citocinas y que aparentemente los sueros no contienen EPO, sin embargo, en base a estos resultados tal suposición puede estar equivocada.

Los progenitores multipotentes inician en 8% y descienden a lo largo del cultivo hasta desaparecer por completo hacia el día 49 (Fig. 15c). El comportamiento global de progenitores mieloides y eritroides se observa en este mismo panel. Los progenitores eritroides totales alcanzan su máxima proporción hacia el día 14 (69.8%), mientras que los mieloides tienden a dominar sobre los otros, desde el día 21 (55.8%) y hasta el final del cultivo (92%). Como se mencionó anteriormente, es probablemente que en alguno de los sueros que contiene el medio existan niveles de EPO suficientes como para mantener aún niveles bajos de progenitores eritroides en CLP y que debido al protocolo de recambio de medio, éste les sea proporcionado.

El porcentaje de UFC con respecto células MN se representa en la Fig. 15d donde *n* es el número de muestras evaluadas. Se observa claramente que hacia el día 14 se encuentra la mayor proporción de UFC, siendo ésta del 0.72%; es decir 2.18 veces más que al día 0. Esta proporción es prácticamente nula al final del cultivo (0.03%). De la misma forma se determinaron progenitores adherentes y su porcentaje con respecto a células adherentes es bajo, observándose el máximo nivel en 0.085% al día 14 (Fig. 15d).

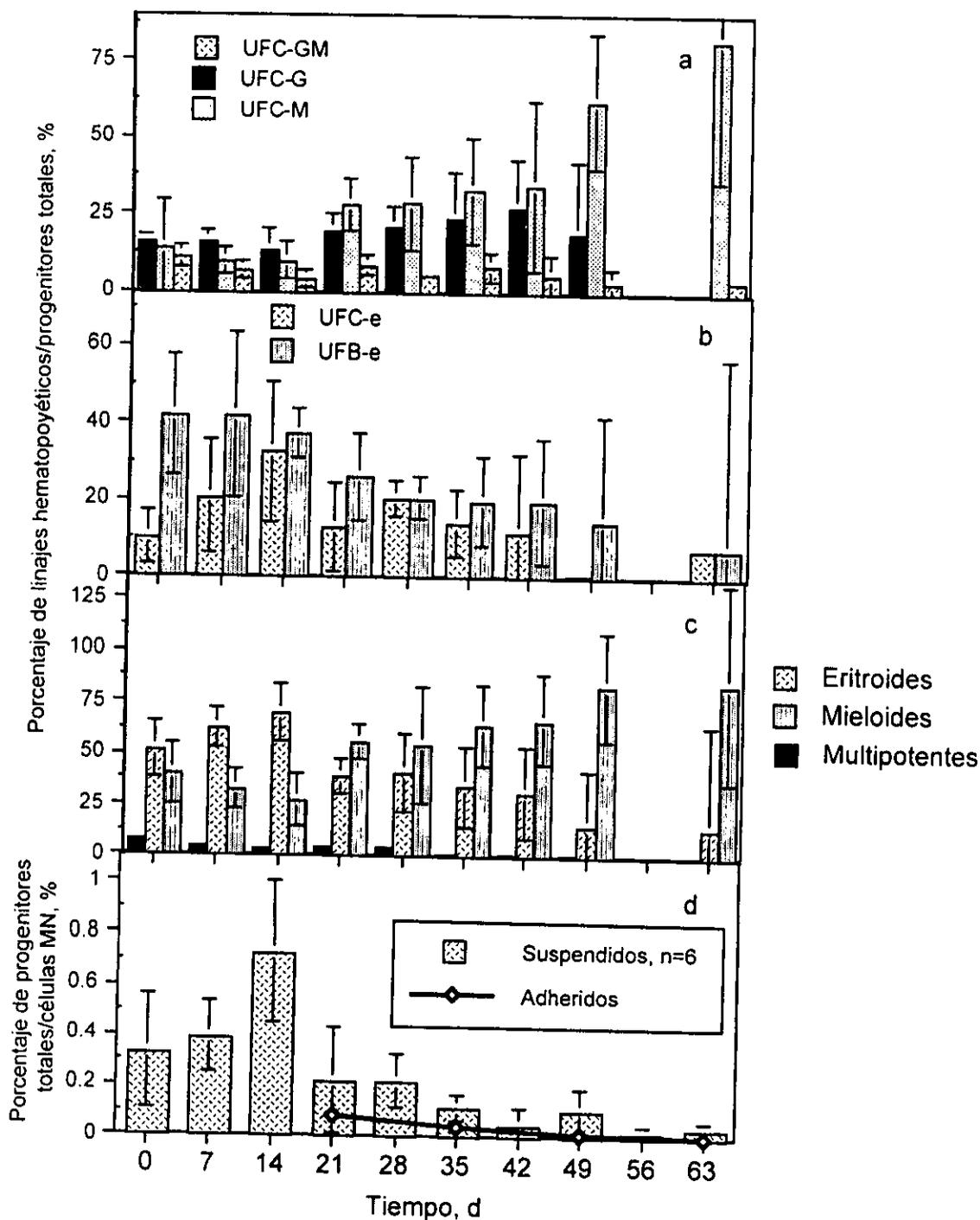


Fig. 15. Porcentaje de unidades formadoras de colonias (UFC) en cultivos a Largo Plazo de sangre de cordón umbilical. a) mieloides, b) eritroides, c) todos los linajes con respecto al número total de progenitores, y d) progenitores totales con respecto al número de células MN.

El mayor consumo de glucosa y la producción de lactato en CLP, calculados de acuerdo a las ecuaciones (3) y (4) respectivamente, se observaron en la primera semana con 0.11 ± 0.057 y 0.144 ± 0.046 g L⁻¹d⁻¹ respectivamente. Posteriormente el consumo de glucosa tendió a estabilizarse del día 28 al 63, entre 0.32 y 0.38 g L⁻¹d⁻¹ y la producción para lactato del día 28 al 49, entre 0.31 y 0.48 g L⁻¹d⁻¹ (Fig. 16a).

El consumo específico de glucosa, q_{glc} , calculado de acuerdo a la ecuación (5), con respecto a células totales (adherentes y suspendidas) aumenta desde 0.048 ng d⁻¹cel⁻¹ en el día 7, hasta 0.26 ng d⁻¹cel⁻¹ en el día 35, esto es aproximadamente 5 veces a lo largo del cultivo. Para la producción específica de lactato, q_{lac} , se observa un incremento de 0.062 ng d⁻¹cel⁻¹ en el día 7 hasta 0.33 ng d⁻¹cel⁻¹ en el día 35, es decir, tiene un aumento de aproximadamente 5 veces (Fig. 16b). El incremento en el consumo y producción específica parece corresponder a la presencia de células adherentes, las cuales aumentan a lo largo del cultivo (Tabla 6), y que además se ha observado tienen un metabolismo más activo que las células hematopoyéticas (De León, 1999; Berdugo, 1999). Lo anterior se corrobora al calcular el consumo específico para células adherentes y para células suspendidas.

Se desarrolló un análisis para calcular los consumos y producción específicos de glucosa y lactato respectivamente para células suspendidas y adherentes, de acuerdo a la ecuación (6). Las contribuciones parciales de glucosa calculadas mediante el método Gauss-Jordan para el periodo comprendido entre el día 28 y el 35, fueron de $q_s = 0.045$ y $q_a = 0.33$ ng d⁻¹cel⁻¹, para células adherentes y suspendidas respectivamente. Así mismo con respecto a la producción de lactato, las contribuciones parciales fueron de $q_s = 0.0093$ ng d⁻¹cel⁻¹ y $q_a = 0.36$ ng d⁻¹cel⁻¹, es decir para células adherentes son de 7.2 y 38.7 veces mayor para glucosa y lactato respectivamente. Lo anterior nos afirma que efectivamente las células adherentes son metabólicamente más activas que las suspendidas. En el trabajo de Collins *et al.* (1997) se propone que son los progenitores los que principalmente contribuyen al consumo específico de glucosa en cultivo o a la producción específica de lactato. Sin embargo, dicho trabajo fue desarrollado en cultivos agitados sin presencia de células adherentes. Por el contrario, en CLP sin adición de citocinas se encontró que el número de progenitores en el periodo evaluado fue escaso y es probable que la contribución de las células adherentes sea mayor que la de éstos.

En CLP se encontró un rendimiento de lactato sobre glucosa ($Y_{lac/gluc}$) de 2.5 mol_{lac}/mol_{gluc}, con medio LTBMCM.

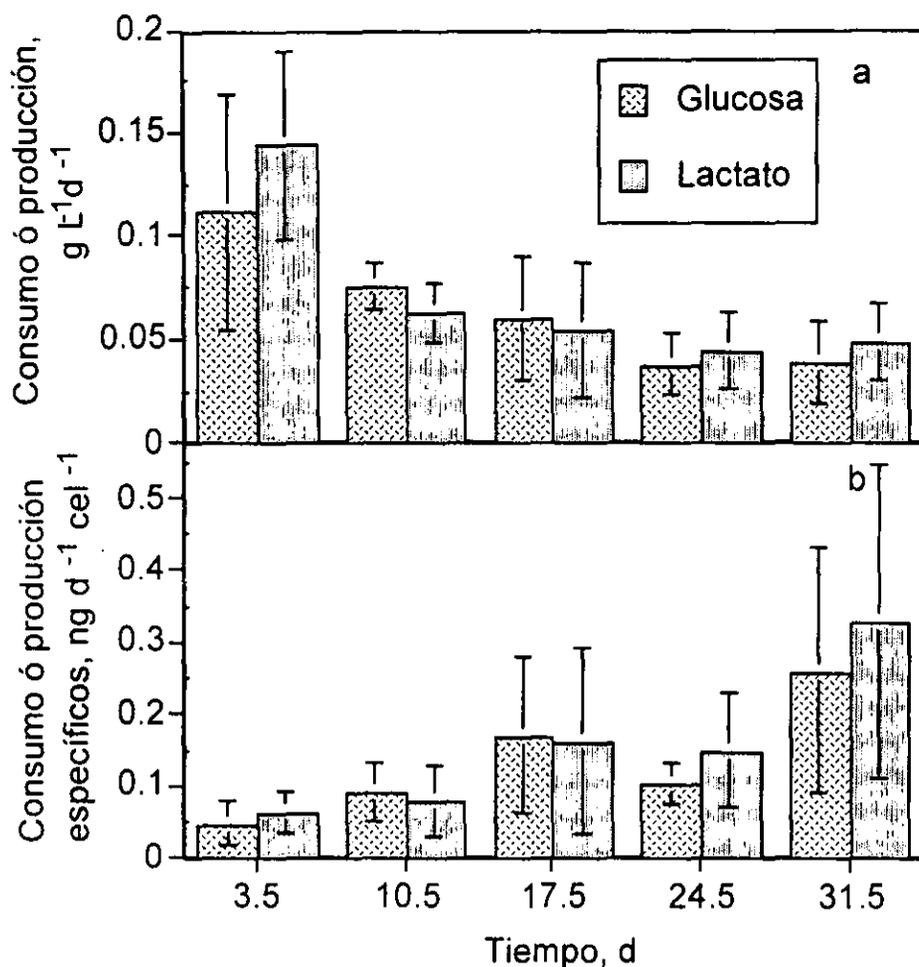


Fig. 16. Consumo de glucosa y producción de lactato en cultivos a Largo Plazo de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical. a) volumétricos, b) específicos. Las barras de error indican la desviación estándar, n=5.

Se observó en algunos cultivos que el consumo de glucosa en las primeras semanas (días 7 y 14) fue suficientemente alto para agotarla en este periodo. Por lo que en base a los resultados obtenidos en este sistema, se puede sugerir que se haga una adición de glucosa en las primeras dos semanas para evitar su agotamiento. Alternativamente se puede realizar en las primeras semanas (1-3) un recambio de medio más frecuente. Sin embargo, con lo anterior se estaría disminuyendo la población celular, lo cual se puede evitar regresando las células al medio fresco. Para las semanas posteriores, se sugiere mantener el cultivo sin recambio por un mayor tiempo, debido a que los nutrimentos se encuentran a niveles favorables y los metabolitos tóxicos a baja concentración. Estos resultados ofrecen un mejor entendimiento de los CLP, que puede ser explotado para mejorar a este sistema ampliamente usado.

5.3 Evaluación de factores de crecimiento en cultivos a Largo Plazo

Las interleucinas hematopoyéticas y factores de crecimiento como IL-3, IL-6, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, EPO y SCF se pueden adquirir comercialmente, sin embargo el costo es excesivo. Para minimizar los costos, se decidió evaluar dos medios en CLP: MethoCult (ME), rico en citocinas y disponible a un costo menor para el grupo de investigación, y un medio comercial condicionado (Sigma) por células gigantes (MC). El ME está diseñado para realizar los cultivos semisólidos de progenitores y contiene una concentración conocida de factores de crecimiento. El MC proviene del sobrenadante del cultivo de una línea celular y para el cual no se tiene información sobre la concentración ni el tipo de citocinas presentes. La concentración final de interleucinas al 10% de medio ME se menciona en la sección de Materiales y Métodos.

Tabla 9. Relación de células hematopoyéticas en Cultivos a Largo Plazo con adición de citocinas con respecto a un control sin citocinas.

Día de cultivo	8 % ME	10% ME	8 % MC	10% MC
8	3.59	3.22	2.36	1.96
14	3.89	4.61	0.59	0.32
21	1.84	2.51	0.24	0.42
27	0.96	1.73	nsr	nsr
37	3.81	3.13	nsr	nsr

nsr.- no se realizó.

En la Fig. 17 se observa la cinética de crecimiento a dos concentraciones finales (8 y 10%) de medio ME y MC en medio IMDM. En el panel a se muestra la concentración celular antes de los recambios de medio, de la misma forma que la presentada en la Fig. 12a. Se observa que la concentración celular es superior en células suspendidas con ME que con MC para cualquiera de las dos concentraciones evaluadas. Una cinética acumulada, la cual se refiere al comportamiento celular calculado sin agotamiento celular, se muestra en el panel b. Este tipo de gráfica es común en algunos reportes de CLP, sin embargo su utilidad es exclusivamente comparativa. De esta forma, en la Fig. 17b, la diferencia entre los dos diferentes medios resulta evidente. La adición de ME a CLP promovió un mayor número de células comparada con un control sin citocinas, como se muestra en la Tabla 9 (los valores en

la tabla son el cociente entre el número de células encontradas para cada variable y el número encontrado en el control sin citocinas).

La caída constante observada en la Fig. 17a se debe principalmente a los recambios de medio y por lo tanto al retiro de células. Con MC, a excepción del día 8, en todo el resto del cultivo, el número de células fue menor que el control. La expansión global y la recuperación de una mayor cantidad de las células no es, por la misma naturaleza de los cultivos, una de las principales características de estos sistemas. En estos experimentos con IMDM no se observó capa adherente detectable bajo ninguna condición.

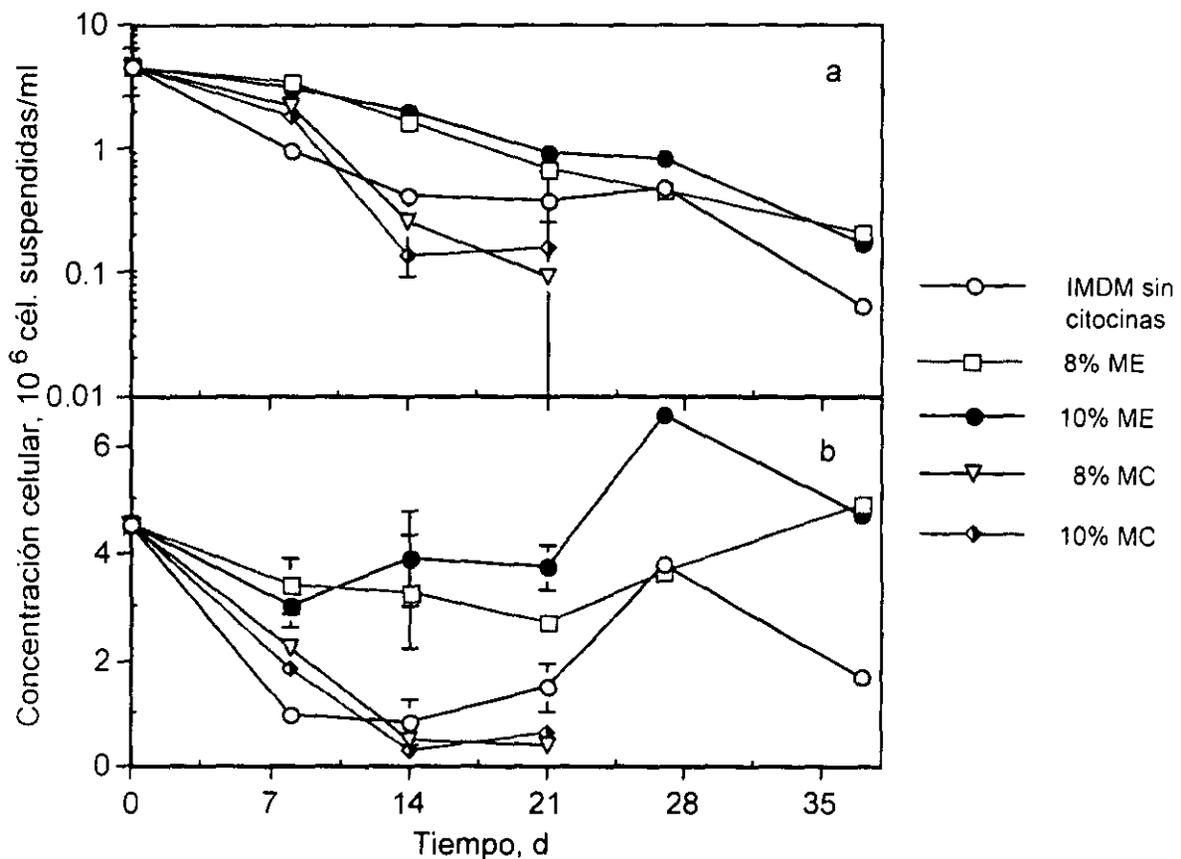


Fig. 17. Cinética de crecimiento de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical en cultivos a Largo Plazo con adición de citocinas. Datos para una sola muestra. a) cinética observada, b) cinética calculada sin retiro de células. Las barras indican la desviación estándar. ME: medio enriquecido con Metho Cult, MC: medio enriquecido con medio condicionado comercial.

La evaluación de progenitores hematopoyéticos se realizó durante las primeras 4 semanas del cultivo en cada recambio de medio. No observando progenitores desde el día 28.

Lo anterior se debió probablemente a que la presencia de citocinas en el cultivo promovió la diferenciación celular de los progenitores presentes, y por otra parte la ausencia de estroma no favoreció su mantenimiento.

La mayor expansión de progenitores se encontró en la primera semana (día 8) en las cinéticas con y sin adición de citocinas. La expansión con MC fue comparable a la encontrada en el control (medio IMDM sin citocinas) (Fig. 18). Sin embargo, se observó que los UFC-Mix se expandieron 6.26 veces con 8% ME, mientras que en el control solo fue de 1.39 veces. Así también para el resto de los progenitores, el ME tanto a 8 como a 10% favoreció la expansión sobre el control, esta diferencia es más marcada en los progenitores mieloides tardíos y en los eritroides.

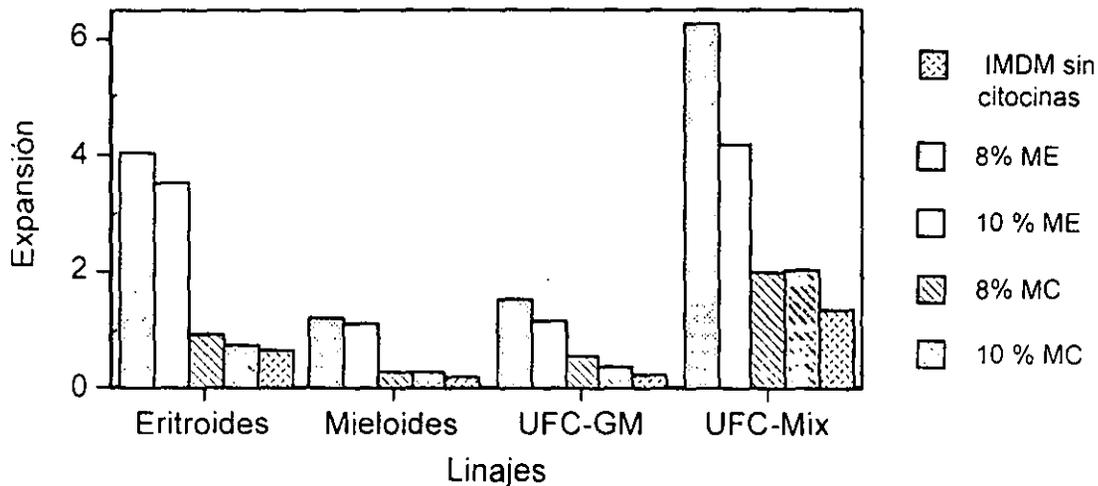


Fig. 18. Expansión de progenitores suspendidos en cultivos a Largo Plazo de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical con adición de citocinas. Evaluación al día 8 del cultivo. Datos para una sola muestra. ME: medio Metho Cult, MC: medio condicionado comercial.

El porcentaje de UFCs con respecto a células MN suspendidas se observa en la Fig. 19. Tal porcentaje aumenta en el día 8 y disminuye en las siguientes semanas usando ME, la misma tendencia se observó en CLP sin citocinas. Por otra parte, con MC se observa un máximo al día 14. No obstante estas diferencias en el momento de mayor porcentaje de progenitores, el ME mostró ser viable para ser usado como sustituto de interleucinas solubles a estas concentraciones.

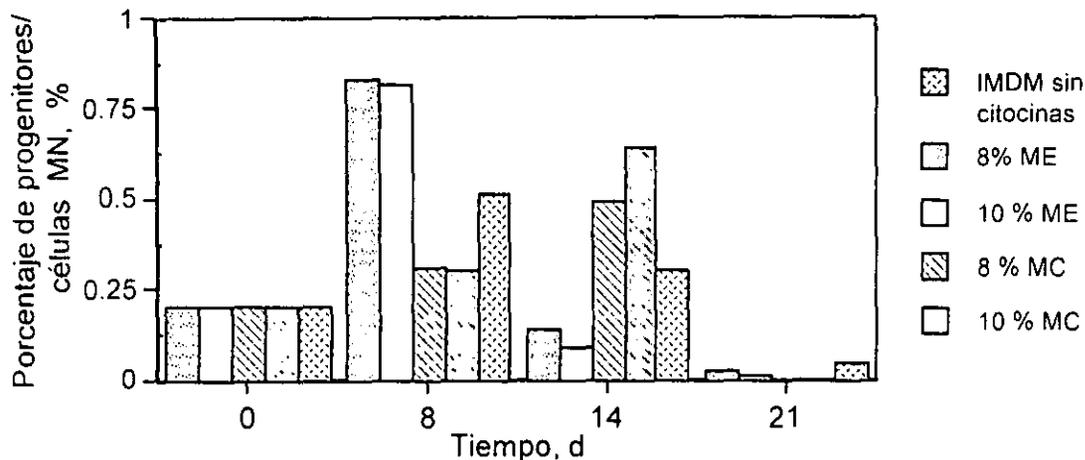


Fig. 19. Porcentaje de progenitores suspendidos con respecto a células MN. Cultivos a Largo Plazo de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical. Adición de citocinas. Datos para una sola muestra. ME: medio Metho Cult, MC: medio condicionado comercial.

El MC no tiene efecto contundente sobre células MN recién recolectadas, sin embargo con células criopreservadas, se observó que tiene efecto positivo elevando la viabilidad de 36 (día 7) a 90% (día 14), al incrementar la concentración de 0 a 5 % (Fig. 20). Además con 10% de MC, la expansión calculada al día 14 fue de 2.1 veces en UFC-Mix y de 2.6 veces en UFC-G; mientras que en el control fue de 1.7 y sin expansión respectivamente.

