

BANCO DE CELULAS PROGENITORAS HEMATOPOYETICAS DE CORDON UMBILICAL

VICTOR H. MORALES¹, JORGE MILONE¹, ORLANDO ETCHEGOYEN¹, JAVIER BORDONE¹, ALFREDO URANGA²¹ITMO, Instituto de Trasplante de Medula Osea y ²Servicio de Obstetricia, Hospital Italiano, La Plata

Resumen El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) de la médula ósea y de sangre periférica es un recurso terapéutico para procesos malignos y no malignos. La falta de donantes compatibles es una limitación importante. El descubrimiento de que la sangre de cordón umbilical (CU) contiene un elevado número de CPH y que puede ser empleada como una fuente alternativa de trasplante alogénico, llevó a ITMO a desarrollar el programa BANCEL, la primera experiencia de su tipo en Argentina y Latinoamérica. Se solicitó la donación de la sangre que queda en el cordón umbilical y la placenta a mujeres en el último trimestre de su embarazo. Se confeccionó el consentimiento informado y la historia clínica familiar. Sobre 65 donaciones efectuadas se colectaron 55 (85%) y se criopreservaron 51 (78%). El volumen colectado medio fue de 110 ml, y el criopreservado de 35ml, con una reducción del 68% (75 ml). Se determinaron los sistemas eritrocitarios ABO y Rh; los antígenos de histocompatibilidad, sistema HLA, clase I, *loci* A y B, y clase II, *locus* DR fueron tipificados por métodos de biología molecular, PCR – SSOP. El *screening* de enfermedades infecciosas se efectuó para brucelosis, sífilis, Chagas, hepatitis B y C, HIV – I y II, HTLV - I y II, toxoplasmosis y citomegalovirus. Se descartaron 2 unidades positivas para hepatitis B (*anticore*) y 2 unidades positivas para Chagas. Se estableció la cantidad de células nucleadas totales (CNT), células CD34+ y la capacidad clonogénica, al momento de la colecta y luego de los procedimientos de reducción de volumen previo a la criopreservación. Se comprobó una reducción del 5% en CNT y en células CD34 y del 10% en unidades formadoras de colonias (UFC), luego de la manipulación de las muestras. Se determinó un buen coeficiente de correlación entre CNT y UFC totales.

Palabras clave : células hematopoyéticas, cordón umbilical

Abstract *Umbilical cord hematopoietic progenitor cell bank.* Transplantation of hematopoietic progenitor cells (HPC) from bone marrow and mobilized peripheral blood is a standard therapy in malignant and non malignant diseases. The lack of suitable donors is an important limitation. The discovery that umbilical cord blood (CB) contains high numbers of HPC that can be used as an alternative source for allogeneic stem cell transplantation led ITMO to establish BANCEL, the first Argentine and Latinoamerican experience of its kind. The blood remaining in the umbilical cord and in the placenta was requested from women who were in the last quarter of pregnancy. An informed consent together with a medical record focused on family disease was completed. Out of 65 donations, 55 (85%) were collected and 51 (78%) were cryopreserved. Mean collected volume was 110 ml with 68% (75 ml) reduction and mean cryopreservation of 35 ml; ABO and Rh blood group systems were determined, HLA, class I, A and B *loci*, and class II, DR *locus* were typed by molecular biology methods using PCR-SSOP. Infectious disease *screening* was carried out for brucellosis, syphilis, Chagas, hepatitis B and C, HIV I and II, HTLV I and II, toxoplasmosis and cytomegalovirus. Two positive units for hepatitis B (*anticore*) and two positive units for Chagas were discarded. The quantity of total nucleated cells (TNC), CD34+ cells and the clonogenic capacity were determined twice at the collection and after the procedures of volume reduction previous to cryopreservation. A 5% reduction in both TNC and CD34 cells and a 10% in the colony forming units (CFU) were detected. A good correlation coefficient between TNC and CFU was obtained.

Key words: hematopoietic cells, cord blood banking

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) provenientes de la médula ósea o de la sangre periférica es un recurso terapéutico de uso habitual para el tratamiento de enfermedades hematológicas tales como

leucemias agudas y crónicas, anemia aplásica severa, hemoglobinopatías y déficits inmunológicos congénitos¹⁻⁶. Desafortunadamente sólo un tercio de los pacientes con indicación de trasplante posee donante histoiéntico en el sistema HLA, con lo cual un número importante de pacientes queda al margen de esta solución terapéutica^{7,8}.