En este trabajo no se evaluó ampliamente el efecto de la criopreservación sobre las CH, sin embargo se observó que la adición de MC a células criopreservadas favoreció la viabilidad, concentración celular y de progenitores, a diferencia de experimentos previos con células no congeladas. El efecto de la criopreservación sobre células hematopoyéticas está aún en discusión. Se ha reportado que la criopreservación disminuye el porcentaje de recuperación de los progenitores hematopoyéticos (Broxmeyer *et al.*, 1989), mientras otros reportes aseguran que tal procesamiento no afecta a las UFCs (Kobylka *et al.*, 1998). Por otra parte, se ha observado que a pesar de que la criopreservación disminuye la capacidad clonogénica de células CD34⁺ en los primeros 14 días en CLP, éstas se recuperan en las semanas posteriores a niveles comparables a células CD34⁺ no criopreservadas (Nicol *et al.*, 1995). Se ha sugerido que las características clonogénicas de las CH son afectadas por los protocolos de reconstitución (Broxmeyer *et al.*, 1989).

El ME es una fuente viable de factores de crecimiento con concentraciones conocidas que puede ser usada alternativamente, no obstante que el costo sea comparable al uso de factores de crecimiento solubles adquiridos por separado. El papel que juega la metilcelulosa por sí misma no ha sido evaluado, es posible que ésta le confiera al medio características favorables para el crecimiento de las CH, tales como aumento de su viscosidad.

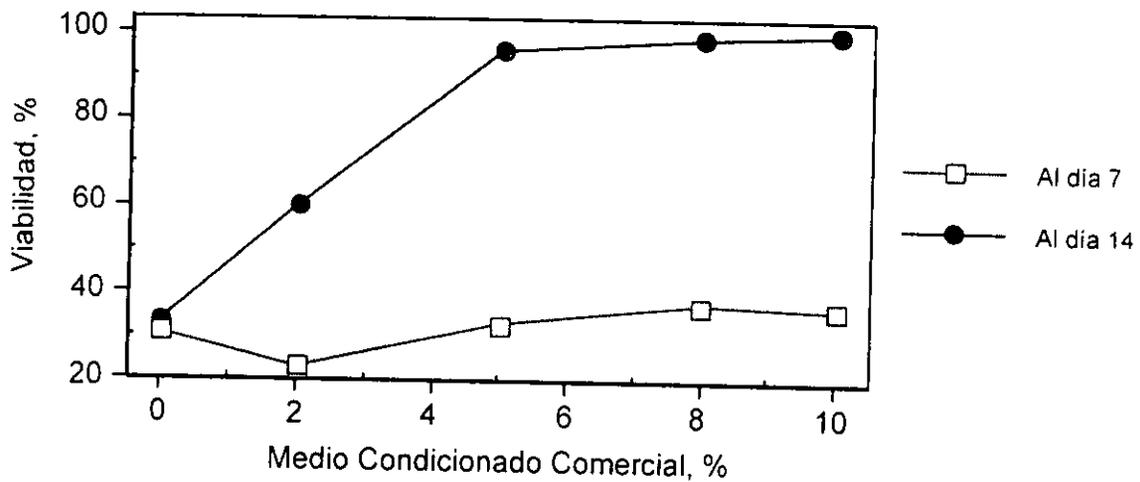


Fig. 20. Efecto de la adición de Medio Condicionado de Células Gigantes sobre la viabilidad de células suspendidas. Células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical, criopreservadas (2 -3 meses) y evaluadas en cultivos a Largo Plazo. Datos de una sola muestra. Medio LTBM.

5.4 Cultivos Lote

Los cultivos lote se realizaron como unidades volumétricas simultáneas en placas multipozos (0.8 a 1.5 ml), en donde el muestreo fue secuencial en diferentes unidades de cultivo. Tales cultivos facilitan el análisis puntual evitando muerte celular debido al sobremanejo y al desprendimiento constante de la capa adherente, como ocurriría de realizarse de la forma tradicional (frascos T). Así mismo, se optimiza el uso de tan costoso medio.

Iniciando con la misma concentración celular se supuso un cultivo homogéneo en cuanto a las características celulares: linajes celulares y progenitores hematopoyéticos. En este tipo de cultivos se caracterizaron: cinéticas de crecimiento, consumo de nutrientes, producción de desechos, y efecto tóxico del amonio.

5.4.1 Cultivos lote sin adición de citocinas

En este trabajo, como se presentó en el capítulo anterior, el estroma formado con SCU en CLP fue pobre en comparación al de MO. Sin embargo, fue interesante encontrar estos niveles bajos de células y progenitores adherentes, en particular cuando pocos reportes han observado y estudiado el estroma formado a partir de SCU (Ye *et al.*, 1994). Para mantener los costos del cultivo en niveles moderados y tener el posible efecto favorable del estroma que se formara a partir de SCU, se realizaron cultivos lote sin adición de citocinas. Para caracterizar su cinética se realizaron cultivos lotes con dos diferentes medios: LTBMCM e IMDM, (ver Materiales y Métodos). El primero tiene un total de 25% de suero: 12.5% suero de caballo, el cual es usado en CLP por promover la formación de estroma; y 12.5% suero fetal bovino (SFB). El segundo medio (IMDM) se usó con 10% de SFB y es usado normalmente en cultivos con adición de citocinas. La cinética de crecimiento en estos cultivos mostró en general una tendencia decreciente, aunque en algunos momentos se observó ligero crecimiento y posteriormente muerte celular. En la Fig. 21 se presenta la cinética de crecimiento, consumo y producción de metabolitos para una muestra de SCU con medio IMDM. En el panel superior se observa disminución celular a lo largo del cultivo en células suspendidas totales vivas (to: células MN y eritroides). La misma tendencia se encontró para otras muestras bajo las mismas condiciones (ver Apéndice C). No se observaron células adherentes en el cultivo de la Fig. 21. En otras réplicas con diferentes muestras, los niveles de

células adherentes con medio IMDM fueron bajos, siendo en algunos casos no detectables (el mayor porcentaje con respecto al inóculo fue de 0.3%, ver Apéndice C1). En este mismo panel se observa que la viabilidad decrece a lo largo del cultivo, de la misma forma que la concentración celular. En el panel inferior se observa que tanto glucosa como glutamina son consumidas, y lactato es producido. El glutamato se produjo en niveles muy bajos, a razón de $0.034 \text{ mmol L}^{-1}\text{d}^{-1}$.

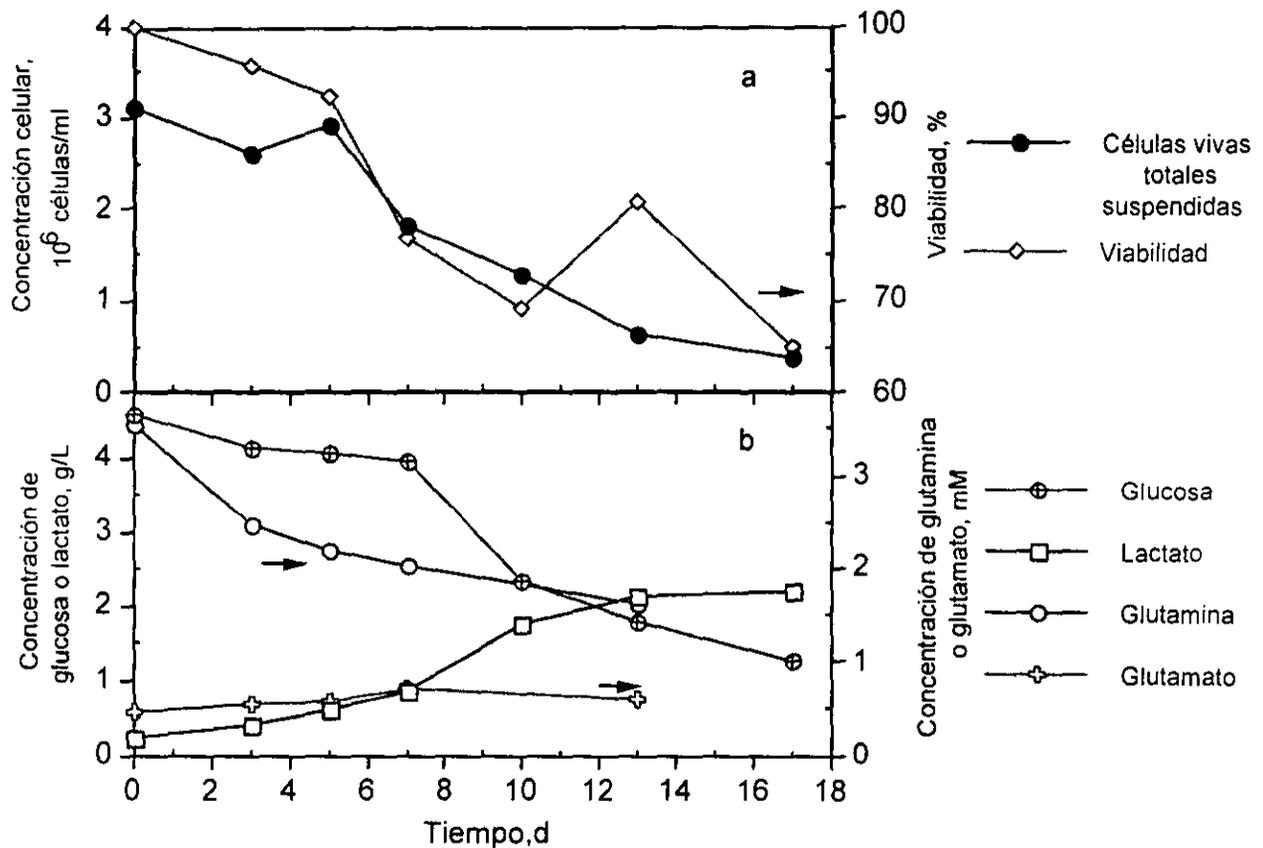


Fig 21. Cultivo lote de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical sin adición de citocinas. Medio IMDM 10% SFB. Cinética correspondiente a una sola muestra.

Con medio LTBMCM se observó también disminución celular al igual que con IMDM (Fig. 22), cayendo en los primeros 8 días del cultivo para después mantenerse a un nivel relativamente constante. En otras réplicas con diferentes muestras se observa un leve crecimiento entre los días 8 y 11 (Apéndice C2). La diferencia del inóculo con el cultivo de la Fig. 21 se debe a la disponibilidad de la muestra. El comportamiento a un inóculo de 3×10^6

cel/ml, evaluado en otra muestra con LTBM (Apéndice C2), es similar al de la Fig. 22. A diferencia del cultivo con IMDM, la viabilidad antes del día 18, no cae tan drásticamente con medio LTBM. Por inspección microscópica las células con LTBM tuvieron mejor apariencia que con IMDM, en donde se observaron lo que podrían ser desechos celulares. Fue hasta los días finales que disminuyó la viabilidad de la misma forma en ambos cultivos. En este momento, la población eritroide no es predominante y probablemente los nutrientes en el medio sean insuficientes incluso para el mantenimiento celular.

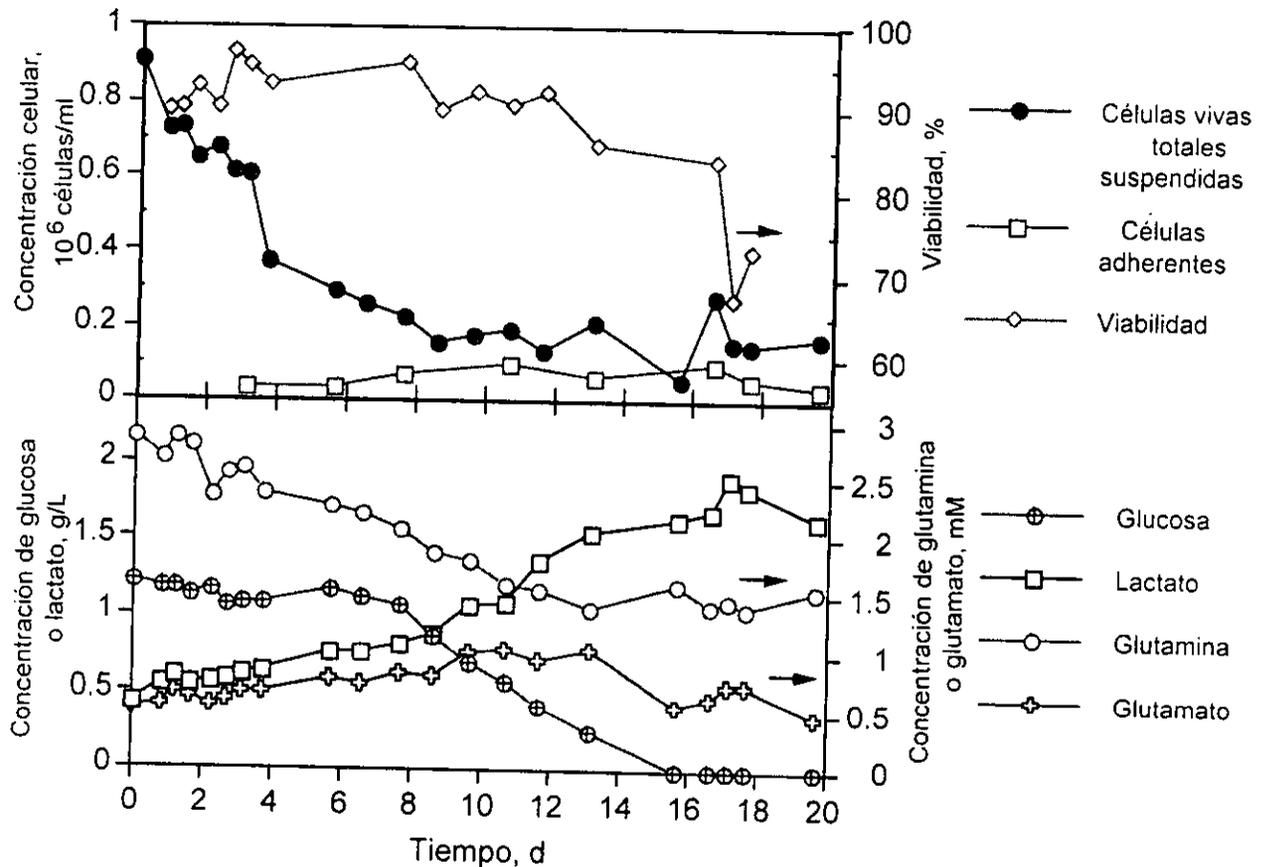


Fig. 22. Cultivo lote de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical sin adición de citocinas. Medio LTBM. Cinética correspondiente a una sola muestra.

La k_d observada en los cultivos fue muy similar en ambos medios. Con LTBM ($n=2$) se evaluó en los primeros 8 días y fue de 0.19 a 0.32 d^{-1} . Con IMDM ($n=8$) fue de $0.21 \pm 0.06 d^{-1}$ y se evaluó prácticamente durante todo el cultivo. Con respecto al crecimiento celular (en células totales), se observó una μ aparente de 0.12 a 0.312 d^{-1} con LTBM, evaluado

entre los días 8-11 aproximadamente y no representó expansión celular con respecto al inóculo. El crecimiento con IMDM fue prácticamente nulo ($\mu=0.059 \text{ d}^{-1}$, del día 3 al 5, Fig. 21).

En los cultivos realizados con LTBMCM se observó formación de estroma, el cual correspondió en una de las cinéticas, a un máximo de 10.7% respecto a la concentración del inóculo (Fig. 22, día 10). En otro duplicado, este máximo se observó en los primeros días y correspondió a un 42% (ver apéndice C2). Por inspección visual, esta capa adherente pareció estar formada por macrófagos y células fibroblastoides, sin embargo no se determinó su naturaleza. Se ha reportado que la mezcla de SFB y suero de caballo (ambos constituyentes del medio LTBMCM) es favorable para los CLP y juegan un papel importante en la diferenciación y autorenovación de las CH, respectivamente (Koller y Palsson, 1993). Esto sugiere que las diferencias encontradas en la formación de la capa adherente en los cultivos con diferentes medios es debida a la presencia del suero de caballo presente en el medio LTBMCM, más que a diferencias de composición de los medio base LTBMCM e IMDM. Las desventajas observadas del medio LTBMCM fueron las concentraciones bajas de glucosa y glutamina, 1 g/L y 2 mM respectivamente, además de su disponibilidad y elevado precio.

En la Fig. 22 se observa que hubo agotamiento de glucosa al día 15, y a partir del día 17 se observa consumo de lactato de $0.0042 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$. Debido a la baja concentración celular en este momento, no se observa si este agotamiento de glucosa tiene efecto sobre la cinética celular. Por otra parte es probable que la principal aportación de lactato al medio, haya sido por las células adherentes. Lo anterior se basa en el hecho de haberse encontrado en algunas unidades o pozos con mayor contenido de células adherentes, niveles de lactato superiores a aquellas en donde se determinaron niveles menores con respecto a células adherentes, sugiriendo una alta tasa glicolítica por parte de estas células. Se observa que la glutamina se consumió, mientras que el glutamato para el cultivo de la Fig. 22 se produjo a razón de $0.038 \text{ mmol L}^{-1}\text{d}^{-1}$, comparable a lo observado en medio IMDM. Esta etapa de producción de glutamato se observó en lo que parece corresponder a la fase más pronunciada de muerte. Posteriormente éste se mantuvo constante, y del día 13 hasta el final del cultivo se consumió a razón de $0.07 \text{ mmol L}^{-1}\text{d}^{-1}$.

El rendimiento de lactato sobre glucosa ($Y_{\text{lac/glc}}$) en cultivos lote sin adición de

citocinas fue de 1.53 a 1.72 mol_{lac}/mol_{glc} en medio LTBMCM, mientras que con medio IMDM 10% SFB fue solo de 1.25-1.39 mol_{lac}/mol_{glc}.

5.4.2 Cultivos Lote con adición de citocinas

Se realizaron cinéticas con medio LTBMCM e IMDM 10% SFB enriquecidos con citocinas a las concentraciones finales descritas en la sección de Materiales y Métodos.

Las cinéticas de crecimiento celular en cultivos lote con adición de citocinas mostraron un comportamiento muy distinto a los cultivos sin ellas (ver Figs. 23 y 24). En los cultivos con adición de citocinas se pueden identificar claramente tres fases principales: una fase lag o de adaptación, la fase de crecimiento exponencial y posteriormente una fase de muerte.

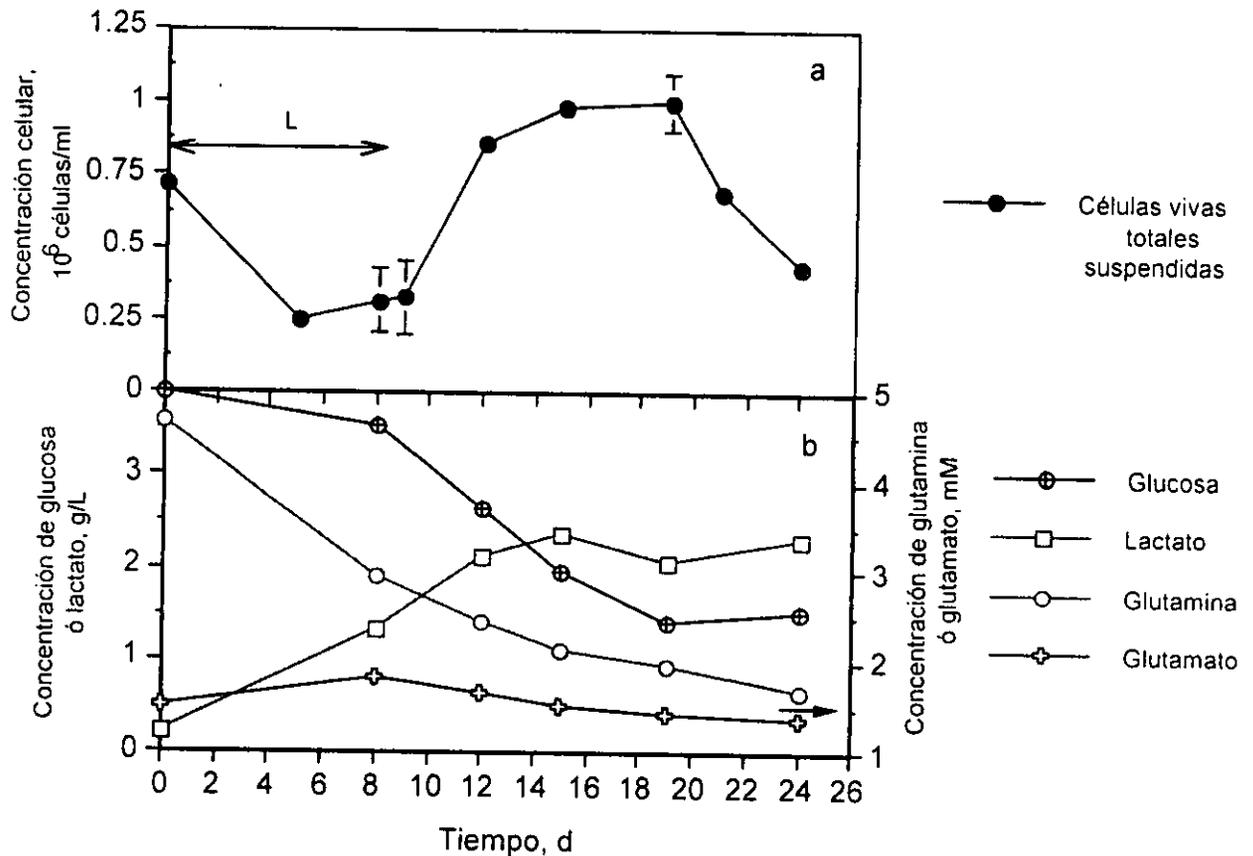


Fig. 23. Cultivo lote de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical con adición de citocinas. Medio IMDM 10% SFB. Cinética correspondiente a una sola muestra. El intervalo (L) indicado por la doble flecha corresponde a la fase lag.

La fase de adaptación o lag (indicada por el intervalo L en las figuras), mostró muerte celular inicial y en ocasiones un periodo estacionario. La disminución celular inicial corresponde probablemente a las células mieloides maduras y eritrocitos remanentes en el inóculo. Este periodo lag tuvo una duración diferente para cada uno de los medios. Con medio IMDM 10% SFB enriquecido, el periodo de adaptación fue de 5 a 13 días (Fig. 23a), en cambio con medio LTBMCM enriquecido fue de 7 a 9 días (Fig. 24), es decir, aunque inicia antes con IMDM, el intervalo es menor con LTBMCM. Este periodo también dependió de la concentración del inóculo. A inóculos muy bajos el periodo lag aumenta.

En la Fig. 23b, se observa que la glucosa se consume, la glutamina se consume/degrada y el lactato se produce. En 2 de 6 replicas con medio IMDM y adición de citocinas se observa consumo y producción de glutamato, en el resto no se observa una tendencia definida. En ambas, la producción correspondió a la fase lag y fue de 0.0217-0.037 mmol L⁻¹d⁻¹, donde la mayor producción corresponde a la observada en la Fig. 23b. De la misma forma el consumo de glutamato se observó durante la fase exponencial y de muerte, y fue de 0.0274-0.0517 mmol L⁻¹d⁻¹. El menor consumo corresponde al observado en la Fig. 23b.

En la Fig. 24a se muestra la cinética celular de dos diferentes muestras de SCU con medio LTBMCM, en donde se observa la reproducibilidad en estos cultivos. Ambas alcanzan la concentración celular máxima entre los días 13 y 15 (mostradas por las líneas punteadas). Se observa en el panel b de la Fig. 24, el comportamiento de la glucosa. En la Muestra 1 ésta se agota en los días 12-13 del cultivo, mientras que en la Muestra 2 a la cual le fue adicionada glucosa al inicio, no ocurre este agotamiento. El agotamiento de la glucosa en la Muestra 1 corresponde al inicio de la fase de muerte y puede interpretarse como la causa de tal disminución celular, sin embargo en la Muestra 2 la glucosa remanente es mayor de 2.25 g/L por lo que otro factor es el responsable del inicio de la fase de muerte. En la Fig. 24c se observa para ambos cultivos que no se agotó la glutamina. A diferencia de otras células animales, donde la glucosa y glutamina son los sustratos que generalmente limitan el crecimiento (Higareda, 1994; Palomares, 1996), en el caso de las CH factores de crecimiento o inhibitorios probablemente tengan un mayor efecto. De otra forma, es posible que en la Muestra 1 el agotamiento de glucosa fue el principal factor limitante al crecimiento y en la Muestra 2 hubo otro factor que limitara antes del agotamiento de glucosa. Por otra parte, se

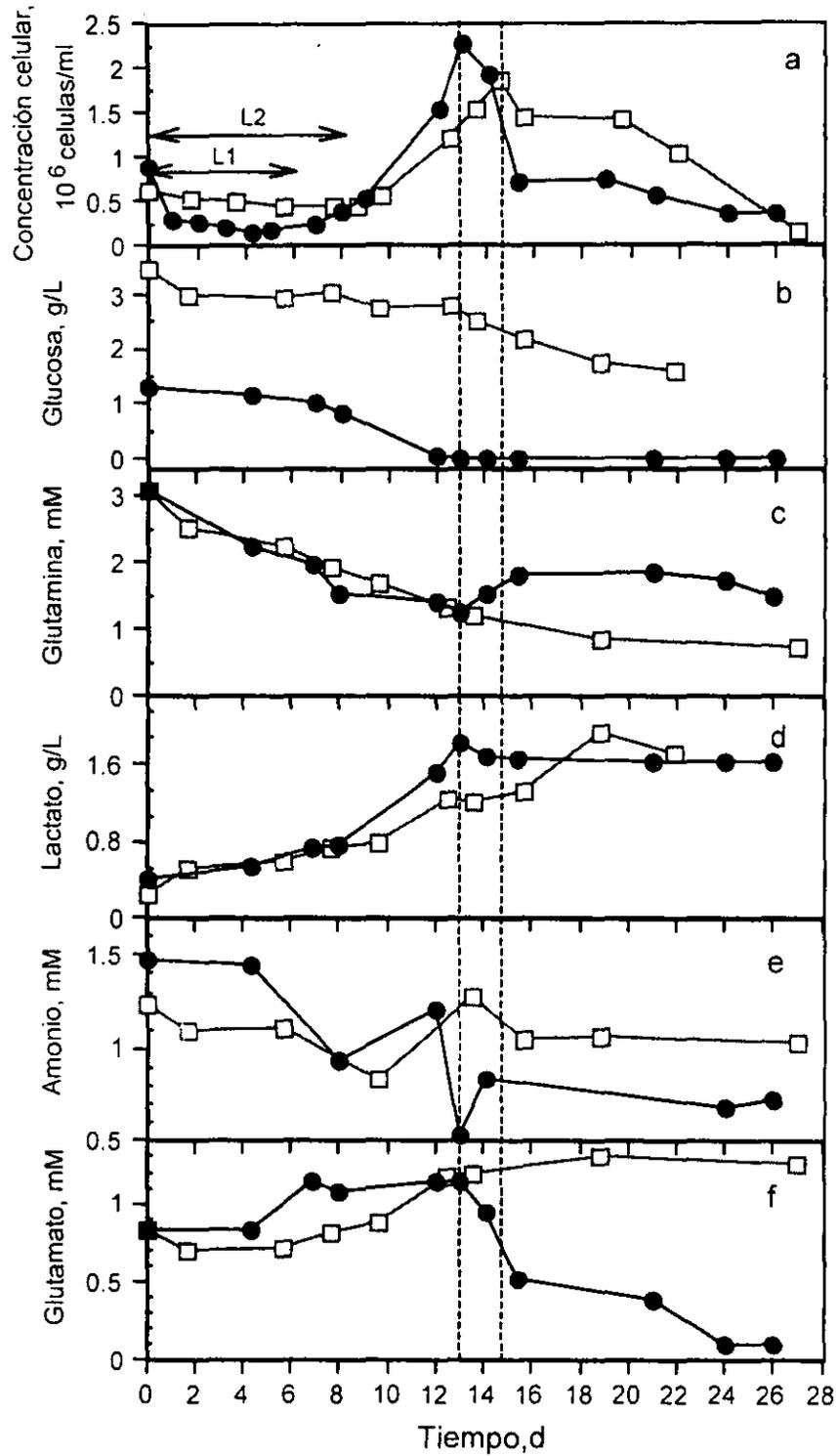


Fig. 24. Cultivos lote de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical con adición de citocinas. Medio LTBM. Muestra 1 (●), concentración de glucosa en el medio: 1.2 g/L. Muestra 2 (□), adición de glucosa hasta 3.5 g/L. L1 y L2 indican el periodo lag de las muestras 1 y 2 respectivamente.

observó en la Muestra 1 que la producción de lactato cesa al agotarse la glucosa (Fig. 24d). Esto nos indica que es la glucosa la principal fuente de producción de lactato. Se observa en la Fig. 24e, que el amonio es consumido por las CH, o probablemente por las células adherentes (De León, 1999), las cuales son generalmente macrófagos en SCU. En el panel f) se muestra el perfil de la concentración de glutamato, en la Muestra 2 éste se produce a razón de $0.04 \text{ mmol L}^{-1}\text{d}^{-1}$ en la fase de crecimiento exponencial, no observándose en algún momento consumo. En la Muestra 1 se observa producción de glutamato durante la fase de crecimiento exponencial de $0.027 \text{ mmol L}^{-1}\text{d}^{-1}$, y consumo durante la fase de muerte de $0.074 \text{ mmol L}^{-1}\text{d}^{-1}$, el cual es ligeramente mayor que el encontrado con IMDM. Esta diferencia en el comportamiento del glutamato puede deberse a que en la Muestra 1 se encuentre algún tipo de célula que esté consumiendo glutamato, y que su proporción en la Muestra 2 sea menor (el linaje y proporción de células sanguíneas en estos cultivos no fueron definidos). Por otra parte, el consumo de glutamato en la Muestra 1 coincide con el agotamiento de glucosa, lo cual sugiere que aquel haya podido ser usado como fuente de carbono secundaria.

La μ evaluada en la fase exponencial para cultivos con LT BMC fue mayor que la encontrada para los cultivos con IMDM (Tabla 10). De la misma forma, se observa efecto positivo sobre la expansión celular máxima con LT BMC, la cual fue de 1.6 veces mayor que con IMDM. Por otra parte el intervalo en el $Y_{\text{lac}/\text{glc}}$, fue menor con IMDM ($1.35\text{-}1.84 \text{ mol}_{\text{lac}}/\text{mol}_{\text{glc}}$) que el encontrado con LT BMC ($1.76\text{-}1.98 \text{ mol}_{\text{lac}}/\text{mol}_{\text{glc}}$). Lo cual está de acuerdo con las observaciones hechas en cultivos con LT BMC sin citocinas con respecto a la mayor producción de lactato con este medio en comparación con IMDM. Esta mayor producción de lactato puede ser debida a la mayor concentración de células adherentes en cultivos con LT BMC. Con respecto a los coeficientes metabólicos q_{glc} y q_{lac} , para los cultivos con LT BMC fueron menores que los observados para IMDM.

En los cultivos con adición de citocinas se evaluó la expansión de progenitores en dos diferentes momentos, al inicio de la fase exponencial y poco antes de la máxima concentración celular. Con medio LT BMC, la expansión de progenitores eritroides fue mayor al día 8 que al día 12, mientras que los mieloides tempranos y tardíos tuvieron una mayor expansión al día 12. Los distintos progenitores en cultivo se expanden en tiempos diferentes, los eritroides son los primeros, los cuales aparentemente tienen un tiempo de vida menor, y posteriormente los mieloides, tanto tardíos como tempranos, los cuales se encuentran todavía en tiempos tardíos

del cultivo. Lo anterior se observó de la misma forma en CLP, lo que indica que es independiente del tipo de cultivo.

Tabla 10. Datos cinéticos y estequiométricos de sangre de cordón umbilical en cultivos lote, medios LTBMCM e IMDM con adición de citocinas.

Parámetros	Muestra 1 LTBMC	Muestra 2 LTBMC (adición de glucosa)	Muestras con IMDM*
μ, d^{-1}	0.33	0.24	0.11-0.18, n=4
Expansión celular máxima	2.58	2.9	1.38-1.85, n=4
$Y_{lac/glc}, mol/mol$	1.98	1.76	1.35-1.84, n=4
$q_{glc/x},$ $ng d^{-1} cel^{-1}$	0.25	0.065	0.33-0.42, n=2
$q_{lac/x},$ $ng d^{-1} cel^{-1}$	0.19	0.14	0.24-0.32, n=2

* Para los cultivos con IMDM se muestran los intervalos encontrados en las diferentes cinéticas.

Las cinéticas de las Figs. 23 y 24 (Muestra 1), provienen de una misma muestra de SCU, estas muestran que el medio LTBMC con citocinas es mejor para las CH que el IMDM con citocinas. La expansión celular máxima con respecto al inóculo con IMDM fue de 1.385 veces mientras que con LTBMC fue de 2.58. En la fase lag mueren células maduras, y por lo tanto el crecimiento celular observado en la fase exponencial (día 5 con IMDM y día 4 con LTBMC), se debió a las células progenitoras que se encontraban antes de iniciar dicho periodo. Es debido a ello que se observan mayores diferencias entre los medios con respecto a la expansión celular máxima calculado a partir del número de células presentes al inicio de la fase de crecimiento. Esta expansión fue mayor para LTBMC: 13.4, mientras que para IMDM fue de 4.03.

Con respecto a los progenitores totales evaluados al inicio de la fase exponencial en ambos cultivos (día 9 con IMDM y día 8 con LTBMC) se observó que con medio LTBMC la máxima expansión alcanzada fue de 10.8 veces, mientras que con IMDM fue de 5.7 veces (Fig. 25). Así también en cuanto a progenitores eritroides y multipotentes, con LTBMC es más del doble. La diferencia entre los medios está dada prácticamente por el suero de caballo, lo cual sugiere que el medio LTBMC proporciona una gran ventaja sobre el IMDM: promueve la

formación de estroma y por lo tanto se estén produciendo probablemente factores de crecimiento necesarios para la expansión de las CH.

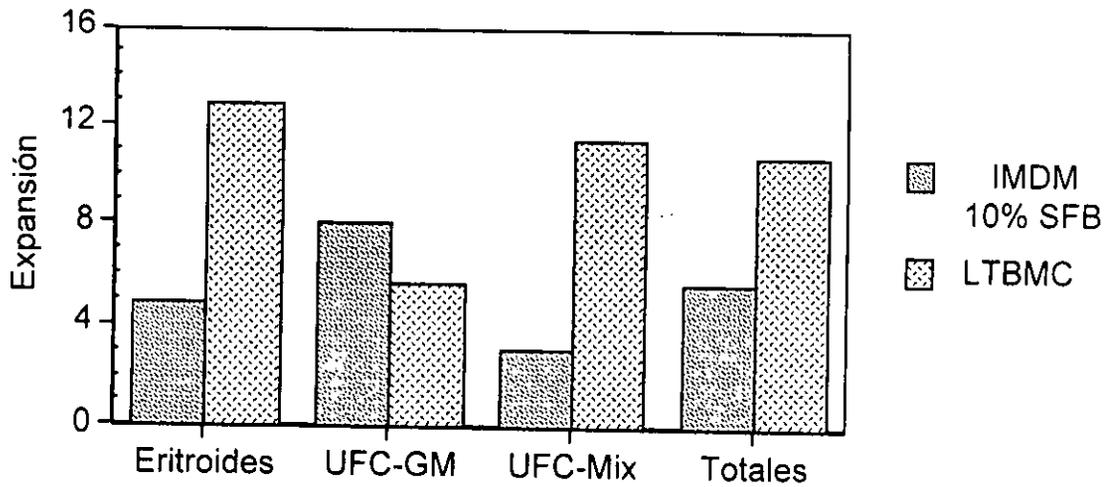


Fig. 25. Efecto del medio de cultivo sobre la expansión de progenitores en cultivos lote con adición de citocinas. Células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical. Evaluación al inicio de la fase exponencial: (día 8) LT BMC y (día 9) IMDM 10% SFB.

5.4.3 Efecto del Suero Fetal Bovino

Con el fin de evaluar el efecto de la concentración de SFB sobre las cinéticas de CH sin adición de citocinas, se realizaron cultivos a diferentes concentraciones: 0, 5, 8, 10, 20 y 30%. En la Fig. 26 se muestran las cinéticas de células suspendidas a diferentes concentraciones iniciales de SFB. Estas fueron iniciadas con el mismo tamaño de inóculo y se presentan en barras para mejorar su análisis. Se observa que al día 4 hay diferencia de 8 y 10% con respecto a 30% y en el día 9, observamos diferencia de 0 y 8% con respecto a 30%, siendo mayor el número de células a las concentraciones menores de SFB. Al día 16 no se realizaron duplicados debido al bajo volumen de muestra, sin embargo la tendencia indica que a 8 y 10% de SFB el cultivo es mejor. Las diferencias entre la distintas concentraciones de suero se muestran en la Fig. 27a, donde se grafica la diferencia celular entre un día específico del cultivo (indicado por el subíndice de X) y el día de inicio. La mayor concentración observada tanto en el día 4 como en el 16 fue a 10% de SFB, lo cual sugiere que 10% SFB puede ser una concentración óptima. Las diferencias celulares ($X_t - X_0$) son negativas debido a que la concentración celular a lo largo del cultivo fue decreciendo por falta de citocinas, no observándose por lo tanto expansión celular en ningún momento.

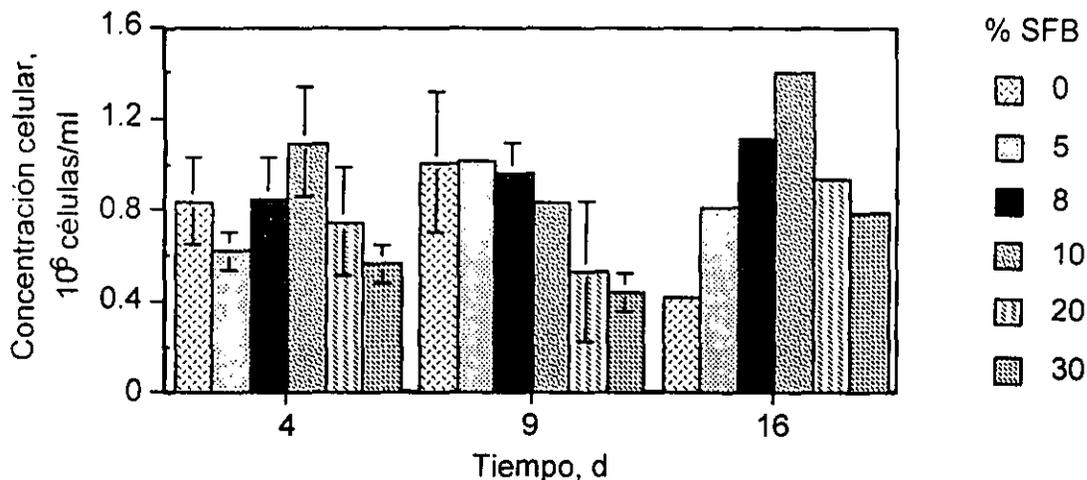


Fig. 26. Cinética de células hematopoyéticas humanas de sangre de cordón umbilical a diferentes concentraciones de suero fetal bovino. Cultivo lote sin adición de citocinas, medio IMDM. Datos de una muestra. Las barras indican la desviación estándar.

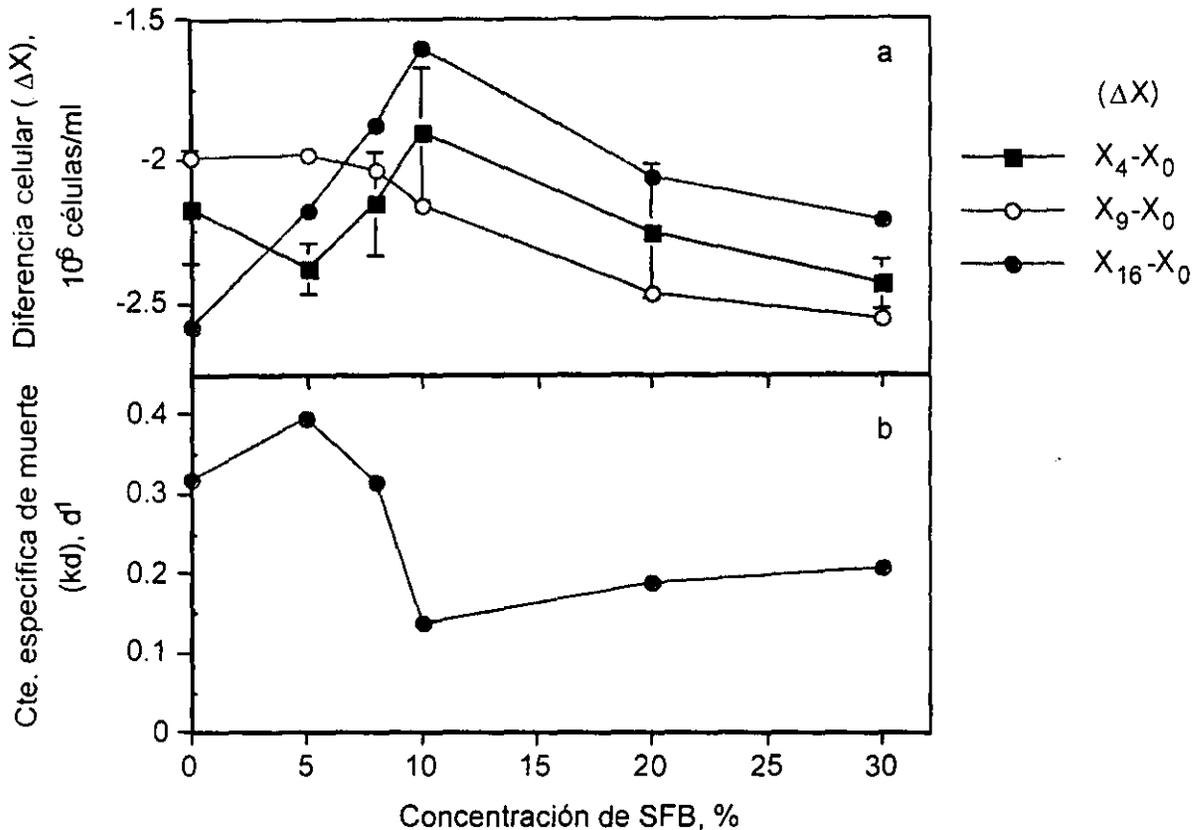


Fig. 27. Efecto del suero fetal bovino en cultivos de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical sobre el incremento celular y la constante de muerte. Cultivo lote sin adición de citocinas, medio IMDM. Datos de una muestra. Las barras indican la desviación estándar.

En la Fig. 27b, se muestra el efecto del SFB sobre la constante de muerte aparente (k_d), donde a 10% se obtuvo el menor valor ($0.134 d^{-1}$), comparada con las demás concentraciones probadas. En exploraciones hechas al microscopio, se encontró que el SFB promovió la diferenciación celular hacia la línea monocítica. A concentraciones de 20-30% de SFB se observó menor cantidad de eritrocitos y presencia evidente de macrófagos y células fibroblastoides, así como acidificación del medio debido a la producción de lactato. En cambio a bajas concentraciones de SFB o en ausencia de él (0 y 5%), la mayor cantidad de células fueron de tipo eritroide. En la Fig. 28, se grafica la relación entre células to con respecto a células MN. Se observa que a 30% de SFB esta relación es menor a la mayoría de los demás concentraciones durante todo el cultivo. Al final del cultivo (día 16), momento en el cual ya deberían haber muerto las células eritroides maduras, esta relación es casi 5 veces más alta a

0% que a 30% de SFB. Lo cual nos indica que el número de eritrocitos a menores concentraciones de SFB fue mayor que en las otras condiciones. Esta tendencia se observa de la misma forma desde 5 a 20% en la misma edad.

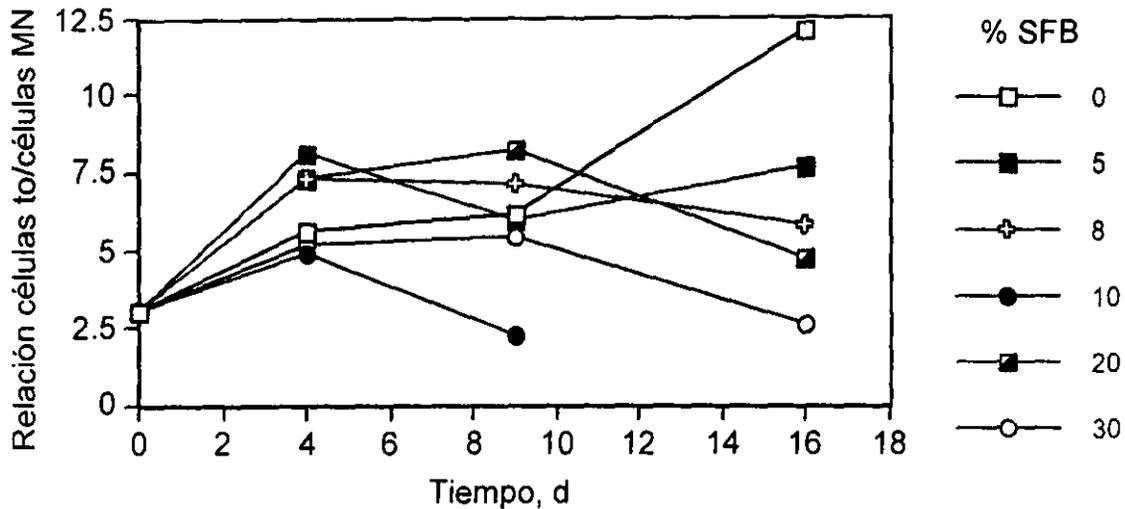


Fig. 28. Relación entre células totales (nucleadas) y células mononucleares en cultivos lote a diferentes concentraciones de suero fetal bovino. Medio IMDM sin adición de citocinas. Datos de una muestra.

El efecto sobre los progenitores hematopoyéticos se muestra en la Fig. 29, la evaluación se realizó únicamente a 0, 8 y 30% de SFB. Sobre los progenitores eritroides totales se observa que su concentración es ligeramente mayor a 8% que a 0%, en cambio a 8% es casi el doble que a 30% de SFB. Los mieloides tardíos tienen niveles similares en ausencia de suero y a 8%, que a su vez son más de 3 veces que a 30%. Por otra parte en mieloides tempranos la concentración es similar en cualquiera de las condiciones evaluadas, observándose ligero aumento a 0%. En cuanto a progenitores multipotentes es clara la diferencia entre 0% con respecto a 8 y 30%. Es evidente que altos niveles de SFB (30%) no mantiene a los progenitores, principalmente los progenitores tempranos. Los factores inhibitorios y de crecimiento que se encuentren en el suero, promueven aparentemente la diferenciación hacia la línea monocítica principalmente.

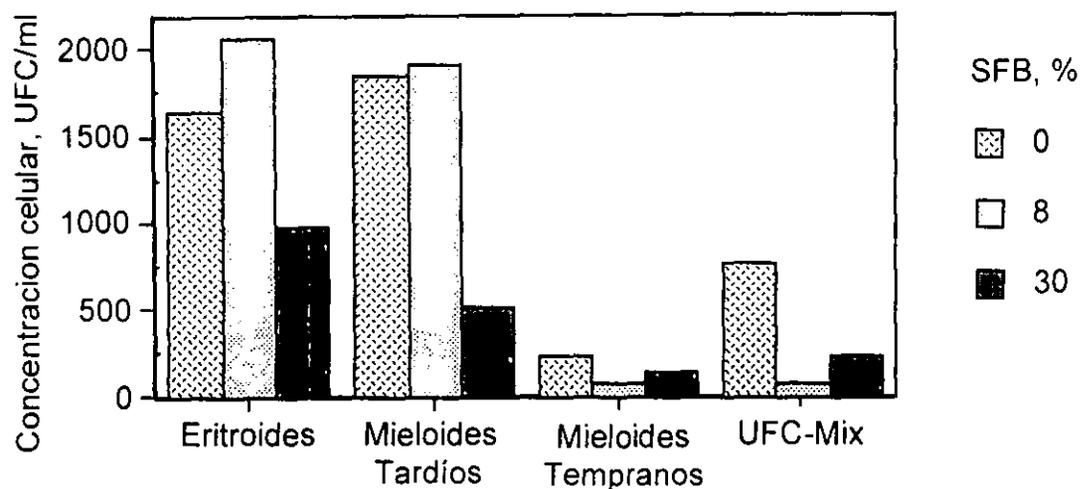


Fig. 29. Efecto del suero fetal bovino sobre progenitores hematopoyéticos en cultivos lote sin adición de citocinas. Evaluación al día 9. Medio IMDM. Datos de una muestra.