La idea de emplear células progenitoras de la sangre contenidas en el cordón umbilical (CU) como fuente para

Recibido: 28-VII-20001

Aceptado: 2-VIII-2001

Dirección Postal: Dr. Víctor Hugo Morales, Calle 508 entre 16 y 18, 1897 Gonnet, Argentina.
Fax: (54-221) 471-4744

e-mail: itmo@netverk.com.ar

reconstituir el sistema hematopoyético, ha surgido en los últimos años. En 1974 Knudtson⁹ comunicó que la sangre placentaria poseía la capacidad de formar colonias granulocíticas. Posteriormente otros trabajos confirmaron y ampliaron estos hallazgos¹⁰⁻¹². Pero el hito que marcó el comienzo de una nueva era fue la ejecución en 1988 del primer trasplante en el cual se emplearon CPH procedentes de placenta y cordón umbilical para reconstituir el sistema hemático humano. El procedimiento fue ejecutado por Gluckman y col¹³, para el tratamiento de la anemia de Fanconi, con éxito completo. Las células utilizadas fueron colectadas y criopreservadas luego del nacimiento de un hermano histoiéntico de la paciente. Años más tarde en 1994, Kurtzberg y col. efectúan el primer trasplante con CPH de CU no relacionado¹⁴. A partir de esa fecha y en especial en la segunda mitad de la década del 90 se asiste a un aumento significativo en el número de este tipo de trasplantes. Luego de los trabajos pioneros de Rubinstein y col.¹⁵ en la organización de bancos de CPH de CU, han surgido otros bancos creados en diferentes países¹⁶⁻¹⁸, muchos de los cuales funcionan en red, tal como lo es EUROCORD^{19, 20}.

En el año 1998 nuestro Instituto, ITMO, comenzó su experiencia de obtención, estudio, procesado y criopreservación de CPH de CU; los primeros casos fueron colectas de sangre de CU de hermanos de pacientes que padecían leucemia y no poseían dador histoiéntico²¹. Posteriormente se puso en marcha el programa BANCEL, organizando la primera experiencia Argentina y Latinoamericana de un banco de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) de cordón umbilical (CU), para pacientes no relacionados.

La estrategia que se ha seguido partió de tres premisas básicas: la obtención de un número de células adecuado, la reducción del volumen a criopreservar y la conservación de la capacidad clonogénica del producto obtenido.

El objetivo del presente trabajo ha sido informar sobre la metodología desarrollada en el programa BANCEL.

Material y métodos

Criterio de inclusión: Si bien el cordón umbilical y la placenta habitualmente son elementos desechables, existe el acuerdo para solicitar a la madre la donación de la sangre en ellos contenida. La solicitud se efectuó sin ningún tipo de coerción, reservando la autonomía de su decisión, preferentemente en el tercer trimestre del embarazo excluyendo a la mujer en trabajo de parto, por encontrarse involucrada emocionalmente. Se le explicó a la futura madre cuál es la función de la placenta, cuál es el destino que se le dará al material en caso de rechazar la donación y cuál es el objetivo deseado para obtener las células allí contenidas. Se solicitó y se obtuvo la firma de un consentimiento informado para la donación de la sangre y la realización de pruebas diagnósticas y estudios genéticos en sangre materna y del recién nacido. Se confeccionó una historia clínica familiar, formularios de colecta y recepción de la mues-

tra. Se tuvieron en cuenta 2 principios éticos: que el procedimiento en sí de colecta no provoca daño, dolor o le quita algo de valor al donante, y que el objetivo final será la ejecución de un trasplante de CPH con el beneficio que esto implica para un paciente que no posee donante histoiéntico.

Los estudios serológicos para enfermedades infecciosas se efectuaron en la madre a la firma del consentimiento informado y en el momento del parto.

Colecta de sangre de cordón umbilical: Luego del nacimiento se procedió al "clampeo" precoz del cordón, y tras el alumbramiento se obtuvo el mismo con la placenta, colocándose en un dispositivo diseñado a tal fin. Efectuada la asepsia y la antisepsia del cordón se procedió a cateterizar de manera distal por punción la vena umbilical con aguja 18 G y a obtener en circuito cerrado sangre placentaria por gravedad, en una bolsa que contiene 20 ml de anticoagulante CPD-A. La reducción del volumen se efectuó de acuerdo al protocolo modificado de Rubinstein y col²². Para ello se agregó *Hidroxiethylstarch* (HES) en relación 1: 5, con centrifugado de la mezcla durante 15 minutos a 400 G, descarte de eritrocitos y procesamiento de la interfase y el plasma.