5.4.4 Efecto de la concentración inicial de glucosa

Para evaluar el efecto de la concentración inicial de glucosa sobre las CH, se adicionó glucosa a diferentes concentraciones a cultivos sin adición de citocinas en medio IMDM. Las cinéticas celulares no observaron diferencias significativas, debido a ello no se muestran y se realizó el análisis en base a las diferencias observadas en sus constantes aparentes de muerte, porcentaje de sobrevivencia y viabilidad.

Como se puede apreciar en la Fig. 30a, la k_d , no tuvo diferencias significativas a las distintas concentraciones de glucosa probadas, sin embargo, la tendencia muestra menores valores a concentraciones entre 1 y 2 g/L. Esta constante fue evaluada en dos cultivos diferentes hacia los días 8-9 (correspondiente a la mitad de la edad de los cultivos). En los siguientes días, las cinéticas de crecimiento no muestran tendencias definidas. El efecto sobre el porcentaje de sobrevivencia (es la relación porcentual entre el número final y el inicial de células vivas) se observa a su vez en la Fig. 30b, y nos indica qué tanto han logrado sobrevivir las células a diferentes concentraciones de glucosa. Este porcentaje está calculado en dos diferentes muestras como el número de células vivas a un día determinado con respecto al inóculo. Los círculos vacíos representan la tendencia del porcentaje de sobrevivencia en la

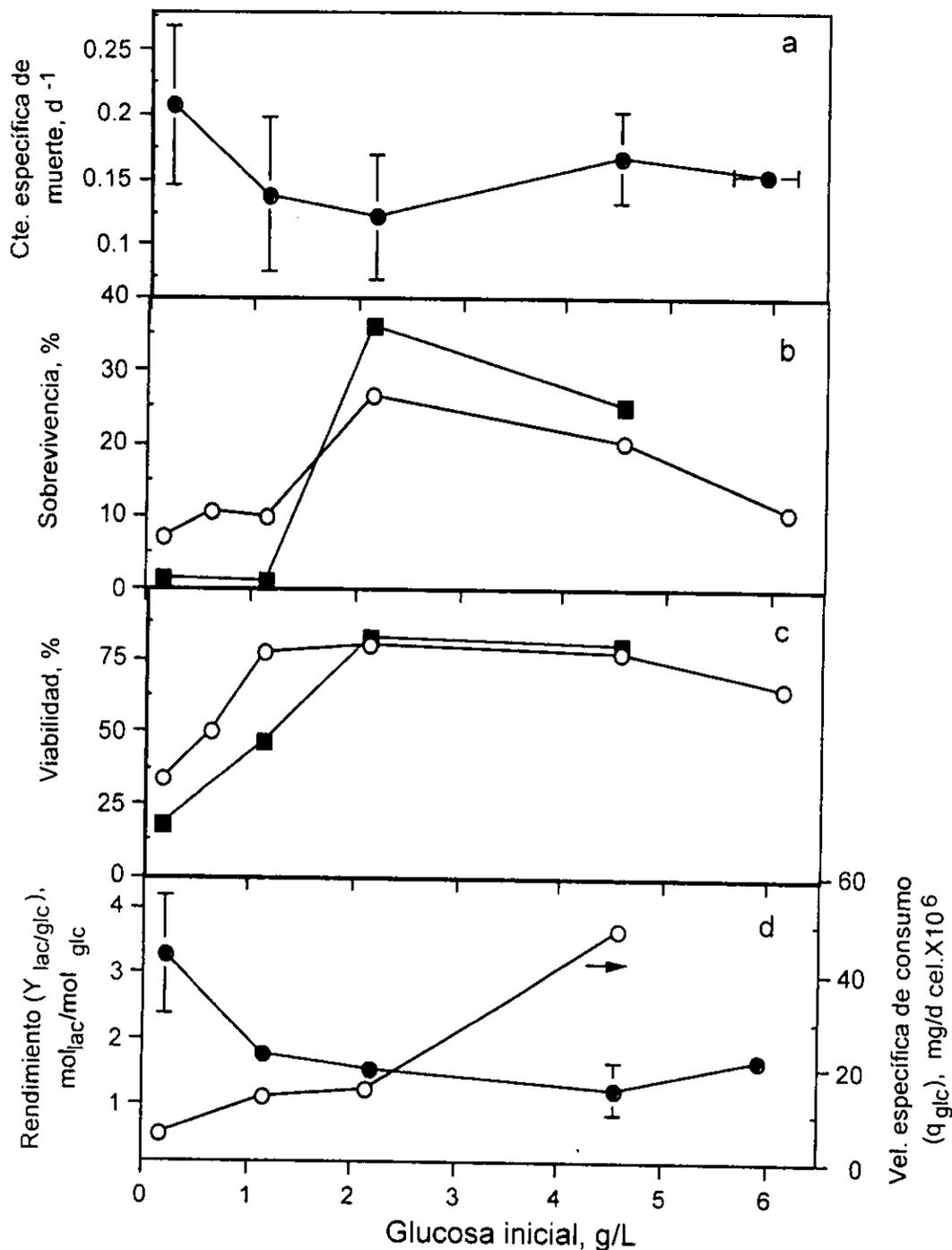


Fig. 30. Efecto de la concentración inicial de glucosa sobre diferentes parámetros cinéticos y estequiométricos. Células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical. Medio IMDM 10% SFB sin citocinas. k_d evaluada entre los días 8-9 del cultivo, sobrevivencia al día 9 (○) y al 11 (■), viabilidad al día 19 (○) y al 15 (■), y q_{glc} al día 4. Páneles a y d, (●) promedio de tres cinéticas diferentes. Páneles b y c, dos muestras diferentes (■, ○), y panel d (○) una muestra. Las barras indican desviación estándar.

Muestra 1 (evaluado en el día 9). En esta muestra se observó que a las concentraciones 2.1 y 4.5 g/L, el porcentaje de sobrevivencia fue mayor que el resto de las condiciones. En la Muestra 2 (cuadros) el porcentaje (evaluado en el día 11) se comportó de la misma forma que la muestra 1, siendo mayor en las condiciones de 2.1 y 4.5 g/L de glucosa inicial, e inferior a 0.1 y 1.1. La tendencia de menor sobrevivencia a 6 g/L, sugiere que concentraciones elevadas de glucosa no son favorables para el cultivo, y que aparentemente existen concentraciones óptimas para CH y que podrían estar cercanas a 2 g/L. Cabe mencionar que el medio IMDM está diseñado con 4.5 g/L y el medio LTBMCM con 1 g/L, ambos fuera del límite aparentemente óptimo. La viabilidad mostrada es aquella encontrada al final del cultivo y se observa menor (20%) a concentraciones menores de 1 g/L en las dos diferentes muestras (Fig. 30c).

La glucosa es una de las fuentes principales de carbono en cultivos de células animales. Se ha observado en hibridomas que niveles limitantes de glucosa disminuyen la constante específica de crecimiento μ , el rendimiento $Y_{lac/glc}$, la producción de anticuerpos monoclonales (Higareda, 1994) y la velocidad específica de consumo de glucosa (Doverskog, 1997, Higareda, 1994; Linz, 1997). En el presente trabajo se encontró que en CH de SCU la velocidad específica de consumo de glucosa disminuye a menores concentraciones iniciales de glucosa (Fig. 30d), y de forma inversa, el rendimiento $Y_{lac/glc}$ aumenta cuando los cultivos se encuentran limitados de glucosa (Fig. 30d). Esto último contrasta con reportes de cultivos de hibridomas (Higareda, 1994) y otras células animales tales como BHK (Linz, 1997). Es probable que la alta producción de lactato a condiciones limitantes de glucosa se debió en gran medida a la presencia al final de los cultivos de macrófagos o monocitos (observaciones hechas al microscopio). Lo anterior sugiere que este tipo de células podrían ser metabólicamente más activas, observándose su presencia en las etapas tardías del cultivo.

5.4.5 Efecto de la concentración inicial de glutamina y del inóculo

Una fuente de carbono importante en el cultivo de células animales es la glutamina (Gln). En la formulación del medio de cultivo para CH, la glutamina es adicionada normalmente a una concentración final de 2 mM en LTBMCM- α medio, y a 4 mM en IMDM. Sin embargo, no se tienen reportes sobre el efecto de la concentración inicial de este aminoácido en el cultivo de CH.

De la misma forma que con glucosa, se realizaron cultivos sin adición de citocinas a diferentes concentraciones de glutamina inicial: 0.04, 0.85, 1.8 y 3.5 mM. La cinética sigue la misma tendencia mostrada para cultivos lote sin citocinas, la cual se mantuvo en fase de muerte. La viabilidad celular a lo largo del cultivo no varió entre las diferentes condiciones, disminuyendo en forma global hasta cerca de 75% al día 10. En cambio el mayor porcentaje de sobrevivencia (Fig. 31), al día 10 fue de 89 % para 1.8 mM, mientras que para las demás condiciones se mantuvo entre 40 y 50 %. Sin embargo en el resto de los días la tendencia mostró que únicamente a 0.04 mM se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia menor. El rendimiento $Y_{lac/glc}$ mostrado en la Fig. 31 aumenta a 0.75 a 1.8 mM de Gln, mientras que el resto se encuentra entre 1.25 a 1.27 mol_{lac}/mol_{glc}.

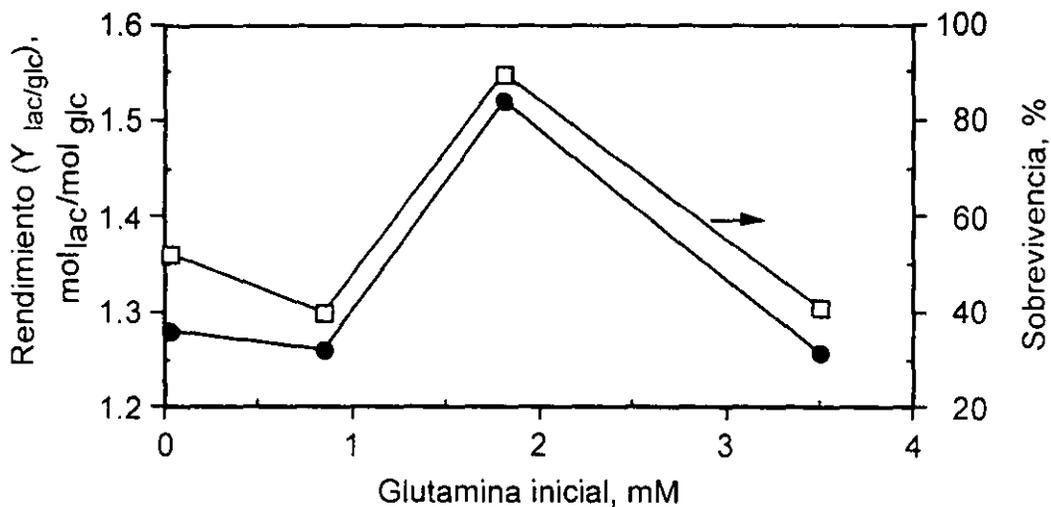


Fig. 31. Efecto de la concentración inicial de glutamina sobre el rendimiento y el porcentaje de sobrevivencia al día 10. Cultivos lote de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical sin adición de citocinas, medio IMDM 10% SFB. El porcentaje de sobrevivencia es la relación porcentual de las células vivas al día 10 y las del día 0.

Por otra parte, no se observó expansión de progenitores evaluada al día 10 (Fig. 32). Sin embargo, se observa que los mayores niveles de progenitores totales 0.72 y 0.68 veces se tuvieron a 3.5 y 1.8 mM de Gln respectivamente; lo cual con respecto a 0.03 mM de Gln inicial fue de 2.6 y 2.5 veces mayor respectivamente. De la misma forma, los mayores niveles de progenitores eritroides corresponden a 1.8 y 3.5 mM de Gln inicial, los cuales se encuentran muy próximos a los encontrados en el inóculo. En cuanto a progenitores mieloides tardíos y tempranos, así como a multipotentes (UFC-Mix), no es claro el efecto de la concentración

inicial de Gln sobre su expansión. Con estos últimos datos se puede concluir que 0.04 y 0.85 mM de Gln corresponden a niveles limitantes en este tipo de cultivos.

Por otra parte se analizaron cultivos, con adición de citocinas (Metho Cult 10% o adición de interleucinas solubles) a diferentes concentraciones de glutamina: 0.24 ± 0.13 mM, 2.9 ± 0.31 , 4.3 ± 0.56 y 6.3 ± 0.27 mM. Las desviaciones estándar se deben a que la concentración de Gln inicial se ajustó en el momento de inocular y a pesar de que la solución de Gln concentrada se mantuvo bajo congelación, es posible que haya existido degradación durante su manipulación.

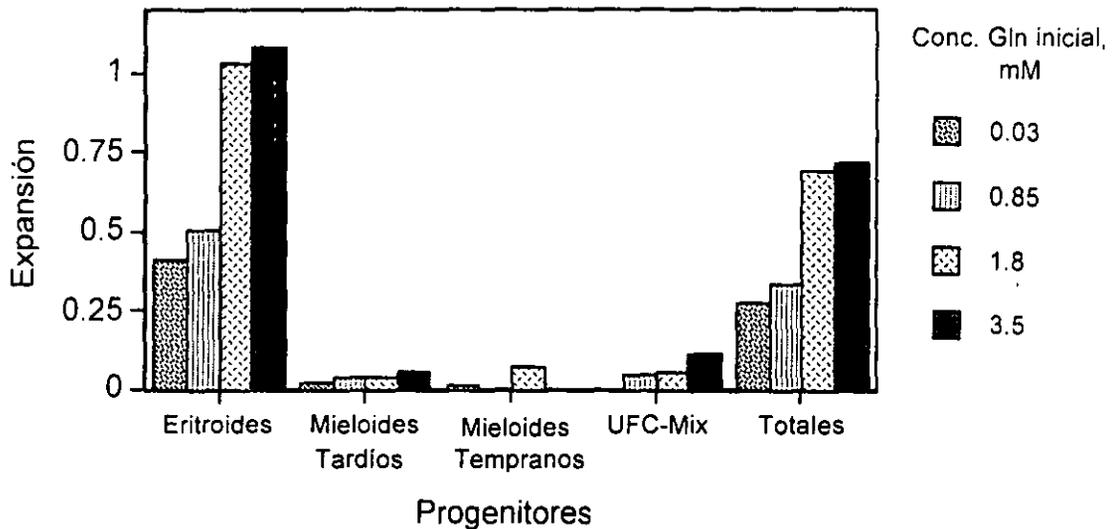


Fig. 32. Efecto de la concentración inicial de glutamina sobre la expansión de progenitores hematopoyéticos al día 10. Cultivos lote de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical sin adición de citocinas. Medio IMDM 10% SFB.

Una cinética típica se muestra en la Fig. 33 a tres concentraciones de Gln inicial: 0.03, 3.2 y 6.3 mM. En esta muestra se observó que 3.2 mM tuvo mejor efecto que al resto de las condiciones (panel a), donde la expansión celular máxima (día 22) fue de 1.5 veces mayor a diferencia de 0.6 y 1 veces a 0.03 y 6.3 mM respectivamente. En el panel b y c se muestra el comportamiento de glucosa y lactato respectivamente. El rendimiento $Y_{lac/glc}$ a 0.03, 3.2 y 6.3 mM de Gln fue de 1.5, 1.84 y 0.6 mol/mol, respectivamente. A 3.2 mM este rendimiento fue mayor en 1.2 y 3 veces que el resto de las condiciones (0.03 y 6.3 respectivamente). En el panel d se muestran las diferentes concentraciones iniciales de Gln y su comportamiento. La expansión de progenitores en este cultivo se muestran en la Fig. 36 (muestra C). Se observa en

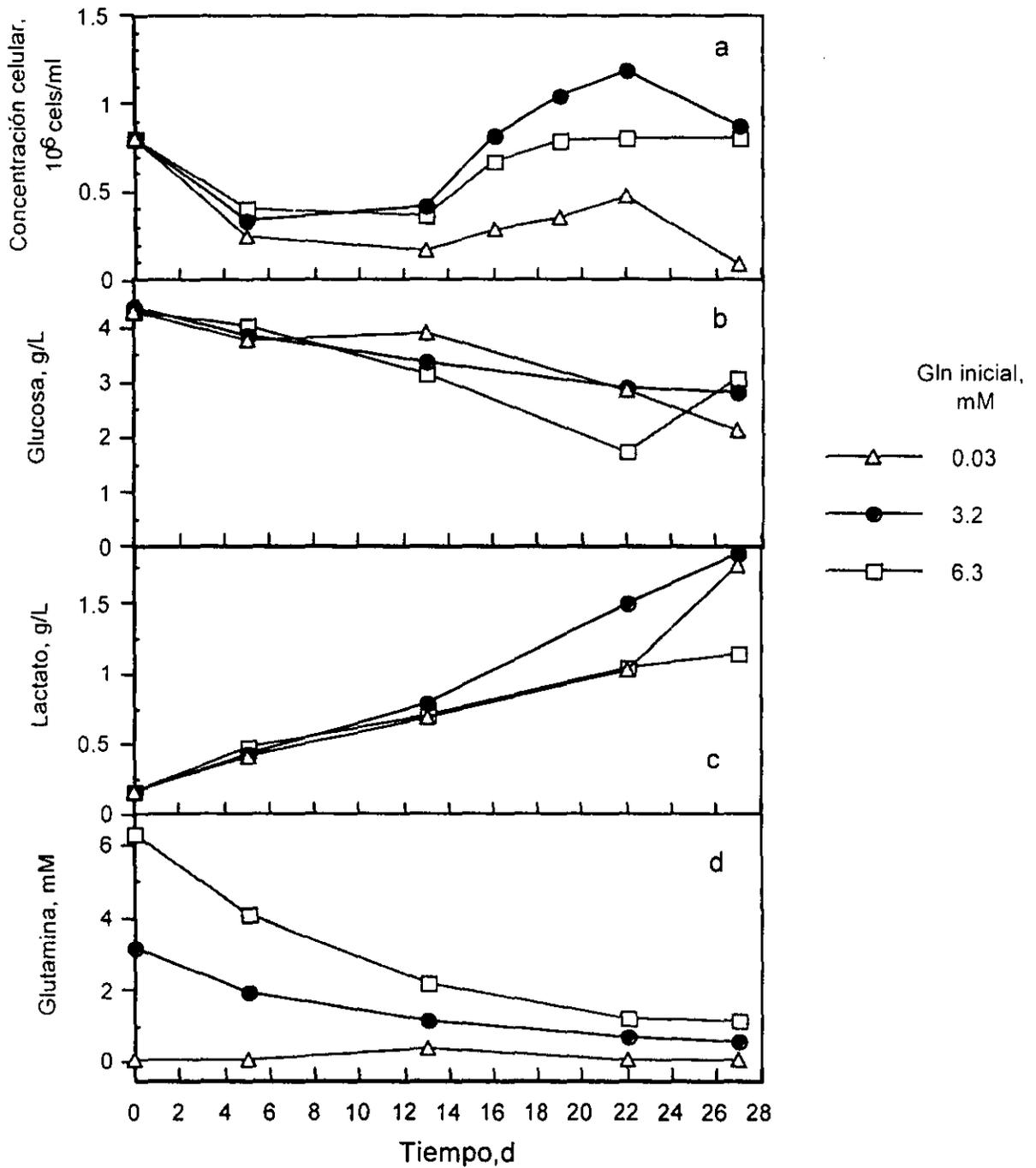


Fig. 33. Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y glutamina y producción de lactato en cultivos lote a diferentes concentraciones iniciales de glutamina. Medio IMDM 10% SFB, con de citocinas.

los diferentes linajes, que 3.2 mM de Gln resultó con las mayores expansiones de las condiciones evaluadas.

En el resto de los cultivos, se varió simultáneamente el inóculo desde 0.06 hasta 0.8×10^6 células MN/ml. Debido a que estos cultivos se realizaron con adición de citocinas se observó crecimiento celular y el análisis de los datos se realizó con respecto a la expansión y a μ .

Tabla 11. Velocidad específica de crecimiento (d^{-1}) a diferentes concentraciones de glutamina inicial e inóculo.

Gln inicial, mM	Inóculo, MN $\times 10^6$ /ml			
	0.06	0.4	0.6	0.8
0.24 \pm 0.13	0.459	0.184	0.155	0.111
2.9 \pm 0.31	0.55*	0.23*	0.162	0.113
4.3 \pm 0.56	0.293	0.175	0.182	0.154*
6.3 \pm 0.27	0.149	0.135*	0.132*	0.131

*= valores calculados.

La velocidad específica de crecimiento, a las diferentes condiciones probadas se presenta en la Tabla 11, de la misma forma, la máxima expansión celular se muestra en la Tabla 12. En las condiciones en donde no se tuvieron datos experimentales, se calcularon mediante regresiones logarítmicas o lineales con la finalidad de mostrar las tendencias al evaluar dos condiciones simultáneas. De estas tablas se generaron los gráficos de la Fig. 34 y Fig. 35, respectivamente.

Tabla 12. Expansión celular a diferentes concentraciones de glutamina inicial e inóculo.

Gln inicial, mM	Inóculo, MN $\times 10^6$ /ml			
	0.06	0.4	0.6	0.8
0.24 \pm 0.13	7.289	2.327	2.161	0.591
4.3 \pm 0.56	12.601	5.555	1.385	1.14*
6.3 \pm 0.27	26.52	7.83*	3.83*	1.004

*=valores calculados.

En la Fig. 34 observamos que un inóculo a concentración de $0.6-0.8 \times 10^6$ células MN/ml, la concentración inicial de glutamina no tiene prácticamente efecto sobre la μ , siendo ésta ligeramente mayor a 4.3 mM. En cambio, a un inóculo de 0.06×10^6 células MN/ml, la μ aumenta al disminuir la concentración de Gln de 0.2 a 3 mM. A concentraciones mayores de Gln, la μ muestra una ligera disminución.

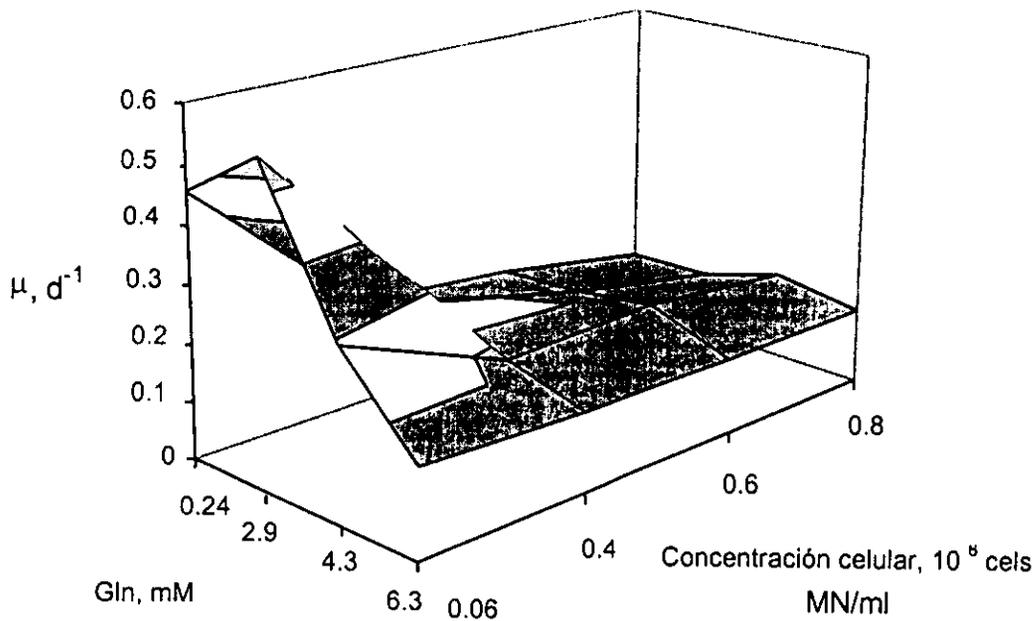


Fig. 34. Efecto de la concentración inicial de glutamina y el inóculo sobre la velocidad específica de crecimiento. Cultivos lote de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical. Medio IMDM 10% SFB con adición de citocinas.