Estudios efectuados en sangre de cordón: Los recuentos de células nucleadas totales (CNT) se efectuaron con empleo de un contador automático *Coulter J5*. Se asignó un especial interés a los tests para establecer el número de células que expresan el marcador de membrana CD34 y la capacidad clonogénica de las células obtenidas y procesadas. Para ello se utilizó citometría de flujo y test de unidades formadoras de colonias hemáticas (UFC). Los estudios en las distintas fracciones colectadas fueron: en sangre total (0.5 ml) se determinó células nucleadas totales (CNT), células CD34+, viabilidad y UFC; en glóbulos rojos (9.5 ml) se efectuó el estudio de los grupos sanguíneos, sistema ABO y Rh-Hr, cifra de CNT, tipificación para antígenos HLA, Clase I y II, loci A, B, y DR por biología molecular y estudios bacteriológicos; en plasma (9.0 ml) se determinó CNT, investigación de enfermedades infecciosas y estudios microbiológicos; en el producto final (0.5 ml) se estudió la viabilidad, la cifra de CNT, de células CD34+ y de UFC.

Citometría de flujo: La citometría de flujo permitió definir una población homogénea de células CD34+, mediante el análisis de características morfológicas y la definición de antígenos de superficie con empleo de anticuerpos monoclonales anti-CD45 y anti-CD34. El protocolo empleado para cuantificar las células CD34+ fue el ISHAGE²³, con utilización de anticuerpos monoclonales anti CD45-FITC, anti CD34-PE y control isotipo-PE. Se utilizó un citómetro de flujo FAC Scan (BD-USA)

Se lisaron eritrocitos y se analizaron 50.000 eventos con empleo de un *software Lysis II*. Se buscó determinar la población de interés CD34+, con mínima interferencia de marcación no específica y de restos celulares.

El número absoluto se calculó en base a la fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ absoluto células CD34+} = \frac{\text{Recuento de CNT (x10}^9\text{/l)} \times \text{N}^\circ \text{ total eventos CD34+}}{\text{x 1000/Nro total de eventos CD45+}}$$

Unidades formadoras de colonias (UFC): Se evaluó la formación de unidades formadoras de colonias hemáticas (UFC) para las series granulocítica, eritroide, macrofágica y megacariocítica (GEMM); para las series granulocítica y macrofágica (G-M) y para la serie eritroide (BFU-E)²⁴. Los cultivos celulares se efectuaron en medio semisólido de metilcelulosa al 0.9% en medio de ISCOVE (*Stem Cell Tec.*), suplementado con: 30% suero bovino fetal, 1% albúmina sérica bovina, 10⁻⁴ M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamina, 50 ng/ml rh-*Stem Cell Factor*, 20 ng/ml rh-GM-CSF, 20 ng/ml rh-IL-3, 20 ng/ml rh-IL-6, 20 ng/ml rh-G-CSF, 3 U/ml rh-eritropoyetina. Se sembraron en cada pocillo, por triplicado, 500 µl de medio de cultivo,

con una concentración celular final de 1.0×10^5 /ml. Todos los cultivos fueron efectuados por triplicado, en placas de plástico de 35 mm de diámetro, durante 14 días con incubación a 37 °C, 100% de humedad y atmósfera de CO_2 al 5%. Se efectuó la lectura con microscopio invertido, considerándose una colonia a la agrupación de más de 50 células para definir UFC-GEMM y UFC-GM y con la presencia de hemoglobina para BFU-E.

Sistema ABO y Rh(D): El grupo sanguíneo, sistema ABO y el factor Rh (D) se determinó mediante los anticuerpos anti A, anti B, anti AB y anti D (*Gamma Biologicals*).

Tipificación del sistema HLA: La tipificación del sistema HLA, en los loci A, B y DR se efectuó mediante empleo de PCR – SSO, con sondas de *Life-Code* (USA), (36 sondas para locus A, 37 para locus B, 37 para locus DR).

Microbiología: Los estudios microbiológicos buscaron determinar contaminaciones por gérmenes aeróbicos, anaeróbicos y hongos (bacteriología directa y cultivos de identificación).