La expansión celular observada fue la máxima en cada una de las cinéticas y corresponde a diferentes edades del cultivo. En la Fig. 35 observamos que a 0.8×10^6 MN/ml, la concentración inicial de Gln no representa ningún efecto sobre la expansión celular. En cambio a inóculos menores (0.06×10^6 MN/ml) se observa un efecto drástico, siendo mayor la expansión a concentraciones cercanas a 6 mM. El efecto del inóculo sobre el desarrollo del cultivo ha sido observado por Koller *et al.* (1996), encontrando de la misma forma que un inóculo pequeño promueve la expansión celular, mientras que un inóculo grande promueve el número total de células recuperadas. Por otra parte, iniciando con inóculos pequeños (0.06×10^6 MN/ml), una concentración inicial alta de Gln (6 mM), aseguró que en el momento de la mayor expansión, la concentración de Gln en cultivo fue cercana a 1 mM, mientras que en el resto de las cinéticas con inóculos mayores, la Gln se había agotado o degradado.

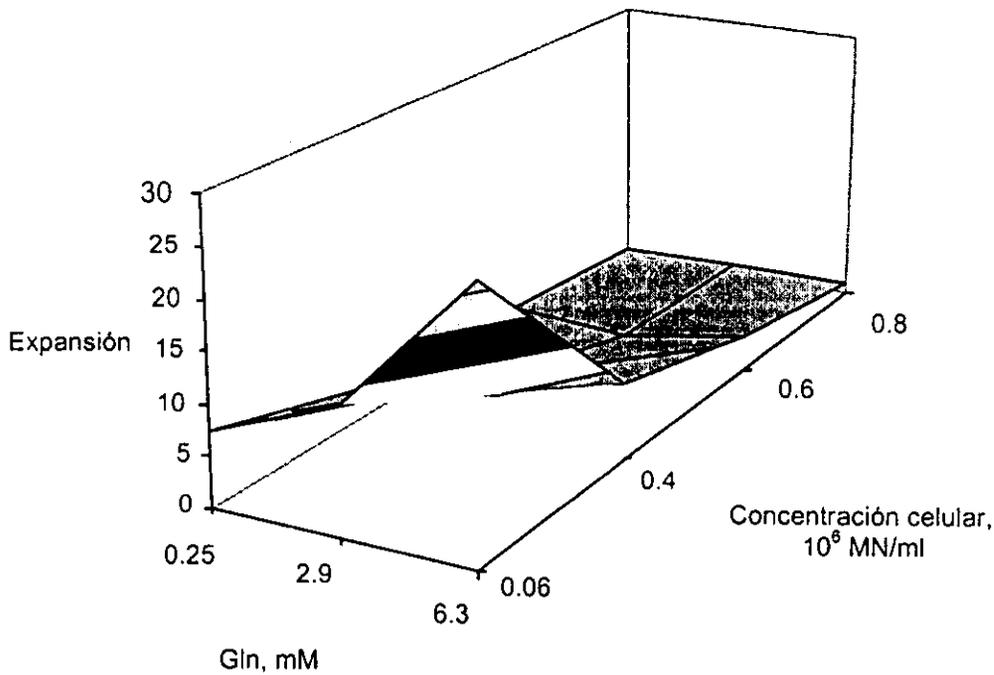


Fig. 35. Efecto de la concentración inicial de glutamina y el inóculo sobre la expansión celular. Cultivos lote de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical. Medio IMDM 10% SFB con adición de citocinas.

La expansión de progenitores hematopoyéticos en tres diferentes muestras, se observa en la Fig. 36. En los progenitores eritroides, la mayor expansión se observó a la menor concentración de Gln. Los progenitores mieloides tardíos, se ven favorecidos a concentraciones altas 3, 4.35, así como los mieloides tempranos. Con respecto a los progenitores multipotentes para la muestra B no se observa prácticamente diferencia entre 0.2 y 4 mM. Sin embargo, para el resto de las muestras entre 3 y 4 mM de Gln inicial fue favorable. La expansión elevada en progenitores eritroides, enmascara la expansión de progenitores totales.

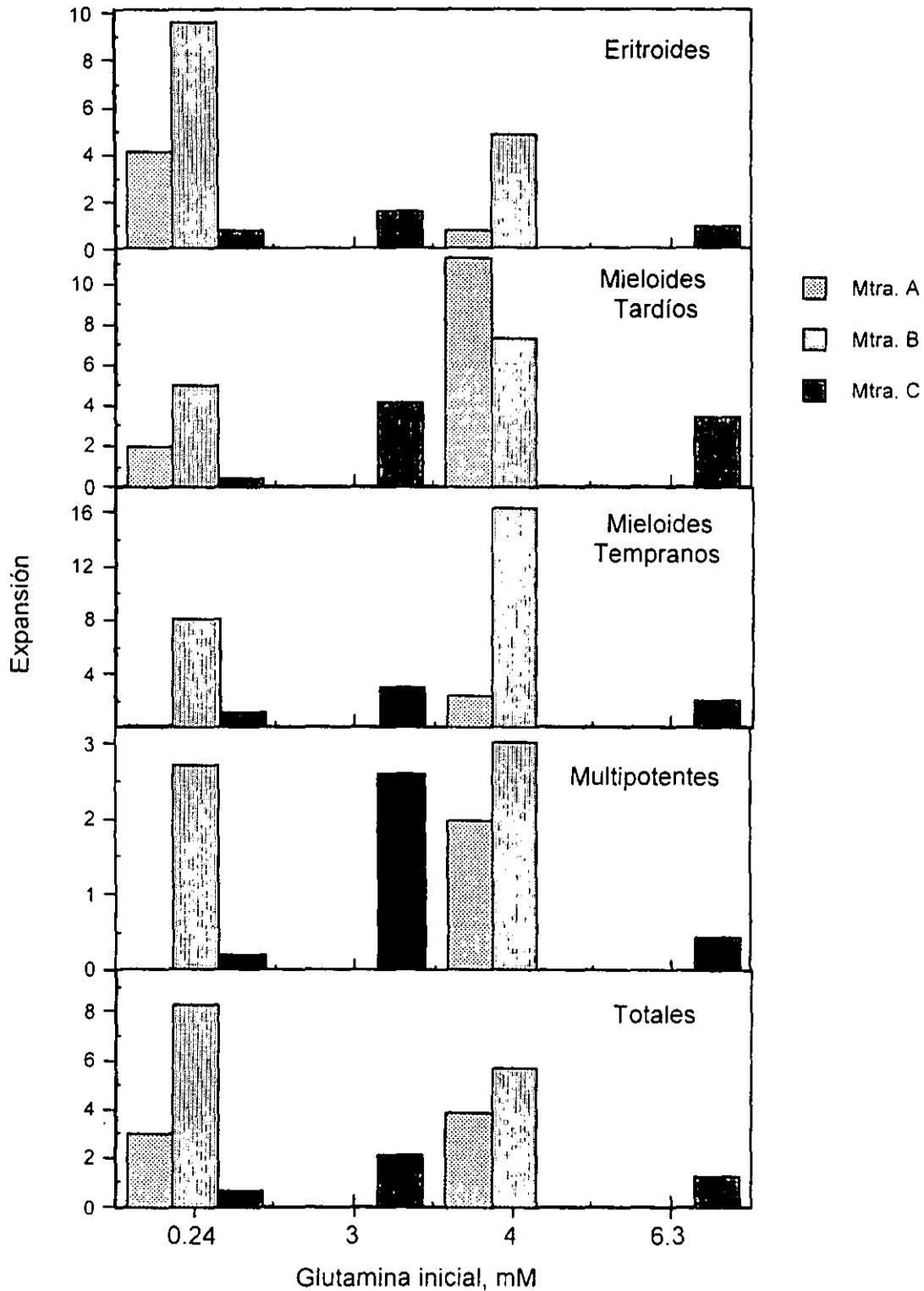


Fig. 36. Expansión de progenitores hematopoyéticos a diferentes concentraciones de glutamina inicial. Evaluación al inicio de la fase exponencial. Cultivos lote de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical con adición de citocinas. Medio IMDM 10% SFB.

5.4.6 Efecto Tóxico del Amonio

Para evaluar el efecto tóxico del amonio, se realizaron cultivos lote utilizando medio con citocinas a diferentes concentraciones iniciales de amonio. En la Fig. 37a se muestra la cinética celular, se observa que hasta 3.8 mM la concentración celular alcanzada es similar al control aunque desplazada 2 días, en cambio a mayores concentraciones, el amonio inhibe el crecimiento celular. El control está representado por la concentración de amonio de 0.8 mM, este nivel corresponde a la aportación del SFB y del inóculo al medio de cultivo. En el panel b y c se presentan las cinéticas de glucosa y lactato respectivamente a cada una de las condiciones evaluadas. Los rendimientos $Y_{glc./lac}$ en cada una de las condiciones (0.8, 2.5, 10.5 y 14.4 mM) fueron muy cercanos entre ellos: 1.8, 1.6, 1.6 y 1.5 mol/mol. En el panel d se presenta el comportamiento del glutamato, se observa que éste se produce durante la fase lag y se consume en la fase de crecimiento celular y de muerte. La producción y el consumo de glutamato en las diferentes condiciones fueron poco variables: 0.0517 y 0.064 mmol L⁻¹d⁻¹ respectivamente. En el panel e de la Fig. 37 se observa la cinética de amonio, la cual difiere para cada una de las condiciones.

Tabla 13. Consumo y producción de amonio en cultivos lote con adición de citocinas.

Amonio inicial, mM	Consumo, mmol L ⁻¹ d ⁻¹ (periodo evaluado, d)	Producción, mmol L ⁻¹ d ⁻¹ (periodo evaluado, d)
0.8	0.06 (7-19)	0.2 (0-7)
2.5	0.18 (0-3)	0.23 (3-7)
3.8	0.13 (0-7)	nsd
10.6	2.17 (0-3)	nsd
14.4	2.7 (0-3)	nsd

nsd = no se detectó.

En la Fig. 37e se observa que a altas concentraciones iniciales de amonio (10.6 y 14.4 mM), su consumo es elevado en los primeros días (Tabla 13). A 2.5 y 3.8 mM de amonio inicial este consumo es menor y en el cultivo control (0.8 mM) no se observa consumo en los primeros días. Considerando que la generación de amonio por el metabolismo de la glutamina, así como por su degradación en el medio es despreciable en los primeros días, el consumo de

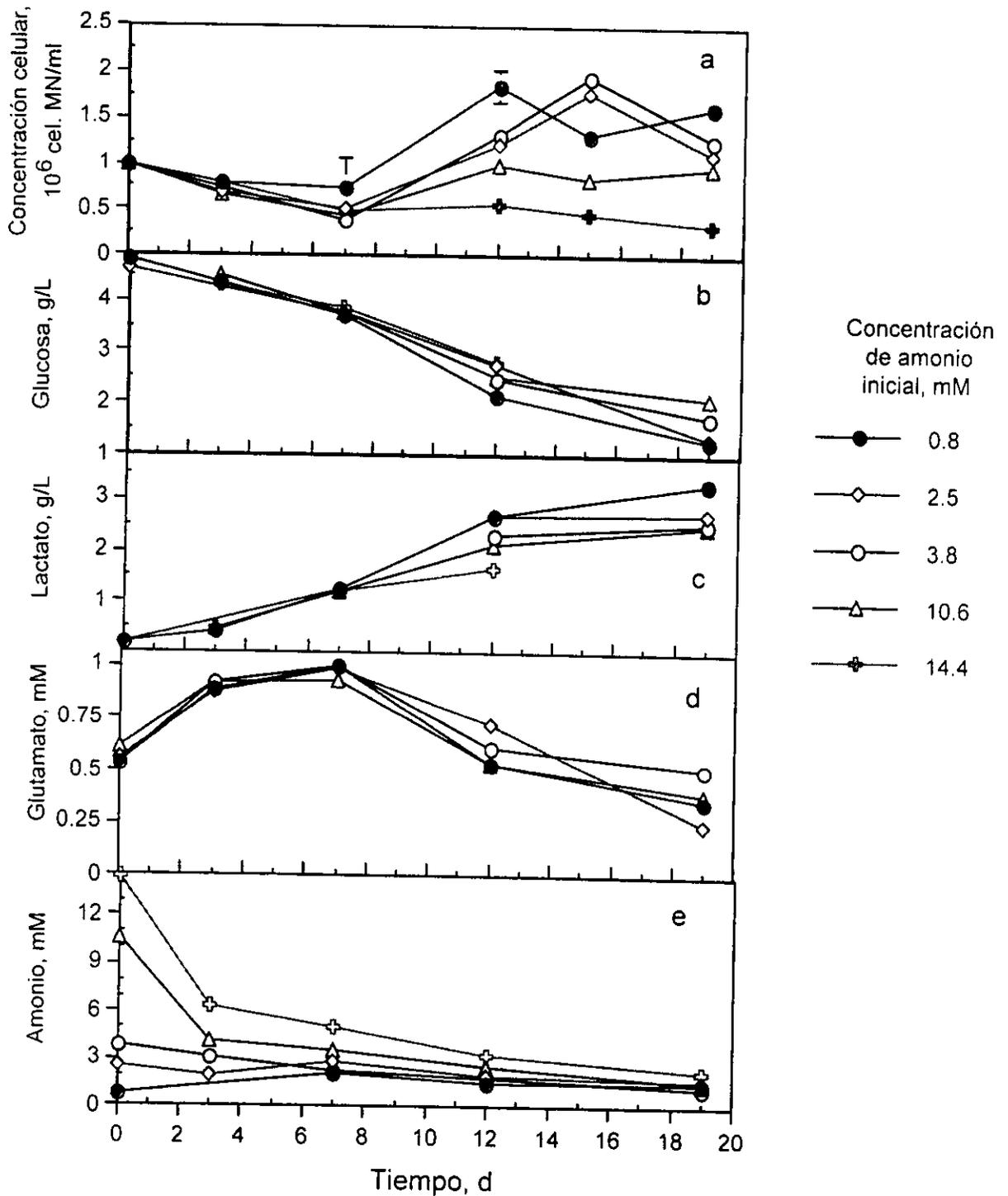


Fig. 37. Cinética de crecimiento, consumo de glucosa, y producción de lactato y glutamato en cultivos lote a diferentes concentraciones iniciales de amonio. Medio IMDM 10%, con adición de citocinas.

amonio en este intervalo es proporcional a la concentración inicial (Tabla 13). A 0.8 mM de amonio inicial se observa producción en los primeros días hasta niveles cercanos a 2.1 mM, a partir del cual se consume. La producción observada a 0.8 y a 2.5 es inversamente proporcional a la concentración inicial (Tabla 13). En otra réplica con diferente muestra, se observa la misma tendencia de consumo y producción de amonio. El consumo de amonio se ha observado también por parte de células estromales y otras células adherentes (De León, 1999; Berdugo, 1999).

Tabla 14. Datos cinéticos y estequiométricos en cultivos lote con adición de citocinas a diferentes concentraciones de amonio inicial.

Amonio inicial, mM	μ , d ⁻¹	$Y_{lac/glc}$ mol/mol	$q_{glc/x}$ ng d ⁻¹ cel ⁻¹	$q_{am/x}$ pmol d ⁻¹ cel ⁻¹
0.8	0.186	1.82	0.258	0.097
2.5	0.158	1.57	0.218	0.199
3.8	0.212	-	-	0.119
10.6	0.169	1.62	0.371	0.327
14.4	0.03	1.51	0.402	0.681

Se observa que la μ disminuye a mayores concentraciones de amonio inicial (Tabla 14), y de acuerdo a Ramírez (1996), en un gráfico de μ/μ_0 contra el cuadrado de la concentración de amonio, la pendiente define a la constante de inhibición, k_i . La raíz cuadrada del inverso de k_i , nos indica la concentración a la cual la μ disminuye al 50%. La k_i para el cultivo mostrado fue de 250 mM², de donde la concentración inhibitoria es de 15.81 mM de amonio. Esta concentración para una réplica con una muestra diferente, fue de 16.22 mM de amonio. Por otra parte, la q_{glc} aumenta conforme aumenta la concentración inicial de amonio en el medio, sin embargo el $Y_{lac/glc}$ disminuye ligeramente. Se tienen reportes de que tanto la glucosa como el amonio son precursores de aminoazúcares, y de que éstos son considerados como inhibidores universales (Ryll *et al.*, 1994); es probable por lo tanto, que el aumento en la velocidad específica de consumo de glucosa esté directamente relacionado con la formación de aminoazúcares, inhibiendo a su vez el crecimiento celular. Lo anterior correlaciona con un aumento en el consumo específico de amonio, q_{am} , el cual fue calculado en la fase exponencial de crecimiento de la misma forma que q_{glc} . En el cálculo de q_{am} , no se consideró la aportación

de amonio al medio a través de la degradación espontánea de la glutamina, por lo tanto, es posible que la q_{am} sea mayor que la presentada en la Tabla 14.

La expansión celular se muestra en la Fig. 38 en los días 12 y 15 del cultivo. La expansión a las concentraciones iniciales de 0.8, 2.5 y 3.7 mM de amonio fueron muy cercanas aunque las dos últimas diferidas por 2 días. Se observa claramente que a por arriba de 3.8 mM, existe un efecto tóxico para la concentración celular. Por otra parte la concentración de amonio en el medio al día 12, se encontraba muy cercana en las primeras tres condiciones y eran de 1.6, 1.9 y 1.8 mM respectivamente. Estos niveles incluso se observan cercanos desde el día 7 (2.2, 2.8 y 2.3 mM, respectivamente). Lo anterior nos sugiere que debido al consumo de amonio las condiciones eran similares, y es debido a ello que no se observa un efecto negativo sobre la expansión celular. Sin embargo, sobre las cinéticas donde el amonio para el día 12 se encontraba en 2.53 y 3.3 mM (muestras 10.6 y 14.3 mM respectivamente), el efecto sobre la expansión celular fue de 46.5 y 70% menor al control.

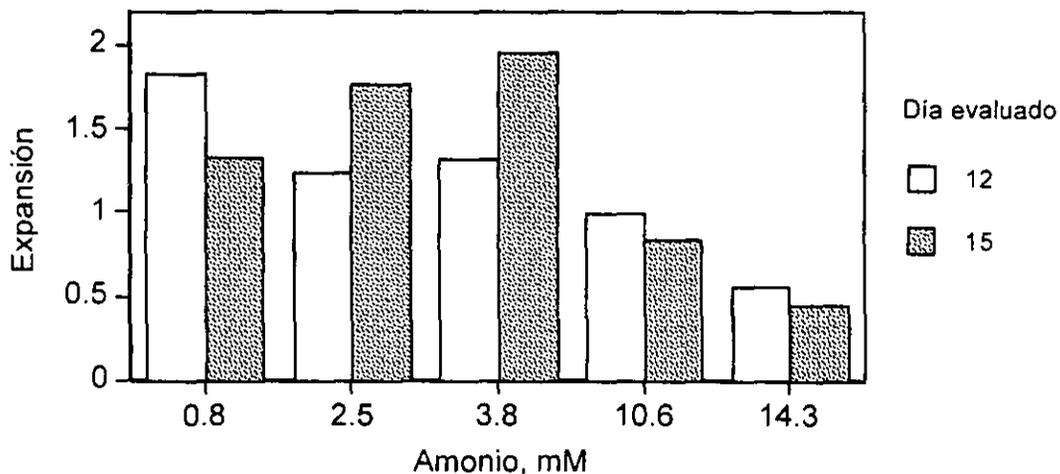


Fig. 38. Efecto de la concentración inicial de amonio sobre la expansión celular en cultivos lote con adición de citocinas. Células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical. Medio IMDM 10% SFB.

En Fig. 39 se muestra el efecto sobre la expansión de progenitores en dos diferentes días. Se analizan los resultados de una réplica de la Fig. 37 debido a que la información es más completa; la expansión de progenitores de la cinética anteriormente analizada sigue una tendencia similar. Las condiciones iniciales fueron 1.2, 5.2 y 13.8 mM de amonio. Al día 9, se observa que la expansión de progenitores eritroides y mieloides tardíos es inversamente proporcional a la concentración inicial de amonio. En cambio en cuanto a progenitores

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1 Conclusiones y perspectivas particulares

1.- En este trabajo se documentaron por primera vez, características de SCU en México. Tales características fueron: volumen recolectado, número de células totales y células mononucleares recuperadas, así como la concentración y proporción de los progenitores hematopoyéticos presentes. A su vez, se estableció la metodología para su recolección y procesamiento, así como para la identificación de progenitores hematopoyéticos.

2.- En los CLP con medio sin citocinas y sin estroma preformado se observó sustentación de la hematopoyesis, la cual está reflejada por la presencia de precursores hematopoyéticos en la novena semana. Por otra parte se observó formación de estroma, lo cual ha sido escasamente reportado bajo condiciones diferentes. Aparentemente no se encontraron precursores fibroblastoides, y esta capa adherente estuvo compuesta principalmente por monocitos y macrófagos. No se observaron adipocitos.

Por otra parte, el protocolo de recambio de medio en los CLP, mostró que existe agotamiento de glucosa en las primeras dos semanas, se sugiere iniciar el cultivo con una concentración de glucosa mayor, una adición selectiva de glucosa o bien, un recambio más frecuente en las primeras semanas.

3.- Los periodos de adaptación, crecimiento exponencial y muerte fueron observados en cultivos lote, lo anterior ha sido reportado escasamente. Se observó que al inicio de la fase exponencial, se encuentra las mayores concentraciones de progenitores.

4.- En cultivos con medio sin citocinas, el SFB promovió diferenciación celular principalmente hacia la línea monocítica. Se observó que a bajas concentraciones (5%) o en ausencia de éste, las células nucleadas se mantuvieron presentes. De la misma forma, a niveles bajos de SFB, los progenitores hematopoyéticos se encontraron a mayores concentraciones, encontrándose probablemente en estado quiascente. En base a los resultados obtenidos con respecto al incremento celular y a la k_d , se sugiere su uso entre 8 y 10%.

5.- Se observó aparentemente inhibición a concentraciones de 6 g/L de glucosa inicial en cultivos lote sin citocinas, sugiriendo que a concentraciones de 2 a 4 g/L son benéficas. Sin embargo, lo anterior debe ser corroborado en cultivos con medio rico en citocinas.

7. REFERENCIAS

- Alberts, B., Bray, D., Lewis J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1994). *Molecular Biology of The Cell.*, 3rd. ed. Ed. Garland Publising Inc., NY & London.
- Baum Ch. M., Weissman I. L., Tsukamoto A. S. (1992). Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 2804-2808.
- BMTP, Bone Marrow Transplant Program, University of Minnesota Health System. (1996). Umbilical cord blood transplant. University of Minnesota. www.peds.umn.edu/Centers/BMT/ucb.html.
- Berdugo, C. I. (1999). Desarrollo de estromas funcionales para la propagación de células hematopoyéticas. *Instituto de Biotecnología, UNAM, Tesis de Maestría*, Cuernavaca, Mor.
- Broxmeyer, H. E., Douglas, G. W., Hangoc, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Arny, M. Thomas, L., Boyse, E. A. (1989). Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**:3828-3832.
- Broxmeyer, H. E., Hangoc, G., Cooper, S., Ribeiro, R. C., Graves, V., Yoder, M., Wagner, J., Vadhan-Raj, S., Benninger, L., Rubinstein, P., Broun, R. (1992). Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:4109-4113.
- CBR, Cord Blood Registry. (1997). What's in cord blood that makes it special? www.cordbloodinfo.com/save.shtml.
- Clark S. C., Kamen R. (1987). The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science*, **236**: 1229-1237.
- Cohen, M. C.; Cohen, S. (1996). The cytokine function: a study in biologic diversity. *Am. J. Clin. Pathol.*, **105**(5): 589-598.
- Collins, P. C., Papoutsakis, E. T., Miller, W. M. (1996). Ex vivo culture systems for hematopoietic cells. *Curr. Op. Biotech.*, **7**: 223-230.
- Collins, P. C., Nielsen, L. K., Wong, C. K., Papoutsakis, E. T., Miller, W. M. (1997). Real-time method for determining the colony-forming cell content of human hematopoietic cell cultures. *Biotech. Bioeng.*, **55**(4): 694-700
- Countinho, L. H., Gilleece, M. H., Wynter, E. A., Will, A., Testa, N. G. (1993). "Clonal and long-term cultures using human bone marrow" en *Haemopoiesis*. Ed. Testa, N. G., Molineux G. IRL-Press. 1st ed. New York.