Estudios serológicos para enfermedades infecciosas: Se realizaron los siguientes estudios con el fin de determinar la presencia de enfermedades infecto contagiosas en muestras de SCU y de la donante (madre): detección de brucelosis mediante aglutinación en placa (*Wiener lab.*), sífilis mediante técnica de VDRL (*Wiener lab.*), Chagas mediante doble determinación: Hemaglutinación indirecta (*Wiener lab.*) y ELISA (*BiosChile*). Se empleó ELISA para hepatitis B (antígeno de superficie y anticuerpos anticore, *Biokit*), hepatitis C (*Biokit*), HIV I y II (*Biokit*), HTLV I y II (*Ortho*), toxoplasma (IgG e IgM, *Biokit*), CMV (IgG e IgM, *Biokit*) y antígeno p24 de HIV (*Coulter*).

Criopreservación: Las células obtenidas fueron criopreservadas con descenso controlado de la temperatura, luego de suspender en medios de cultivo RPMI 1640, albúmina humana al 5% y DMSO al 10% en N_2 líquido y conservados a $-180^\circ C$. Se criopreservaron muestras de plasma, alícuotas celulares y ADN para estudios ulteriores.

Resultados

Se efectuaron 65 solicitudes de donación obteniendo un resultado afirmativo en todos los casos (Tabla 1). Las cosechas efectuadas fueron 55, y se criopreservaron 51 (78 %).

En la Tabla 2 se aprecian los tiempos de gestación, tipo de parto, sexo y peso del recién nacido.

TABLA 1.– *Colecta de células progenitoras hematopoyéticas de cordón umbilical. Causas de fracaso en la colecta*

Donaciones: 65	Colectas: 55 (85%)	Criopreservadas: 51 (78 %)
Causa de colectas no efectuadas (n=10)	Causas de colectas no criopreservadas (n=4)	
- Malformaciones : 1	- Nro de células < 6×10^8 : 3	
- Acretismo placentario: 1	- Ruptura de bolsa : 1	
- Descarte obstétrico: 2		
- Ausencia de clampeo: 2		
- Ruptura de cordón:2		
- Cordón escurrido: 2		

El volumen de sangre de CU colectado tuvo una media de 110 ml, con un volumen criopreservado de 35 ml, una reducción del 68%, siendo la media del intervalo colecta-criopreservación de 14 hrs., (Tabla 3) . La viabilidad fue del 99% en las células pre-criopreservación y del 90% en 5 muestras tomadas al azar luego de descongeladas.

La distribución de frecuencias de los grupos sanguíneos, sistema ABO y Rh se aprecia en la Tabla 4.

Los resultados de los estudios serológicos efectuados para determinar la presencia de enfermedades infecto-contagiosas se aprecian en la Tabla 5. Se determinó positividad serológica para Chagas en 2 casos y para hepatitis B (HBc) en otros dos.

TABLA 2.– *Tiempo de gestación, vía del parto, sexo y peso del recién nacido*

Gestación	Media : 39.8 semanas (r: 38 - 42)
Parto	Vaginal 36 – (71%) Cesárea 15 – (29 %)
Sexo del Recién nacido	Masculino : 24 - (47 %) Femenino: 27 - (53 %)
Peso \bar{x} :	3.434 g. (r: 2.500 – 4.700 g)

r: rango

TABLA 3.– *Volúmenes colectados y criopreservados*

Volumen colectado:	110 ml (r: 65 – 229)
Volumen criopreservado:	35 ml (r: 21 – 256)
Reducción de volumen:	75 ml (68 %)
Intervalo Colecta – Criopreservación	
\bar{x} :	14 horas (r: 1 – 30 hrs)
Viabilidad :	99 % (azul tripan)

r: rango

TABLA 4.– *Frecuencias de los grupos sanguíneos*

● Sistema ABO N = 51	
Grupo A = 23	(45%)
Grupo 0 = 22	(43%)
Grupo B = 5	(10%)
Grupo AB= 1	(2%)
● Sistema Rh – Hr	
Rh(D) Positivo :	43 (84%)
Rh(D) Negativo:	8 (16%)

TABLA 5.- Resultados de estudios serológicos en 51 unidades de sangre materna y de cordón