- Cowling, G. J., Dexter, T. M. (1992). Erythropoietin and myeloid colony stimulating factors. *TIBTech*, **10**: 349-356.
- Crawford, J., Cohen, H. J. (1985). The essential role of L-glutamine in lymphocyte differentiation in vitro. *J. Cell. Phys.*, **124**:275-282.
- CRIR, Caitlin Raymond International Registry. (1998). International Donor Registries. www.trac.net/users/cric/banks.htm.
- De León, A., Ramírez, O. T., Mayani, H. (1998). Design, characterization, and application of a minibioreactor for the culture of human hematopoietic cells under controlled conditions. *Cytotech.*, **28**(1-3): 127-138.
- De León, A. (1999). Cultivo de células hematopoyéticas humanas suspendidas en reactores instrumentados: utilidad de la velocidad de consumo de oxígeno y el potencial redox. *Instituto de Biotecnología, UNAM, Tesis de Doctorado*, Cuernavaca, Mor.
- Derynck, R. (1994). "Transforming Growth Factor-beta" en *The cytokine handbook*. 2nd ed. Academic Press Ltd,
- Dexter, T. M.; Allen, T. D.; Lajtha, L. G. (1977). Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J. Cell. Physiol.*, **91**:335-344.
- DiGiusto, D. L., Lee, R., Moon, J., Moss, K., O'Toole T., Voytovich, A., Webster, D., Mule, J. J. (1996). Hematopoietic potential of cryopreserved and ex vivo manipulated umbilical cord blood progenitor cells evaluated in vitro and in vivo. *Blood*, **87**(4):1261-1271.
- Doverskog, M., Ljunggren, J., Ohman, L., Haggstrom, L. (1997). Physiology of cultured animal cells. *J. Biotech.*, **59**(1-2):103-115.
- Dubois, C. M., Ruscetti, F. W., Stankova, J.; Keller, J. R. (1994). Transforming growth factor-beta regulates c-kit message stability and cell-surface protein expression in hematopoietic progenitors. *Blood*, **83**(11):3138-3145.
- Eaves A. C., Eaves C. J (1984). "Erythropoiesis in culture" en *Clinics in Haematology*. **13**(2), McCulloch, E. A. Ed., W. B. Saunders Co., Great Britain.
- Eaves C. J, Cashman D. J., Eaves A. C. (1991). Methodology of long-term culture of human hematopoietic cells. *J. Tiss. Cult. Meth.*, **13**: 55-62.
- Emerson, S. G. (1996). Ex vivo expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: the next generation of cellular therapeutics. *Blood*, **87**:3082-3088.

- Erslev, A. J., Lichtman, M. A. (1995). "Structure and function of the marrow" en *Hematology*. Eds. Williams, W. J., Beutler, E., Erslev, A. J., Lichtman, M. A., Ed. McGraw-Hill, 5ª. ed., New York.
- Garnet, S; Kaplan, H. (1980). Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**(8):4756-4759.
- Gluckman, E., Broxmeyer, H. E., Auerbach, A. D., Friedman, H.S. Douglas, G.W., Devergie., A., Esperou, H., Therry, D., Socie, G., Lehn, P., Cooper, S., English, D., Kurtzberg, J., Bard, J., Boyse, E.A. (1989). Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N. Eng. J. Med.*, **321**(17): 1174-1177.
- Golde, D. W. (1991). The Stem Cell. *Sci. Am.*, Dec: 86-93.
- Gothot, A. Pyatt, R., McMahel, J., Rices, Srour, E. F. (1997). Functional heterogeneity of human CD34+ cells isolated in subcompartments of the G(0)/G(1) phase of the cell cycle. *Blood*, **90** (11): 4384-4393.
- ICBF, International Cord Blood Foundation (1995). Cord blood offers patients new blood cell source. *J. Nat. Cancer Inst.*, **87**(3), www.infinity.web.com/cordblood.
- Hassell, T., Gleave, S., Butler, M. (1991). Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia. *App. Biochem. Biotech.*, **30**:29-41.
- Higareda, A. E. (1994). Estrategias para optimizar la producción de anticuerpos monoclonales por cultivo de hibridomas en suspensión. *Instituto de Biotecnología, UNAM, Tesis de Maestría, Cuernavaca, Mor.*
- Hirano, T. (1994). "Interleukin-6" en *The cytokine handbook*. 2nd ed. Academic Press Ltd., USA.
- Hoffbrand A. V., Pettit, J. E. (1987). *Hematología Básica*. Ed. Limusa, México, D.F.
- Jacobsen, F. W., Veiby, O. P., Stokke, T., Jacobsen, S. E. W. (1996). TNF-alpha bidirectionally modulates the viability of primitive murine hematopoietic progenitors cells in vitro. *J. Immunology*, **157**(3): 1193-1199.
- Jenney, M. E. M. (1995). Umbilical cord-blood transplantation: is there a future? *The Lancet*, **346**: 921-922.
- Johnson, G. R. (1984). "Haemopoietic multipotential stem cells in culture", en *Clinics in Haematology*. **13**(2), McCulloch, E. A. Ed., W. B. Saunders Co., Great Britain.
- Kimura, T., Iijima, S., Kobayashi, T. (1987). Effects of lactate and ammonium on the oxygen uptake rate of human cells. *J. Ferment. Technol.*, **65**(3):341-344.

- Kobylka, P.; Ivanyi, P.; BreurVriesendorp, B. (1998). Preservation of immunological and colony-forming capacities of long term (15 years) cryopreserved cord blood cells. *Transplant.*, **65**(9): 1275-1278.
- Kogler, G., Callejas, J., (1996). Hematopoietic transplant potential of unrelated cord blood: critical issues. *J. Hematother.*, **5**(2): 105-116.
- Koller, M. R., Bender, J.G., Miller, W. M., Papoutsakis, E. T. (1992). Reduced oxygen tension increases hematopoiesis in long-term culture of human stem and progenitor cells from cord blood and bone marrow. *Exp. Hematol.*, **20**: 264-270.
- Koller, M. R., Bender, J. G., Miller, W. M., Papoutsakis, E. T. (1993a). Expansion of primitive human hematopoietic progenitors in a perfusion bioreactor system with IL-3, IL-6, and stem cell factor. *Bio/technology*, **11**:358-362.
- Koller, M. R., Emerson, S. G., Palsson, B. O. (1993b). Large-scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion cultures. *Blood*, **82**(2): 378-384.
- Koller, M. R., Palsson B. O. (1993). Tissue engineering: Reconstitution of human hematopoiesis *ex vivo*. *Biotech. Bioeng.*, **42**: 909-930.
- Koller, R.M., Palsson, M. A., Manchel, I., Palsson, O. B. (1995). Long- term culture-initiating cell expansion is dependent on frequent medium exchange combined with stromal and other accessory cell effects. *Blood*, **86**(5):1784-1793.
- Koller, M. R., Manchel, I., Palsson, M. A., Maher, R. J., Palsson, B. O. (1996). Different measures of human hematopoietic cell culture performance are optimized under vastly different conditions. *Biotech. Bioeng.*, **50**(5): 505-513.
- Lansdorp P. M., Dragowska W., Mayani H. (1993). Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J. Exp. Med.*, **178**: 787-791.
- Levee M. G., Lee G-M., Paek S-H., Palsson B. O. (1994). Microencapsulated human bone marrow cultures: a potential culture system for the clonal outgrowth of hematopoietic progenitor cells. *Biotech. Bioeng.*, **43**: 734-739.
- Limón, F. J. A. (1995). Lo más elemental en hematología. Una introducción a la materia en preguntas y respuestas, *Facultad de Medicina*, 1ª. ed. Dirección Gral. de Fomento Editorial, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Linz, M., Zeng, A. P., Wagner, R., Deckwer, W. D. (1997). Stoichiometry, kinetics, and regulation of glucose and amino acid metabolism of a recombinant BHK cell line in batch and continuous cultures. *Biotech. Prog.*, **13**(4): 453-463.
- Lord B. I., Dexter T. M. (1995). Which are the hematopoietic stem cells? *Exp. Hematol.*, **23**: 1237-1241.

- Massagué, J., Pandiella, A. (1993). Membrane -anchored growth factors. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**: 515-541.
- Mayani, H., Guilbert, L., Janowska, W. A. (1992). Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur. J. Haematol.*, **49**: 225-233.
- Mayani H., Dragowska W., Lansdorp P. M. (1993). Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34+ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood*, **82**: 2664.
- Mayani H., Lansdorp P. M. (1994). Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. *Blood*, **83**(9): 2410-2417.
- Mayani, H. (1996). Composition and function of the hemopoietic microenvironment in human myeloid leukemia. *Leukemia*, (10):1041-1047
- Mayani, H., Gutiérrez-Rodríguez, M., Espinoza, L., López-Chalini, E., Huerta-Zepeda, A., Flores, E., Sánchez-Valle, E., Luna-Bautista, F., Valencia, I., Ramírez, O. T. (1998). Kinetics of hematopoiesis in Dexter-type Long-Term Cultures established from human umbilical cord blood cells. *Stem Cells*, **16**:127-135.
- McAdams, T. A., Miller, W. M., Papoutsakis, E. T. (1996a). Hematopoietic cell culture therapies (part I): cell culture considerations. *TIBTECH*, **14**: 341-349.
- McAdams, T. A., Winter, J. N., Miller, W. M., Papoutsakis, E.T. (1996b). Hematopoietic cell culture therapies (part II): clinical aspects and applications. *TIBTECH*, **14**: 388-396.
- McKenna, H. J., Vries, P., Brasel, K., Lyman, S. D., Williams, D. E. (1995). Effect of flt3 ligand on the ex vivo expansion of human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*, **86**(9):3413-3420.
- Newland, M., Kamal, M. N., Greenfield, P. F., Nielsen, L. K. (1994). Ammonia inhibition of hibridomas propagated in batch, fed-batch, and continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.*, **43**:434-438.
- Nicol, A., Nieda, M., Donaldson, C., Kendall, D.P., Bradley, B., Hows J. (1995). Analysis of cord blood CD34+ cells purified after cryopreservation. *Exp. Hematol.* **23**: 1589-1594.
- Oh, K. W., See L. H. (1995). A fast assay for developing serum free media for cord blood haematopoietic cells. *Biotech. Tech.*, **9**(8): 577.

- Ozturk, S. S., Riley, M. R., Palsson, B. O. (1992). Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotech. Bioeng.*, **39**:418-431.
- Palomares, L. A. (1995). Caracterización cinética y metabólica de cultivos de *Spodoptera frugiperda* (Sf-9): Hacia el desarrollo de estrategias de control. *Instituto de Biotecnología, UNAM, Tesis de Maestría*, Cuernavaca, Mor.
- Palsson, B. O., Paek, S., Schwartz, R. M., Palsson, M., Lee, G., Silver, S., Emerson, S. G. (1993). Expansion of human bone marrow progenitor cells in a high cell density continuous perfusion system. *Bio/technology*, **11**: 368-372.
- Peters, M., zumBuschenfelde, K. H. M., RoseHohn, S. (1996). The function of the soluble IL-6 receptor in vivo. *Immunol. Letters*, **54**(2-3): 177-184.
- Quesenberry, P. J. (1991). "The concept of the hemopoietic stem cell" en *Hematology*. Ed. Williams, W. J., Beutler, E., Erslev, A. J., Lichtman, M. A., Ed. McGraw-Hill, 4a. ed.
- Ramírez, O. T. (1996). Alternativas para contender con el problema de la toxicidad del amonio en cultivos de células de eucariotes superiores. *Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería*, E. Galindo ed., Sociedad Mexicana de Biotecnología, México D.F.
- Ryll, T., Valley, U., Wagner, R. (1994). Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells. *Biotech. Bioeng.*, **44**(2): 184-193.
- Rubinstein, P. (1997). Transplante de médula ósea a partir de progenitores de sangre de cordón umbilical. *Conferencia, Hospital Gabriel Mancera-IMSS*. Jun, 12.
- Sandstrom, C. F., Miller, W. M., Papoutsakis E. T. (1994). Serum-free media for cultures of primitive and mature hematopoietic cells. *Biotech. Bioeng.*, **43**:706-733.
- Sandstrom, C. E., Bender, J. G., Papoutsakis, E. T., Miller, W. M. (1995). Effects of CD34+ cell selection and perfusion on ex vivo expansion of peripheral blood mononuclear cells. *Blood*, **86**(3):958-970.
- Sachs, L.; Lotem, J. (1994). The network of hematopoietic cytokines. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **206**(3):170-175.
- Sardonini C. A., Wu Y. (1993). Expansion and differentiation of human hematopoietic cells from static cultures through small-scale bioreactors. *Biotech. Prog.*, **9**: 131-137.
- Schneider, M., Marison, I.W., Stockar, U. V. (1995). The importance of ammonia in mammalian cell culture. *J. Biotechnol.*, **46**: 161-185.

- Schrader, J. W. (1994). "Interleukin-3" en *The cytokine handbook*. 2nd ed. Academic Press Ltd., USA.
- Schwartz, R.M., Emerson, S.G., Clarke, M.F., Palsson, B.O. (1991). In vitro myelopoiesis stimulated by rapid medium exchange and supplementation with hematopoietic growth factors. *Blood*, **78**(12): 3155-3161.
- Smolen, J. E., Boxen, L. A. (1991). "Functions of neutrophils" en *Hematology*. Williams, W. J., Beutler, E., Erslev, A. J., Lichtman, M. A., (eds.) McGraw-Hill, 4^a. ed., New York.
- Stanley, E. R. (1994). Colony stimulating factor-1 (macrophage colony stimulating factor). en *The cytokine handbook*. 2nd ed. Academic Press Ltd., USA.
- Sutherland, H. J., Eaves, C. J., Eaves, A. C., Dragowska, W., Lansdorp, P. M. (1989). Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood*, **74** (5): 1563-1570.
- Sutherland, H. J., Lansdorp, P. M., Henkelman, D. H., Eaves, A. C. (1990). Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 3584-3588.
- Thompson, C. (1995) Umbilical cords: turning garbage into clinical gold. *Science*, **268**(12): 805-806.
- Tortora, G. J. Anagnostakos, N. P. (1989). *Principios de Anatomía y Fisiología*. 5a. ed. Ed. Harla, México, D.F.
- Verfaillie, C. M. (1993). Soluble factor(s) produced by human bone marrow stroma increase cytokine-induced proliferation and maturation of primitive hematopoietic progenitors while preventing their terminal differentiation. *Blood*, **82**(7):2045-2053.
- Verfaillie, C.M., Catanzaro, P. (1996). Direct contact with stroma inhibits proliferation of human long-term culture initiating cells. *Leukemia*, **10**: 498-504.
- Villaseñor, F. (1998). Evaluación de los sistemas enzimáticos glutamino sintetasa y glutamato deshidrogenasa para la eliminación de amonio del medio de cultivo de células de eucariotes superiores. *Instituto de Biotecnología, UNAM, Tesis de Maestría*, Cuernavaca, Mor.
- Wagner, J. E., (1994). Umbilical cord blood transplantation: overview of the clinical experience. *Blood Cells*, **20**:227-234.

- Yang, S.T., Shu, C.H. (1996). Kinetics and stability of GM-CSF production by recombinant yeast cells immobilized in a fibrous-bed bioreactor. *Biotechnol. Prog.*, **12**: 449-456.
- Ye, A. Q., Burkholder, J. K., Qiu, P., Schults, J. C., Shaidi, N. T., Yang, N. S. (1994). Establishment of an adherent cell feeder layer from human umbilical cord blood for support of long-term hematopoietic progenitor cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 12140-12144.
- Zandstra, P. W., Eaves, C. J., Piret, J. M.. (1994). Expansion of hematopoietic progenitor cell populations in stirred suspension bioreactors of normal human bone marrow cells. *Bio/technology*, **12**:909-914.
- Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Livingston, A. G., Flake, A. W., Ogawa, M. (1998). Human bone marrow CD34⁺ cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34⁺ cells. *Exp. Hematol.*, **26**:353-360.

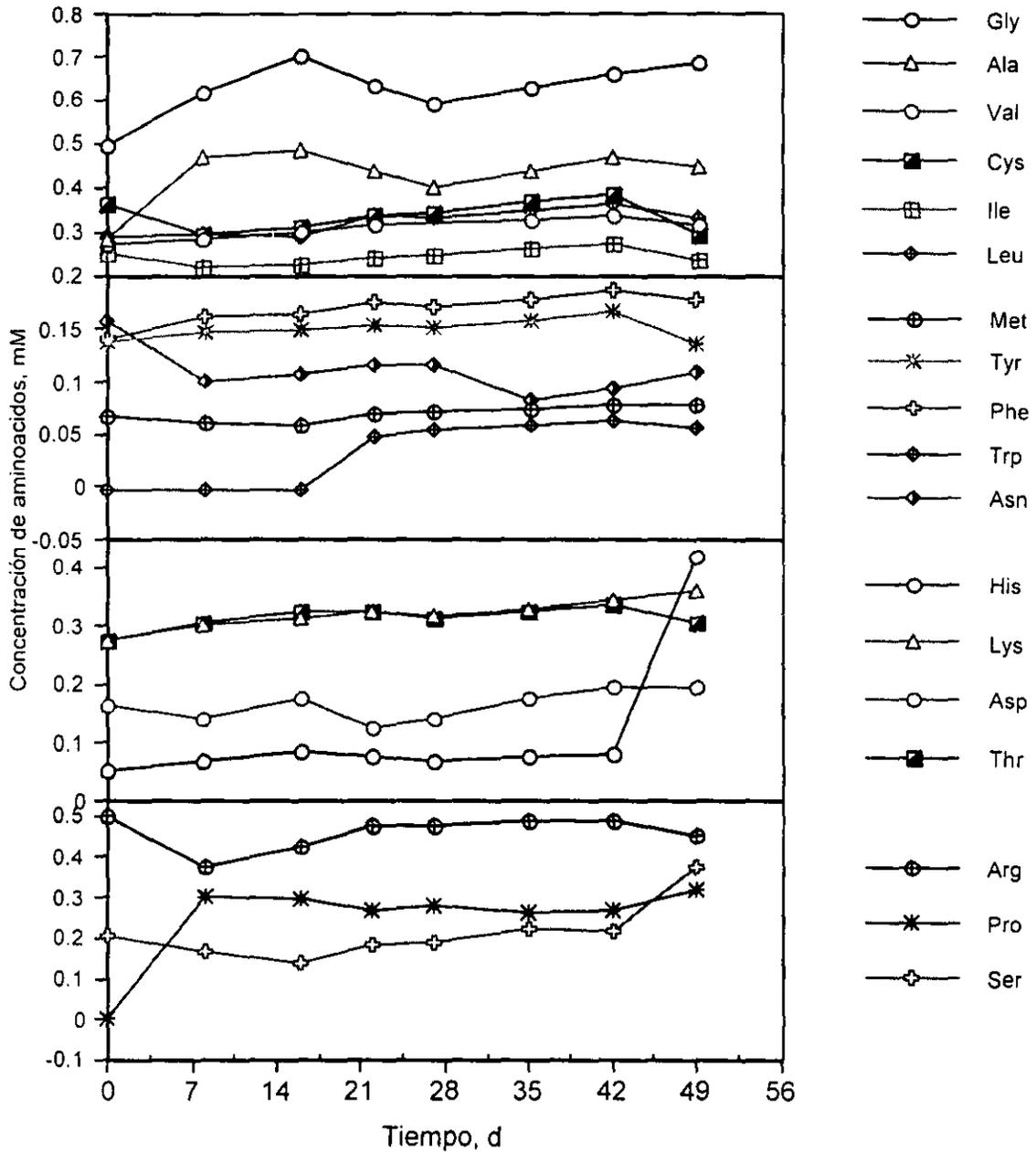
Apéndice A

Formulación de los medios IMDM (Sigma-I 7633) y DMEM (Sigma D-5030)

COMPONENTE	g/L (IMDM)	g/L (DMEM)
Cloruro de Calcio •2H ₂ O	0.219	0.265
Sulfato de Magnesio (anhidro)	0.09767	0.09767
Cloruro de Potasio	0.33	0.4
Nitrato de Potasio	0.000076	-
Cloruro de Sodio	6.4	6.4
Fostato de Sodio Monobásico	0.109 (anhidro)	0.109
Selenito de Sodio	0.0000173	-
L-Alanina	0.025	-
L- Arginina•HCl	0.084	0.084
L-Asparagina•H ₂ O	0.0284	-
L-Acido Aspártico	0.03	-
L- Cystina•2HCl	0.09124	0.0626
L-Acido Glutámico	0.075	-
L-Glutamina	0.584	-
Glicina	0.03	0.03
L-Histidina•HCl•H ₂ O	0.042	0.042
L- Isoleucina	0.105	0.105
L-Leucina	0.105	0.105
L-Lisina•HCl	0.146	0.146
L-Metionina	0.03	0.03
L-Fenilalanina	0.066	0.066
L-Prolina	0.04	-
L-Serina	0.042	0.042
L-Treonina	0.095	0.095
L-Triptofano	0.016	0.016
L-Tirosina •2Na •2H ₂ O	0.10379	0.10379
L-Valina	0.094	0.094
D-Biotina	0.000013	-
Cloruro de Colina	0.004	0.004
Acido Fólico	0.004	0.004
Myo-Inositol	0.0072	0.0072
Niacinamida	0.004	0.004
D-Acido Pantoténico Hemicálcico	0.004	0.004
Piridoxal • HCl	0.004	0.004
Riboflavina	0.0004	0.0004
Tiamina•HCl	0.004	0.004
Vitamina B-12	0.000013	-
D-Glucosa	4.5	-
HEPES	5.958	-
Rojo de Fenol•Na	0.016	-
Acido Pirúvico•Na	0.11	-
Nitrato Férrico •9H ₂ O	-	0.0001

Apéndice B

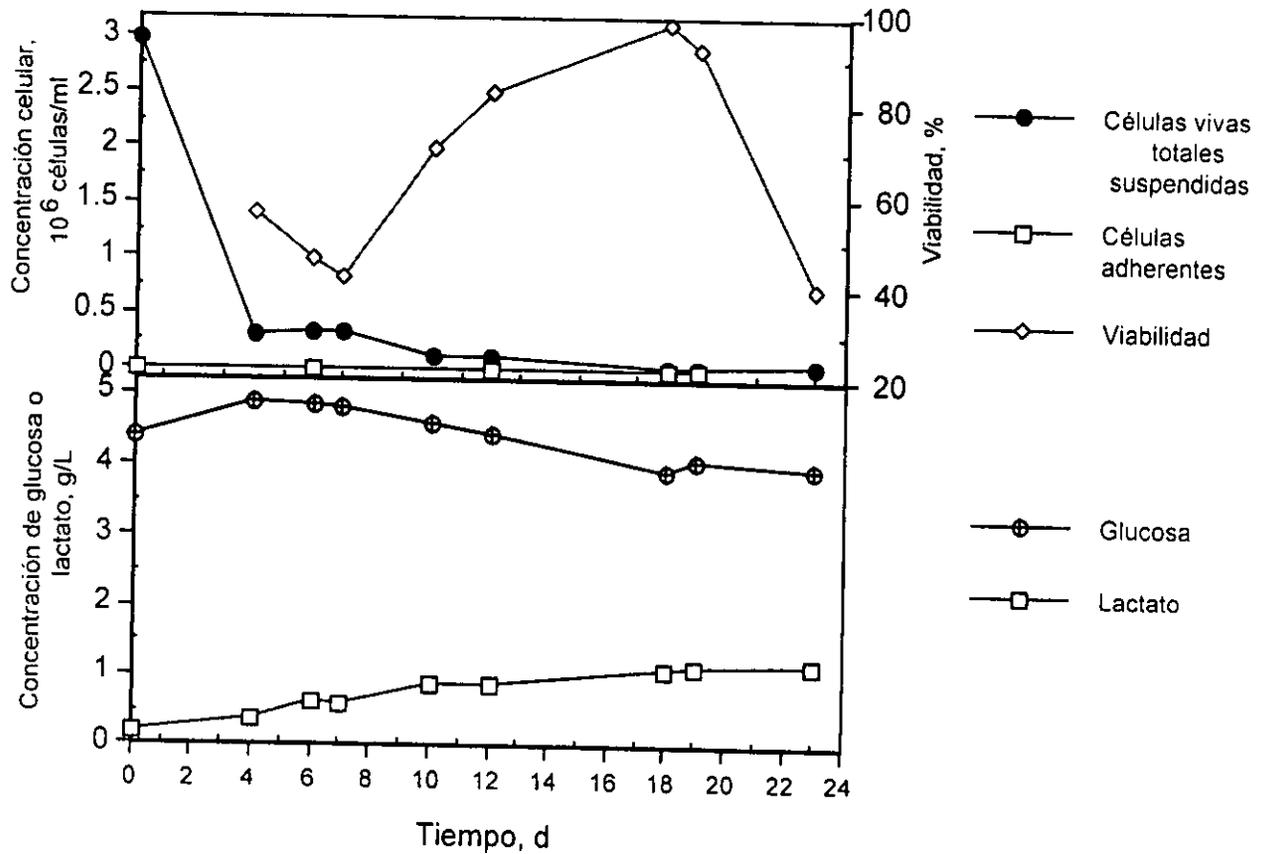
Perfil de la concentración de aminoácidos en cultivos a Largo Plazo



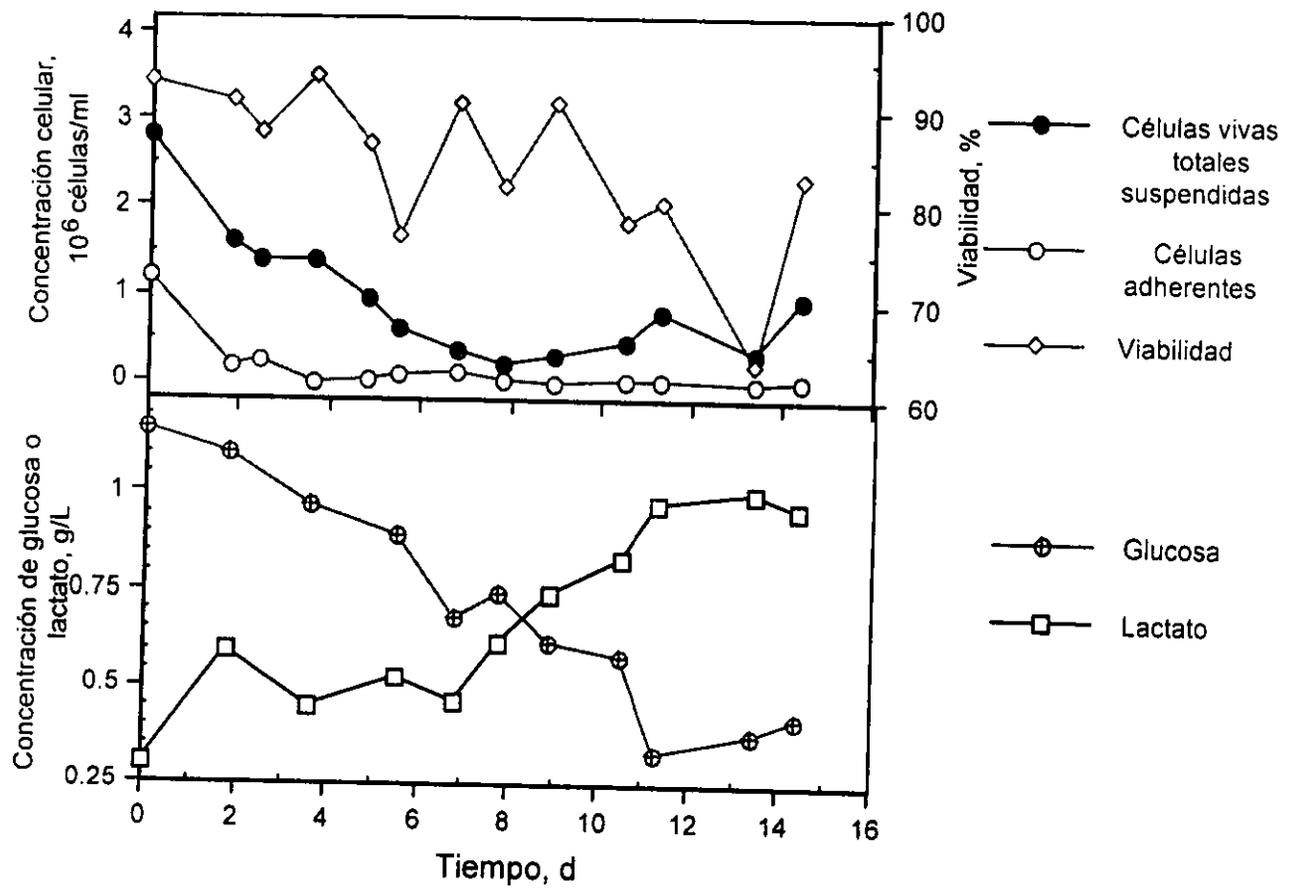
B1. Cultivos a Largo Plazo de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical sin adición de citoquinas.

Apéndice C

Cinéticas de cultivos Lote



C1. Cultivo Lote de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical, sin adición de citocinas. Medio IMDM 10% SFB.



C2. Cultivo Lote de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical, sin adición de citocinas. Medio LTBM.

Kinetics of Hematopoiesis in Dexter-Type Long-Term Cultures Established from Human Umbilical Cord Blood Cells

HECTOR MAYANI,^a MARGARITA GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ,^a LAURA ESPINOZA,^a EDITH LÓPEZ-CHALINI,^b
ALEJANDRA HUERTA-ZEPEDA,^a EUGENIA FLORES,^a ELIZABETH SÁNCHEZ-VALLE,^a
FERNANDO LUNA-BAUTISTA,^a IGNACIO VALENCIA,^a OCTAVIO T. RAMÍREZ^b

^aOncological Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center, IMSS, Mexico City, Mexico;

^bBioengineering Department, Institute of Biotechnology, UNAM, Cuernavaca, Mexico

Key Words. Bone marrow · Cord blood · Dexter culture · Hematopoiesis · Progenitors · Stroma

ABSTRACT

In the present study, we have established Dexter-type long-term cultures (D-LTC) from human umbilical cord blood (UCB) and followed the kinetics of different hematopoietic progenitor cells (HPCs)—including multipotent (colony forming unit [CFU]-Mixture), erythroid (CFU-erythroid, BFU-E), and myeloid (CFU-granulocyte, CFU-macrophage, CFU-granulocyte/macrophage) progenitors as well as of morphologically recognizable erythroid, myeloid and lymphoid cells—during a nine-week culture period. D-LTC were also established from adult bone marrow (BM) as controls. On day 0, both UCB and BM showed similar total numbers of HPCs (about $310/10^5$ cells), however, UCB showed a higher proportion of primitive HPCs (i.e., CFU-Mixture, CFU-granulocyte/macrophage and BFU-E). A poor adherent cell layer, consisting almost exclusively of macrophages, was developed in UCB D-LTC and this correlated with a continuous decline in HPC numbers throughout the culture period. In contrast, adherent cell numbers in BM D-LTC, including fibroblasts and macrophages, were two- to fourfold higher than in UCB cultures, and the numbers of HPCs were also significantly higher,

reaching plateau levels between weeks 6 and 9. In both types of cultures, erythroid and multipotent progenitors declined relatively fast, reaching undetectable levels after five weeks of culture. Myeloid progenitors, on the other hand, were sustained longer (always at higher levels in BM cultures) and were still detected by week 9. Among myeloid progenitors, a shift towards the predominance of macrophage HPCs was observed, both in UCB and BM D-LTC, and this correlated with an increase in the proportion of mature monocytes and macrophages. Taken together, our results indicate that myeloid progenitor cell growth is deficient in UCB D-LTC and suggest that this is due to the impaired development of an adherent cell layer, unable to provide the factors and conditions required for their growth. Interestingly, throughout the culture period the total numbers of multipotent and erythroid progenitors were similar both in UCB and BM cultures regardless of the number and types of adherent cells present; this suggests that the stroma developed in D-LTC is not sufficient for the proliferation of these progenitor cells. *Stem Cells* 1998;16:127-135

INTRODUCTION

Umbilical cord blood (UCB) has been recognized as a major source of hematopoietic progenitor cells (HPCs) [1, 2]. Indeed, it has been shown that UCB contains a proportion of HPC that is at least comparable with that of bone marrow (BM) [3, 4] and this has led to the clinical use of UCB as an alternative to BM for hematopoietic cell transplantation [5]. By culturing UCB CD34⁺ cell subpopulations, both in semisolid and

liquid cultures, it has been possible to characterize their proliferation and differentiation patterns. Furthermore, liquid cultures supplemented with different hematopoietic cytokine combinations have been used for the ex vivo expansion of both primitive and mature UCB HPCs [6-10], a procedure of potential clinical relevance [11, 12]. Interestingly, major functional differences between UCB and BM HPCs have been described, both in vitro and in vivo, indicating that UCB-derived HPCs

Correspondence: Dr. Hector Mayani, Oncological Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center, Av. Cuauhtemoc 330, Mexico. D.F. 06720. Accepted for publication December 4, 1997. ©AlphaMed Press 1066-5099/98/\$5.00/0

possess a higher proliferation potential than their marrow counterparts [3, 13-16].

Much of our current knowledge on the *in vitro* proliferation and differentiation of HPCs—particularly those from BM—has derived from studies using Dexter-type long-term cultures (D-LTC) [17]. In this experimental system hematopoietic cell growth occurs in close association with an adherent cell layer formed by marrow stromal elements, which are derived from the same marrow sample. Under these culture conditions, hematopoiesis can be sustained for several weeks, or even months, without the addition of exogenous cytokines, since marrow stromal cells produce both extracellular matrix proteins and a variety of cytokines necessary for the development of hematopoietic cells [18-20].

To date, however, limited information exists on the behavior of UCB cells in standard D-LTC, that is, in the absence of a preformed allogeneic marrow stroma and without the addition of recombinant cytokines. The studies reported to date have only partially analyzed UCB hematopoiesis in this experimental system since they have focused exclusively on total myeloid progenitors present in the nonadherent fraction of the culture [3, 4]. Thus, the major goal of the present study was to thoroughly characterize UCB hematopoiesis in D-LTC by following the growth kinetics of nonadherent and adherent progenitor cells (including multipotent and the different types of myeloid and erythroid progenitors), as well as morphologically recognizable cells, throughout a nine-week culture period. For comparison, D-LTC from normal adult BM were simultaneously analyzed.

MATERIALS AND METHODS

Cell Collection

UCB cells, collected according to institutional guidelines, were obtained from 10 normal full-term deliveries from the "1° de Octubre" and "20 de Noviembre" Hospitals (Mexico City, Mexico). Eight normal BM samples were obtained, one of them from the sternum of a patient undergoing cardiac surgery at the Cardiology Hospital, National Medical Center (Mexico City, Mexico) and the other seven from the iliac crest of BM transplant donors, at the "Bernardo Sepulveda" Hospital, National Medical Center. These procedures have been approved by the ethical committee of the National Medical Center.

Cell Processing

Buffy coat cells, both from UCB and BM, were obtained by centrifugation (400 *g* for seven min) and resuspended in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) supplemented with 2% fetal bovine serum ([FBS]; StemCell Technologies, Inc.; Vancouver, BC, Canada). Total numbers

of nucleated and viable cells were determined with a hemocytometer, using Turk's solution and trypan blue stain, respectively.

Long-Term Cultures

D-LTC were established based on the method described by *Eaves et al.* [21] and *Mayani et al.* [22]. Buffy coat cells were resuspended in LTC medium (StemCell Technologies, Inc.) at a final concentration of 3×10^6 cells per ml. The LTC medium composition is as follows: alpha medium supplemented with 12.5% horse serum, 12.5% FBS, 0.2 mM inositol, 20 μ M folic acid, 10^{-4} M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine and freshly dissolved hydrocortisone to yield a final concentration of 10^{-6} M. The cell suspension was loaded into 24-well plates (1 ml/well) and incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ in air. After three days, cultures were transferred to a different incubator and maintained at 33°C. Four days later, seven days after initiation of the culture, half of the supernatant and nonadherent cells were removed from the wells and replaced with fresh culture medium. The cultures were processed in this manner at weekly intervals, and at least two wells per UCB or BM culture were evaluated at each time point. The nonadherent cells, obtained weekly during the medium change, were counted, morphologically analyzed and assayed for hematopoietic progenitors. The well-to-well variability observed in progenitor cell frequency, both in UCB and BM cultures, was <12%. At weeks 3, 5, 7 and 9 one of a number of parallel cultures was sacrificed for evaluation of the adherent cells, which were detached with a cell scraper after trypsinization (i.e., 0.25% trypsin containing 0.1 mM EDTA was added and the cultures were incubated at 37°C for 10 min; the action of trypsin was stopped by adding one-half volume of FBS). The cells were then resuspended in IMDM with 2% FBS and processed in the same way as the nonadherent cells.

Hematopoietic Colony Assays

HPCs were assayed in methylcellulose-based semi-solid cultures (StemCell Technologies, Inc.). The culture medium consisted of 0.9% methylcellulose, 30% FBS, 1% bovine serum albumin, 10^{-4} M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 50 ng/ml recombinant human (rHu) stem cell factor, 10 ng/ml rHu interleukin 3, 10 ng/ml rHuGM-CSF and 3 U/ml rHu erythropoietin. Buffy coat cells, both from UCB and BM, were plated at a final concentration of 5×10^4 cells/ml and the cultures were incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ in air. Nonadherent and adherent cells from D-LTC were also cultured in this manner; however, the plating cell concentration varied from 5×10^4 to 1×10^4 , depending on the cell number

Table 1. Number of HPCs in UCB and BM

	Number of progenitors/10 ⁵ nucleated cells		
	Myeloid	Erythroid	Multipotent
UCB (n = 10)	132 ± 69	153 ± 78	18 ± 6
BM (n = 8)	160 ± 58	155 ± 67	5 ± 3

Results represent mean ± SD of the indicated number of experiments; each experiment corresponded to a particular UCB or BM sample. No statistical difference was observed in myeloid or erythroid progenitor cell numbers. In contrast, multipotent progenitor numbers were higher in UCB than in BM ($p < 0.05$). Myeloid progenitors comprised CFU-G + CFU-M + CFU-GM. Erythroid progenitors comprised BFU-E + CFU-E.

recovered from the cultures. After 14-17 days of culture, colonies were scored in the same dish using an inverted microscope. Hematopoietic colonies were classified as previously described [22]: colony forming unit-Mixture (CFU-MIX), colonies containing both erythroid and myeloid cells; CFU-erythroid (CFU-E), erythroid clusters of 20-50 hemoglobinized cells; BFU-E, erythroid colonies of more than 50 hemoglobinized cells grouped in one or several clusters. Myeloid colonies comprised the identifiable subpopulations of pure granulocytic colonies (CFU-granulocyte [CFU-G]), pure macrophagic colonies (CFU-macrophage [CFU-M]), and colonies containing both granulocytes and macrophages (CFU-granulocyte/macrophage [CFU-GM]).

Morphological Studies

Cells obtained from UCB and BM, as well as from the nonadherent fraction of D-LTC, were examined on slide preparations stained with Wright-Giemsa stain. Approximately 500 cells per slide were scored.

Statistics

Statistical analysis was performed by using Student's *t*-test.

RESULTS

HPC Content in UCB and BM

HPC content, both in UCB and BM samples, was determined by colony assays. A mean total of 303 colony forming cells (CFC) per 10⁵ nucleated cells (NC) was observed in UCB samples. Forty-three percent of them (132/10⁵ NC) corresponded to myeloid progenitors; 50% (153/10⁵ NC) were erythroid progenitors, and 6% (18/10⁵ NC) corresponded to multipotent progenitors (Table 1). A mean total of 321 CFC/10⁵ NC was observed in BM samples. Fifty-one percent of them (160/10⁵ NC) corresponded to myeloid progenitors, 48% (155/10⁵ NC) to erythroid progenitors and only 1% (5/10⁵ NC) to multipotent progenitor cells. No statistical difference was found for myeloid or erythroid progenitors when comparing their numbers in UCB and BM; in contrast, the numbers of multipotent progenitors were significantly higher in UCB than in BM (Table 1).

Among myeloid progenitors present in UCB, CFU-G corresponded to 33%, CFU-M corresponded to 40% and CFU-GM corresponded to 29%. In contrast, in BM, CFU-G corresponded to 62%, CFU-M corresponded to 32% and CFU-GM corresponded to 9% (Table 2). Thus, a higher proportion of immature, bipotent progenitors was observed in UCB than in BM. In terms of erythroid progenitors, early progenitor cells (BFU-E) were also present at higher frequencies in UCB than in BM (94% versus 62%; $p < 0.05$; Table 3).

Kinetics of Nucleated Cells

BM nonadherent and adherent cells showed similar kinetics in D-LTC to those reported previously [21-23]. There was a rapid decline in nonadherent cells during the first few weeks of culture; afterwards, the rate of decline was considerably reduced and a plateau was observed between weeks 6-9 (Fig. 1). Adherent cells were observed from week 1, and at weeks 5-9 their numbers were significantly higher (two- to sevenfold) than the numbers of nonadherent cells (Fig. 1). According to morphological criteria, fibroblasts, macrophages

Table 2. Relative proportion of myeloid progenitors in D-LTC throughout a nine-week culture period

Day	UCB D-LTC			BM D-LTC		
	CFU-G	CFU-M	CFU-GM	CFU-G	CFU-M	CFU-GM
0	33 ± 9	40 ± 12	29 ± 8 ^a	62 ± 8 ^b	32 ± 11	9 ± 6
21	26 ± 10	62 ± 11	16 ± 5 ^a	43 ± 17	53 ± 13	3 ± 3
49	15 ± 9	72 ± 8	12 ± 6 ^a	30 ± 15	67 ± 13	1 ± 2
63	bd	100	bd	29 ± 11	72 ± 16	bd

Results indicate mean ± SD of 10 experiments for UCB and eight experiments for BM. On day 63, six UCB cultures and five BM cultures were analyzed. Results represent the percent of total myeloid progenitors. bd = below detection.

^aOn days 0, 21 and 49, the proportion of CFU-GM in UCB D-LTC was significantly higher than in BM D-LTC ($p < 0.05$).

^bOn day 0, the proportion of CFU-G in BM D-LTC was significantly higher than in UCB D-LTC ($p < 0.05$).

Table 3. Relative proportion of erythroid progenitors in D-LTC throughout a nine-week culture period

Day	UCB D-LTC		BM D-LTC	
	CFU-E	BFU-E	CFU-E	BFU-E
0	7 ± 8 ^a	94 ± 11 ^b	35 ± 15	62 ± 16
21	42 ± 10	61 ± 9	35 ± 7	66 ± 12
35	37 ± 7	61 ± 6	22 ± 9	78 ± 9

Results indicate mean ± SD of 10 experiments for UCB and eight experiments for BM. They represent the percent of total erythroid progenitors.

^aOn day 0 the relative proportion of CFU-E was significantly lower in UCB D-LTC than in BM D-LTC ($p < 0.05$).

^bThe proportion of BFU-E in UCB D-LTC was significantly higher than in BM D-LTC ($p < 0.05$).

and adipocytes were identified within the adherent cell layers developed in BM D-LTC (not shown).

In D-LTC initiated with UCB cells, the levels of non-adherent cells throughout most of the culture period were

similar to those observed in BM D-LTC (Fig. 1). However, in contrast to BM cultures, the numbers of adherent cells in UCB D-LTC were significantly reduced. In fact, at week 3, there were more nonadherent than adherent cells, and by week 5 their levels were about the same (Fig. 1). Preliminary analysis indicates that adherent cell layers in UCB D-LTC consisted almost exclusively of macrophages; very few fibroblast-like cells and no adipocytes were observed (Gutiérrez-Rodríguez and Mayani, study in progress). At weeks 3, 5 and 7 adherent cell numbers were significantly higher (two- to fourfold; $p < 0.05$) in BM D-LTC than in their UCB counterparts. Only at week 9 the higher number of adherent cells in BM D-LTC was not statistically significant.

Kinetics of Myeloid Progenitors

In BM D-LTC, nonadherent myeloid progenitors showed a continuous decline during the first six weeks of culture and afterwards their levels remained constant (Fig. 2).

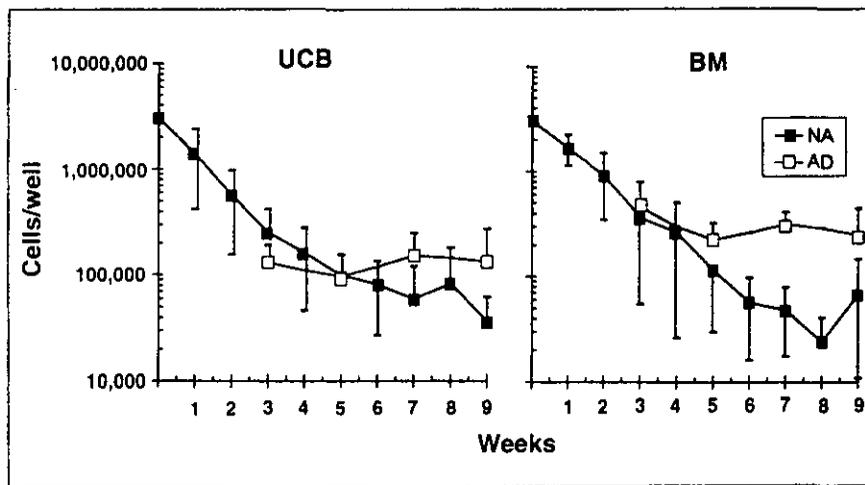


Figure 1. Absolute numbers of nucleated cells in human D-LTC established from UCB (left panel) and adult BM (right panel). Points represent mean ± SD of 10 experiments for UCB and eight experiments for BM (six UCB samples and five BM samples for week 9). NA = nonadherent cells; AD = adherent cells. No statistical difference was observed between NA cells in UCB and BM cultures. At weeks 3, 5 and 7 adherent cells in BM cultures were significantly higher ($p < 0.05$) than in UCB cultures; however, no statistical difference was observed at week 9.

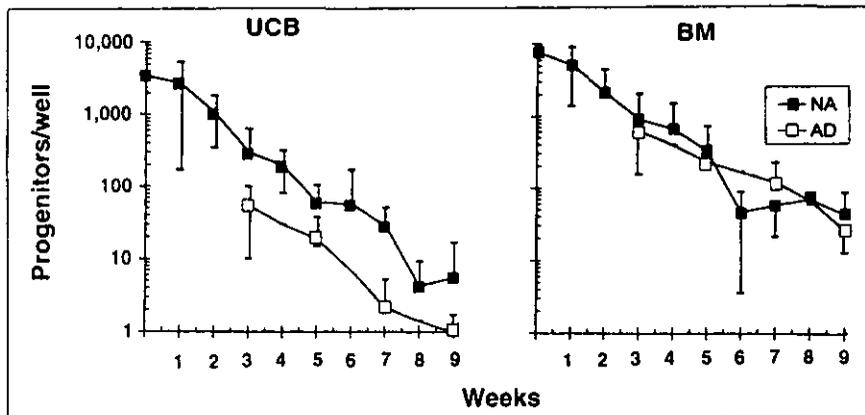


Figure 2. Absolute numbers of myeloid progenitor cells (CFU-G + CFU-M + CFU-GM) in human D-LTC established from UCB (left panel) and adult BM (right panel). Points represent mean ± SD of 10 experiments for UCB and eight experiments for BM (six UCB samples and five BM samples for week 9). NA = nonadherent progenitor cells; AD = adherent progenitor cells. A statistical difference ($p < 0.05$) was observed at weeks 8 and 9 between NA myeloid progenitors in UCB and BM cultures. At all time points

analyzed, the numbers of adherent myeloid progenitors in BM cultures were significantly higher than in UCB cultures ($p < 0.05$).