N = 51		Madre	SCU
Bruceosis	Aglutinación	Negativo	Negativo
Sífilis	VDRL	Negativo	Negativo
Chagas	HAI	1 Positivo (2%)	1 Positivo (2%)
	Elisa	1 Positivo (2%)	1 Positivo (2%)
Hepatitis B	HbsAg	Negativo	Negativo
	Anti-HBc	2 Positivos (4%)	2 Positivos (4%)
Hepatitis C	Anti-HVC	Negativo	Negativo
HIV - I y II	Anti-HIV I-II	Negativo	Negativo
	p24 Ag	Negativo	Negativo
HTLV - I y II	Anti-HTLV I-II	Negativo	Negativo
Toxoplasma	IgG	11 Positivos (22%)	8 Positivos (16%)
	IgM	Negativo	Negativo
CMV	IgG	35 Positivos (69%)	35 Positivos (39%)
	IgM	Negativo	Negativo

HAI : Hemaglutinación Indirecta
SCU: Sangre de Cordón Umbilical

TABLA 6.- Valores celulares iniciales y finales de cordón umbilical

Células	Valor Inicial medio	Valor Final medio
CNT x 10 ⁹	1.30	1.24
n = 51	(0.7 - 2.9)	(0.3 - 2.75)
CD34 x 10 ⁶	5.04	4.75
n = 51	(1.6 - 23.2)	(1.36 - 27.8)

CNT : células nucleadas totales
CD34 + : células CD 34 +

TABLA 7.- Unidades formadoras de colonias hemáticas en sangre de cordón umbilical

Unidades	Valor inicial medio	Valor final
UFC-GEMM (x 10 ⁴)	69	62
n = 51	(10 - 373)	(10 - 284)
UFC-GM (x 10 ⁴)	145	132
n = 51	(27 - 490)	(12 - 476)
BFU-E (x 10 ⁴)	80	69
n = 51	(3 - 343)	(9 - 247)

UFC-GEMM: unidades formadoras de colonias granulocito-eritroide-macrofágico-megacariocítica.

UFC-GM: unidades formadoras de colonias granulocito-macrofágica.

BFU-E: unidades formadoras de colonias eritroide.

En la Tabla 6 se aprecian los valores de CNT y de células CD34+ obtenidas en la colecta de sangre de cordón, previo al proceso para disminuir su volumen y luego de su manipulación, previo a la criopreservación. Como se ve la disminución del número de células solo fue del 5%, en ambos casos.

La medida de la capacidad clonogénica de la CPH de CU y de su variación por el procedimiento para reducir el volumen se aprecia en la Tabla 7.

Como se aprecia en las cifras de la Tabla, el proceso de reducción de volumen provoca una disminución del 10% de la formación de colonias. Las características

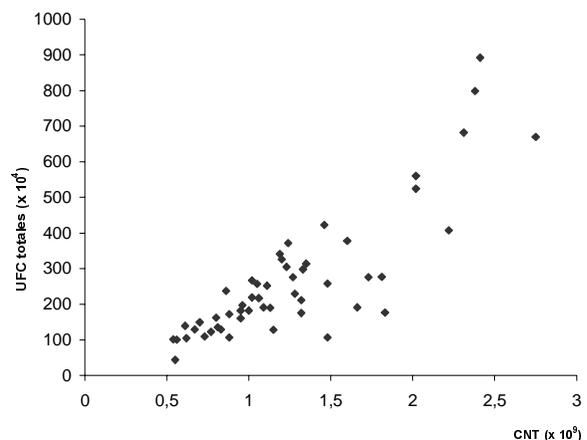


Fig. 1.- Correlación entre células nucleadas totales (CNT) y unidades formadoras de colonias hemáticas (UFC) totales

morfológicas de las mismas no presentan modificaciones según el momento de su realización.

Finalmente se comparan los resultados entre el número de CNT obtenidas, los valores de células CD34+, y las UFC-totales (UFC-GEMM, UFC-GM y BFU-E), empleando análisis de regresión lineal (Figura 1).

Se obtuvo la mejor correlación entre CNT y UFC-total, $r = 0,849$, indicando que la capacidad clonogénica de las unidades de sangre de cordón umbilical es mayor al incrementar el número de CNT de dicha unidad, sin la existencia de un plateau.

Los resultados obtenidos al comparar CNT vs. células CD34 y células CD34 vs. UFC-total, demuestran una correlación reducida. ($r=0,560$ y $r=0,541$ respectivamente).

Discusión

El alotrasplante de CPH con origen en la médula ósea o en la sangre periférica es un recurso limitado en su aplicación por la falta de donantes histoidénticos; frente a esta realidad se ha recurrido a fuentes alternativas de CPH que permitan ampliar las posibilidades de obtener donantes compatibles.

La sangre contenida en el cordón umbilical y la placenta ha demostrado ser una fuente rica en CPH. Su empleo en alotrasplante ha sido posible al constituirse bancos en los cuales son colectadas, procesadas, estudiadas y criopreservadas. El programa BANCEL fue elaborado para poner en marcha un banco de CPH de CU dentro de normas de calidad establecidas por programas similares desarrollados con anterioridad^{25 - 27}.

La respuesta a la solicitud de donación fue altamente positiva con un excelente rendimiento para este tipo de prácticas cuya explicación hay que buscar en el «clampeonato» precoz del cordón umbilical y en la ejecución del procedimiento por personal con entrenamiento previo.

La tipificación de antígenos de Histocompatibilidad, Sistema HLA mediante técnica de biología molecular de mediana resolución permitió asignar alelos con mayor precisión que la serología tradicional.

La capacidad clonogénica del producto obtenido quedó demostrada por el estudio de la formación de UFC, en la colecta inicial y en el producto a criopreservar.

Trabajos previos efectuados al comienzo de la instalación de los bancos de CPH de CU referían una pérdida de células considerable al reducir el volumen y desaconsejaban su uso^{28 - 30}. En nuestra experiencia solo ocurrió una pérdida entre el 5 y el 10% del valor inicial, todo lo cual avala el procedimiento de reducción del volumen con todo lo que significa la disminución en el empleo de la mezcla de criopreservación, del espacio requeridos en tanques de nitrógeno líquido y en el costo general del procedimiento.

En forma paralela fueron criopreservadas muestras de plasma, células y ADN. Las mismas están destinadas a efectuar controles de calidad, post criopreservación, frente a un requerimiento para trasplante de la unidad.

El plasma está destinado principalmente a la reiteración de estudios serológicos. Las células permiten confirmar luego de su descongelado su número, la cantidad de células CD34+ y la capacidad clonogénica. El ADN asegura poder reiterar la tipificación de antígenos HLA. Un trozo de cordón es criopreservado para su eventual empleo en técnicas de expansión sobre estroma.

Las CPH de CU han demostrado ser una fuente alternativa válida para el trasplante. El número de células con el fenotipo CD34+ y la capacidad clonogénica de la misma evaluada por la formación de unidades formadoras de colonias hemáticas (CFC) aseguran su potencial para reconstituir el tejido hematopoyético enfermo.

En forma simultánea con esta idea ha surgido la posibilidad del empleo del CPH en modelos de expansión³¹ lo que permitiría su empleo en trasplante de pacientes de mayor peso y de transferencia génica,³² con inserción de retrovirus modificados con genes terapéuticos para el tratamiento de diversas enfermedades.

El desarrollo del programa BANCEL ha demostrado la factibilidad de la creación de un banco de células progenitoras hematopoyéticas de cordón umbilical en nuestro país, con la criopreservación de muestras de calidad y capacidad clonogénica aptas para su empleo en alotrasplante. El programa tiene previsto una colecta final de 1000 muestras, para permitirle alcanzar una escala clínica de provisión de muestras.

Agradecimiento: Este trabajo se efectuó con subsidio del FONTAR, Fondo Tecnológico Argentino. Préstamo BID 802.

Bibliografía

1. Advisory Committee of International Bone Marrow Transplant Registry. Report from the International Bone Marrow Transplant Registry. *Bone Marrow Transplant* 1989; 4:221-8.
2. Devergie A, Apperley JF, Labopin M, et al. European results of matched unrelated donor bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. Impact of HLA-Class II matching. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 11-9.
3. Deeg HJ, Leisenring W, Storb R, et al. Long term outcome after marrow transplantation for severe anemia. *Blood*. 1998; 91: 3637-45.
4. Goldman JM, Schmitz N, Niethammer D, Gratwohl A. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumors and immune disorders current practice in Europe in 1998. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 1- 8.
5. Russell JA, Larratt L, Brown C, et al. Allogeneic blood stem cell and bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia and myelodysplasia: influence of