At weeks 3, 5, 7 and 9 adherent myeloid progenitors were evaluated and their levels were similar to those in the nonadherent fraction.

In UCB D-LTC, nonadherent myeloid progenitors showed a continuous decline throughout the entire culture period (Fig. 2). In contrast to BM cultures, the levels of adherent myeloid progenitors in UCB D-LTC were significantly lower than in the nonadherent fraction and they also declined, reaching undetectable levels by week 9 (Fig. 2). When both nonadherent and adherent myeloid progenitors were taken together, their total numbers were higher in BM D-LTC than in UCB cultures; this was particularly significant at weeks 3-9 (Table 4). Interestingly, the relative proportion of myeloid progenitors throughout the culture period showed a shift towards the predominance of CFU-M, which corresponded to 72%-100% of the myeloid progenitors detected at week 9 (Table 2). This was observed in BM D-LTC as well as in UCB cultures.

Kinetics of Erythroid Progenitors

A continuous decline in the numbers of erythroid progenitors was observed in BM D-LTC; indeed, at week 7, these progenitors were practically absent both in the nonadherent and adherent fractions of the cultures (Fig. 3). At weeks 3, 5 and 7 erythroid progenitors in the adherent fraction showed similar numbers to those observed in the nonadherent fraction.

In UCB D-LTC, nonadherent erythroid progenitors also showed a continuous decline, although this was not as pronounced as in BM cultures (Fig. 3). In fact, at week 8, these progenitors were still detected in UCB D-LTC, although at very low levels. Adherent erythroid progenitors showed lower numbers than their nonadherent counterparts and could not be detected after seven weeks of culture (Fig. 3). When both nonadherent and adherent erythroid progenitors were taken together, no significant differences were observed between BM and UCB cultures (Table 4). At all time points, the majority of the erythroid progenitors observed in UCB and BM D-LTC consisted of BFU-E, although a significant

Table 4. Total number of HPC (nonadherent + adherent) in D-LTC

Day	Myeloid		Erythroid		Multipotent	
	UCB	BM	UCB	BM	UCB	BM
0	3,968 ± 2,249	6,309 ± 2,980	4,812 ± 2,765	5,622 ± 983	890 ± 177*	311 ± 57
21	352 ± 206	1,146 ± 477 ^b	192 ± 160	221 ± 77	26 ± 30	21 ± 14
35	78 ± 51	469 ± 193 ^b	46 ± 67	59 ± 53	2 ± 3	3 ± 4
49	30 ± 26	186 ± 49 ^b	4 ± 5	bd	bd	bd
63	7 ± 9	79 ± 34 ^b	bd	bd	bd	bd

Results represent mean ± SD of 10 experiments for UCB and eight experiments for BM (on day 63, six UCB cultures and five BM cultures were analyzed) and correspond to HPC numbers per well.

bd = below detection.

*On day 0 multipotent progenitor numbers in UCB D-LTC were significantly higher ($p < 0.05$) than in BM D-LTC.

^bOn days 21, 35, 49 and 63 myeloid progenitor numbers in BM D-LTC were significantly higher ($p < 0.025$) than in UCB D-LTC.

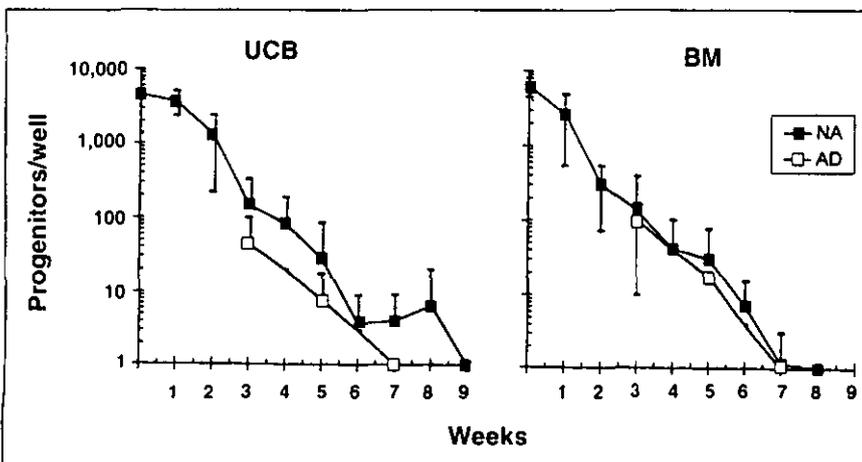


Figure 3. Absolute numbers of erythroid progenitor cells (CFU-E + BFU-E) in human D-LTC established from UCB (left panel) and adult BM (right panel). Points represent mean ± SD of 10 experiments for UCB and eight experiments for BM (six UCB samples and five BM samples for week 9). NA = nonadherent progenitor cells; AD = adherent progenitor cells. A statistical difference ($p < 0.05$) was observed only at week 8 between NA erythroid progenitors in UCB and BM cultures.

increase in the relative proportion of CFU-E was observed in UCB cultures throughout five weeks of culture (Table 3).

Kinetics of Multipotent Progenitors

Among the different types of progenitor cells detected in D-LTC throughout the culture period, multipotent progenitors (CFU-MIX) showed the lowest levels and the fastest disappearance (Fig. 4). In BM cultures, CFU-MIX were detected during the first five weeks, and similar numbers were observed both in the nonadherent and adherent fractions (Fig. 4). In UCB cultures, a continuous decline in nonadherent CFU-MIX numbers was observed, reaching undetectable levels by week 6 (Fig. 4). Adherent CFU-MIX were detected only at week 3 and at very low levels. On weeks 3 and 5 the total numbers of CFU-MIX (nonadherent plus adherent) were similar in UCB and in BM cultures. It was only on day 0 that significantly higher numbers of CFU-MIX were observed in UCB D-LTC (Table 4).

Kinetics of Morphologically Recognizable Cells

The kinetics of the morphologically recognizable cell lineages present in the supernatant of both UCB and BM D-LTC

were analyzed throughout the nine-week culture period (Fig. 5). In BM cultures, granulocytic and monocytic cells showed opposite kinetics. The former were the most numerous (66% of all nucleated cells) during the first week of culture and then declined drastically, comprising 14% of all nucleated cells by week 9. The latter, on the other hand, corresponded to 12% of the cells at week 0, and by week 9 their levels reached 78%. Lymphoid cells (16% of all nucleated cells at week 0) showed only a slight decline, whereas erythroblasts were always the less abundant cell population (<10% of all nucleated cells) (Fig. 5). In contrast to BM cultures, in UCB D-LTC granulocytic cell levels were always between 40%-60% of all nucleated cells, whereas monocytes increased their levels from 4% on day 0 to 35%-50% by weeks 8-9; their levels, however, were significantly lower ($p < 0.05$) than in BM cultures at weeks 8-9. There was a decrease in the relative proportion of lymphoid cells, which comprised 34%-38% of all nucleated cells during the first week of culture (significantly higher [$p < 0.05$] than in BM cultures) and 8%-10% of all nucleated cells between weeks 8 and 9. Finally, erythroblasts showed a similar kinetics to the one observed in BM

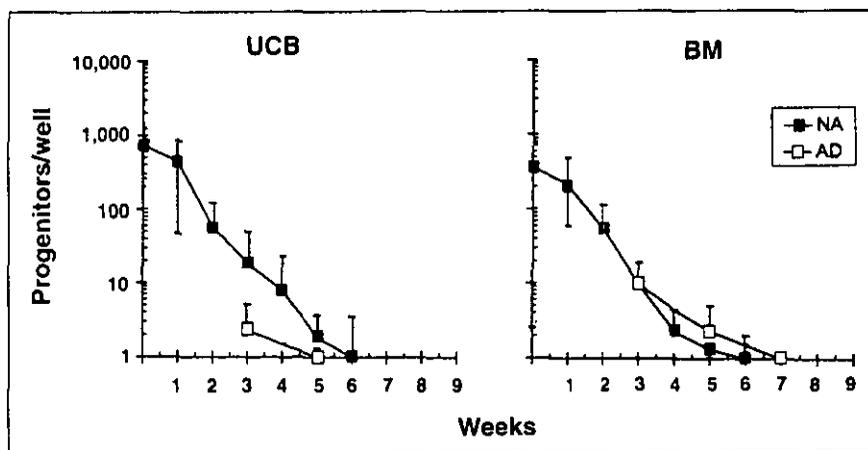


Figure 4. Absolute numbers of multipotent progenitor cells (CFU-MIX) in human D-LTC established from UCB (left panel) and adult BM (right panel). Points represent mean \pm SD of 10 experiments for UCB and eight experiments for BM (six UCB samples and five BM samples for week 9). NA = nonadherent progenitor cells; AD = adherent progenitor cells. A statistical difference ($p < 0.05$) was observed at week 3 between adherent progenitors in UCB and BM cultures.

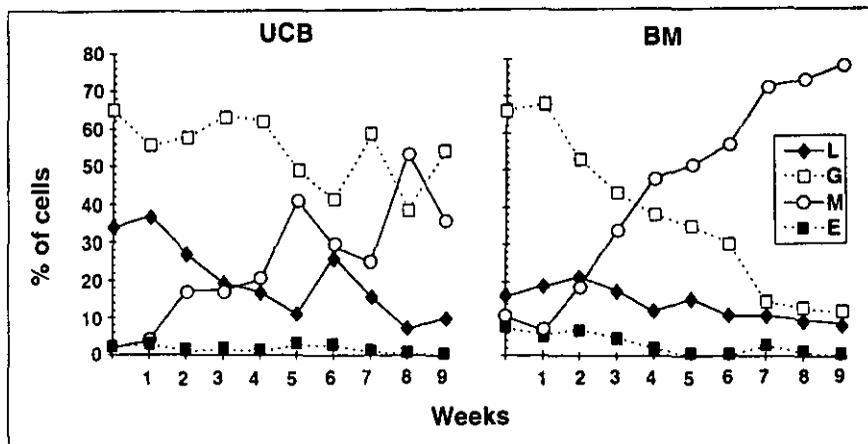


Figure 5. Relative proportion of lymphoid cells (L), granulocytes (G), monocytes/macrophages (M) and erythroblasts (E) in the nonadherent fraction of human D-LTC established from UCB (left panel) and adult BM (right panel). Points represent means of 10 experiments for UCB and eight experiments for BM (six UCB samples and five BM samples for week 9).

cultures, comprising less than 5% of the nucleated cells at all time points (Fig. 5).

DISCUSSION

Much of our current knowledge on the *in vitro* biology of UCB HPCs has derived from studies in which these cells are cultured on a preformed marrow stromal cell layer [3, 4] or in stroma-free liquid cultures supplemented with exogenous recombinant cytokines [6-10]. However, only limited information exists on the *in vitro* behavior of UCB HPCs in standard D-LTC, that is, liquid cultures established in the absence of a preformed allogeneic stroma and without the addition of recombinant cytokines. Indeed, previous studies looking at the growth of hematopoietic progenitors in UCB D-LTC have focused exclusively on myeloid progenitors present in the nonadherent fraction [3, 4]. Thus, in the present study we have characterized the growth kinetics of UCB hematopoietic progenitor and mature cells in D-LTC, throughout a nine-week culture period. D-LTC were also established from BM, as controls.

On day 0, similar numbers of total HPC were observed both in UCB and BM samples. However, we observed a higher proportion of primitive progenitors in UCB. Indeed, multipotent (CFU-MIX), myeloid bipotent (CFU-GM), as well as early erythroid (BFU-E) progenitor cell numbers were higher in UCB than in BM (3.6-fold, 2.7-fold and 1.5-fold, respectively). These results confirm and expand previous studies showing higher levels of CFU-MIX and BFU-E in UCB than in BM [3, 14]. In terms of erythroid progenitors, the relative proportion of CFU-E and BFU-E, both in UCB and BM, has to be taken with caution. *Eaves* and *Eaves* have shown that CFU-E numbers reach their peak in semisolid cultures of human BM cells between days 7 and 10 [24]. Since in our study we scored all hematopoietic CFC, including CFU-E, between days 14 and 17 of culture, it seems very likely that the CFU-E levels observed by us were suboptimal. This, in fact, may be the reason for the lower proportion of CFU-E, as compared to BFU-E, observed both in UCB and BM samples.

It has been widely recognized that successful hematopoiesis in standard BM D-LTC depends upon the presence of an adherent stromal cell layer, developed simultaneously from the same marrow sample [17]. This adherent cell layer consists of fibroblasts, macrophages, adipocytes and endothelial cells which are capable of producing and secreting both extracellular matrix molecules and cytokines [18, 20, 25-27]. In our study, we observed a poor development of the adherent cell layer in UCB D-LTC. Adherent cell numbers in these cultures were 25%-50% of the numbers observed in BM D-LTC and confluence was never seen. Preliminary morphological analysis of the cell composition of adherent layers indicates that whereas in BM cultures, fibroblasts, macrophages and

adipocytes were present, in UCB D-LTC the adherent cell layer consisted almost exclusively of macrophages; fibroblast-like cells were rare and no adipocytes were observed (*Gutiérrez-Rodríguez* and *Mayani*, unpublished observations). Indeed, our observations suggest that UCB is a rich source for macrophage development *in vitro*, since significant numbers of these cells were generated in these cultures. Thus, it is possible that the postulated deficient hematopoietic supportive capacity of the adherent layers of UCB D-LTC is due not only to their reduced cell number, but also to their abnormal cell composition (i.e., absence of fibroblasts). Studies are currently in progress in order to characterize in more detail the cell composition and physiology of the adherent layers developed in UCB D-LTC. It is interesting that *Ye* and colleagues have recently reported on the establishment of adherent stromal cell layers from human UCB capable of supporting HPC growth for several weeks [28]. The authors cultured UCB mononuclear cells on customized glass coverslips, which show a very different surface (no detectable granular particles or coarse bump structures) from that of standard glass coverslips or standard plastic surface; on the other hand, they maintained their cultures at 37°C for the whole culture period. These conditions clearly differ from the ones used in our study, thus it remains to be determined if the differences in HPC and adherent cell growth observed are due to the differences in culture conditions.

The poor development of the adherent cell layer in UCB D-LTC correlated with the continuous decline in the numbers of HPCs throughout the nine-week culture period, in contrast to BM D-LTC, in which a plateau was observed in HPC numbers between weeks 6 and 9. By week 9, the total number of HPCs in BM D-LTC was 11-fold higher than in UCB cultures. Previous studies have demonstrated that UCB HPCs possess a higher proliferation and expansion potential than BM HPCs when cultured on a preformed marrow stroma [3] or in cultures supplemented with recombinant cytokines [13, 15]. Thus, our observations suggest that the impaired hematopoietic cell growth in UCB D-LTC is due to quantitative and qualitative deficiencies of the adherent cell layer, which is unable to provide the factors required by HPC for their proliferation. This notion has also been supported by the work of *Howe* and colleagues [3].

It is noteworthy that throughout the culture period a shift towards myelopoiesis was observed, both in UCB and BM D-LTC. Indeed, erythroid and multipotent progenitors disappeared relatively fast in this culture system, so that by weeks 7-9, 100% of the progenitors detected in BM cultures corresponded to myeloid progenitors, whereas in UCB cultures these cells comprised 88%-100% of the total number of progenitors observed. These findings confirm previous studies, showing that in human BM D-LTC myelopoiesis is

sustained significantly longer than erythropoiesis [19, 22]. The reason for this is still unclear; attempts to sustain erythropoiesis for longer periods of time by means of adding exogenous erythropoietin have shown only a transient stimulation [22], suggesting that other factors and/or mechanisms necessary for erythroid development are absent in this culture system. In this regard, it is interesting that no significant differences in total erythroid progenitor cell numbers were seen between UCB and BM cultures, even though the former contained significantly lower numbers of adherent stromal cells than the latter. Further studies need to be performed to define the factors and culture conditions necessary for erythroid growth in D-LTC. Similarly, studies aimed at the identification of the factors and conditions necessary for the growth of multipotent progenitors in D-LTC need to be carried out.

It has been shown that most, if not all, of the CFC with high proliferative potential are restricted to the myeloid lineage [29]. It has also been demonstrated that the vast majority of the long-term culture initiating cells exclusively gives rise to progenitors of the granulocyte and/or macrophage lineages [30]. Furthermore, *Mayani* and *Lansdorp* have recently demonstrated the presence, at least in UCB, of very primitive HPCs committed to the granulocyte/macrophage lineage (CFU-GM II), whose proliferation and expansion potentials are higher than those of multipotent progenitors [31]. Thus, it is likely that the myeloid progenitors observed both in UCB and BM D-LTC after five weeks of culture are derived from primitive progenitors such as the ones described above. Moreover, it has been shown that these primitive progenitors (i.e., high proliferative potential CFC, long-term culture initiating cells, CFU-GM II) preferentially give rise to mature progenitors of the monocytic lineage; this would explain the shift towards the predominance of CFU-M, both in UCB and BM D-LTC, observed in our study after five weeks of culture. Such a predominance of CFU-M, in turn, correlated with, and was most likely the cause of, the increase in the proportion of monocytes/macrophages both in UCB and BM D-LTC.

In summary, we have thoroughly followed the kinetics of HPC and morphologically recognizable cells in D-LTC established from both UCB and BM. Our study indicates that myeloid progenitor cell growth is deficient in UCB D-LTC, as compared to BM D-LTC, and suggests that this is due to the impaired development of an adherent cell layer, unable to provide the factors and conditions required for their growth. Interestingly, throughout the culture period the total numbers of multipotent and erythroid progenitors were similar both in UCB and BM cultures, regardless of the numbers and quality of the adherent cells present; this suggests that the stroma developed in D-LTC is not sufficient for the proliferation of these progenitors. These results may be relevant not only in our understanding of the biology of UCB-derived hematopoietic and stromal cells, but also in the development of strategies for the ex vivo expansion of UCB HPC.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank *Dr. Luis Benitez-Bribiesca*, head of the Oncological Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center, for his continuous support. We also thank *Dr. Octavio Vera-Morales* and the staff from the Gynecology Department of the "1° de Octubre" Hospital, as well as *Dr. Fernando Escobedo* and the staff from the Gynecology Department of the "20 de Noviembre" Hospital, for making UCB samples available for this study. *Dr. Enrique Gómez-Morales* and the staff of the Bone Marrow Transplant Unit of the "Bernardo Sepulveda" Hospital, as well as *Drs. Armando Mansilla* and *Guillermo Careaga* (Cardiology Hospital, National Medical Center) are also thanked for making normal BM samples available. Some of the culture media used in this study were a generous gift from StemCell Technologies, Inc.; Vancouver, BC, Canada.

This study was supported by grants no. 0122P-M9506 and 0102P-M9506 from "Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología" (CONACYT, México) and by grant no. FP0038/79 from "Instituto Mexicano del Seguro Social" (IMSS, México).

REFERENCES

- 1 Knudtzon S. In vitro growth of granulocyte colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* 1974;43:357-361.
- 2 Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3828-3832.
- 3 Hows JM, Bradley BA, Marsh JCW et al. Growth of human umbilical cord blood in long-term haemopoietic cultures. *Lancet* 1992;340:73-76.
- 4 Pettengel R, Luft T, Henschler R et al. Direct comparison by limiting dilution analysis of long-term culture-initiating cells in human bone marrow, umbilical cord blood and blood stem cells. *Blood* 1994;84:3653-3659.
- 5 Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation: overview of the clinical experience. *Blood Cells* 1994;20:227-234.
- 6 Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM. Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells. *Blood* 1993;81:3252-3258.

- 7 Moore MAS. Ex vivo expansion and gene therapy using cord blood CD34⁺ cells. *J Hematother* 1993;2:221-227.
- 8 Mayani H, Lansdorp PM. Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. *Blood* 1994;83:2410-2417.
- 9 Heimfeld S, Kalamasz DF, Fogarty BL et al. Isolation and ex vivo expansion of CD34⁺ cells from cord blood using dextran sedimentation and avidin column selection. *Blood Cells* 1994;20:397-403.
- 10 Migliaccio AR, Migliaccio G, Adamson JW. Expansion of human neonatal progenitor cells in vitro under serum-deprived conditions. *Blood Cells* 1994;20:424-429.
- 11 Apperley JF. Umbilical cord blood progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994;14:187-196.
- 12 Nicol AJ, Hows JM, Bradley BA. Cord blood transplantation: a practical option? *Br J Haematol* 1994;87:1-5.
- 13 Carow CE, Hangoc G, Cooper SH et al. Mast cell growth factor (c-kit ligand) supports the growth of human multipotential progenitor cells with a high replating potential. *Blood* 1991;78:2216-2221.
- 14 Lansdorp PM, Dragowska W, Mayani H. Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J Exp Med* 1993;179:787-791.
- 15 Tryckoff CM, Abbud MR, Laver J et al. Rapid exit from G₀/G₁ phases of the cell cycle in response to stem cell factor confers on umbilical cord blood CD34⁺ cells an enhanced ex vivo expansion potential. *Exp Hematol* 1994;22:1264-1272.
- 16 Vomoor J, Lapidot T, Pflumio F et al. Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice. *Blood* 1994;83:2489-2497.
- 17 Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 1977;91:335-344.
- 18 Bentley SA. Collagen synthesis by bone marrow stromal cells: a quantitative study. *Br J Haematol* 1982;50:491-497.
- 19 Coulombel L, Eaves AC, Eaves CJ. Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive hemopoietic progenitors in the adherent layer. *Blood* 1983;62:291-297.
- 20 Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haematol* 1992;49:225-233.
- 21 Eaves CJ, Cashman J, Eaves AC. Methodology of long-term culture of human hemopoietic cells. *J Tissue Culture Meth* 1991;13:55-61.
- 22 Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A. Modulation of erythropoiesis and myelopoiesis by exogenous erythropoietin in human long-term marrow cultures. *Exp Hematol* 1990;18:174-179.
- 23 Cashman J, Eaves AC, Eaves CJ. Regulated proliferation of primitive hematopoietic progenitor cells in long-term human marrow cultures. *Blood* 1985;66:1002-1005.
- 24 Eaves AC, Eaves CJ. Erythropoiesis in culture. *Clin Haematol* 1984;13:371-391.
- 25 Andreoni C, Moreau I, Rigal D. Long-term culture of human bone marrow. I. Characterization of adherent cells by flow cytometry. *Exp Hematol* 1990;18:431-437.
- 26 Testa NG, Coutinho LH, Radford JA et al. Growth factors and the microenvironment. In: van Furth, ed. *Hemopoietic Growth Factors and Mononuclear Phagocytes*. Basel: Karger 1993:36-43.
- 27 Wight TN, Kinsella MG, Keating A et al. Proteoglycans in human long-term marrow cultures: biochemical and ultrastructural analyses. *Blood* 1986;67:1333-1343.
- 28 Ye Z-Q, Burkholder JK, Qiu P et al. Establishment of an adherent cell feeder layer from human umbilical cord blood for support of long-term hematopoietic progenitor cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12140-12144.
- 29 McNiece IK, Stewart FM, Deacon DM et al. Detection of a human CFC with a high proliferative potential. *Blood* 1989;74:609-614.
- 30 Sutherland HJ, Lansdorp PM, Hankelman DH et al. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;87:3584-3588.
- 31 Mayani H, Lansdorp PM. Proliferation of individual hematopoietic progenitors purified from umbilical cord blood. *Exp Hematol* 1995;23:1453-1462.