- stem cell source on outcome. *Bone Marrow Transplant* 1999; 11: 1177-83.
6. Armitage J. Bone Marrow Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 1994; 330: 827-38.
 7. Beatty PG, Anasetti C, Hansen JA, et al. Marrow transplantation from unrelated donors for treatment of hematologic malignancies: Effect of mismatching for one HLA locus. *Blood* 1993; 81: 249-53.
 8. Hansen JA, Petersdorf E, Martin PJ, Anasetti C. Hematopoietic stem cell transplants from unrelated donors. *Immunol Rev* 1997; 157: 141-51.
 9. Knudtson S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* 1974; 43: 357- 61.
 10. Gabutti V, Foa R, Mussa F and Aglietta M. Behaviour of human haematopoietic stem cells in cord and neonatal blood. *Haematologica* 1975; 4: 60-9.
 11. Nakahata T, Ogawa M. Hemopoietic colony – forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono and multipotencial hemopoietic progenitors. *J Clin. Invest.* 1982; 70: 1324-8.
 12. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hemopoietic stem / progenitors cells. *Proc. Natl. Acad. SCI. USA* 1989; 86: 3828-32.
 13. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *New Eng. J. Med.* 1989; 321: 1174-8.
 14. Kurtzberg J, Graham M, Casey J, et al. The use of umbilical cord blood in mismatched related and unrelated hemopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells* 1994; 20: 275-84.
 15. Rubinstein P, Taylor PE, Scaradavou A, et al. Unrelated placental blood for bone marrow reconstitution: organization of the placental blood program. *Blood Cells* 1994; 20: 587-600.
 16. Hakenberg P, Sirchia G, Garcia J, Wernet P. A location conflicts in cord blood transplantation: an evaluation of matching criteria of cord blood specimen and its impacts on the work flow within an international CB Network (Abstract). *Exp Hematol* 1997; 25: 827.
 17. Sirchia G, Contreras M, Garcia J, et al. Netcord: a model of network linking placental blood banks (Abstract). *J Hematother* 1997; 6: 371.
 18. Kögler G, Sarnowski A, Wernet P. Volume reduction of cord blood by Hetastarch for long term stem cell banking. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22 (Suppl 1): S14-S15.
 19. Gluckman E, Roche V, Chastang C and the Eurocord Group. European result of unrelated cord blood transplants. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21 (Suppl 3): S87-S91.
 20. Kögler G, Callejas J, Hakenberg P et al. Hematopoietic transplant potential of unrelated cord blood : critical issues. *J Hematother* 1996; 5: 105-6.
 21. Morales V.H. Células Hematopoyéticas de origen placentario. Consideraciones sobre su obtención y uso en trasplante. *Rev Arg Transf* 1998; 24: 171-5.
 22. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, et al. Processing and cryopreservation of placental / umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10119-22.
 23. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, and Chin Yee I. The ISHAGE Guidelines for CD34+ cells determination by flow cytometry. *J Hematother* 1996; 5: 213-26.
 24. Lamana M, Albella B, Rodriguez F, Regidor C, Bueren JA. Conclusions of a national multicenter intercompartive study of in vitro cultures of human hematopoietic progenitors. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 373-80.
 25. Fraser JK, Cairo MS, Wagner EL. et al. Cord Blood Transplantation Study (COBLT) : cord blood bank standard operating procedures. *J Hematother* 1998; 7: 521-61.
 26. Broxmeyer HE. Cord Blood Transplantation Study Standard Operating Procedures: an evolving document will improve cord blood unit quality. *J Hematother* 1998; 7: 479-80.
 27. ISHAGE and EBMT. Standars for blood and marrow progenitor cell processing, collection and trasplantation. 1998. Ed. The Joint Accreditation Committee of ISHAGE-Europe and EBMT-4th Edition.
 28. Broxmeyer HE, Gluckman E, Auerbach A. et al. Human umbilical cord blood : a clinically useful source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Int J Cell Cloning* 1990; 8 (Suppl 1): 76-91.
 29. Broxmeyer HE, Kurtzberg J, Gluckman E et al. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. *Blood Cells* 1991; 17: 313-29.
 30. Harris DT, Schumacher MJ, Rychlik S, et al. Collection, separation and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13: 135-43.
 31. Querol S, Cancelas JA, Canals C, et al. Comparative expansion of CD34+ immunoselected cells from bone marrow, mobilized peripheral blood and cord blood : effects of G-CSF and GM-CSF. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17 (suppl. 1): S51.
 32. Kohn DB, Weimbeg KI, Nolta JA, et al. Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med* 1995; 1: 1017-23.

Too much rest is rust.

Descansar demasiado es oxidarse.

Sir Walter Scott (1771-1832)