

## ESTUDIO IN VITRO DE PROGENITORES HEMOPOYETICOS DE SANGRE DE CORDON UMBILICAL HUMANO FRENTE A DIFERENTES CITOQUINAS Y SUERO AUTOLOGO

MERCEDES ALEMAN, CATALINA C. BIANCHI de DI RISIO

*Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires*

**Resumen** Con el fin de lograr la expansión celular de SCUH se realizaron cultivos de 19 muestras, determinándose número y tipo de progenitores hemopoyéticos, la capacidad de estos progenitores de proliferar por largos períodos y el poder estimulante del suero de cada muestra. En cada caso se efectuaron los siguientes ensayos: a) CD de CFU-GM, CFU-GEMM y BFU-E en MS de SCUH y MO enfrentados a CSF, suero de MO y suero de SCUH b) CLT de 35 días de duración en medio líquido, en presencia de (IL-3+CSF-GM+SCF) o SA. Cada 7 días se recogió la mitad del medio de cultivo y se agregó medio fresco y citoquinas. Las células cosechadas se cultivaron en MS evaluándose las colonias a los 10 días. *Resultados:* el promedio de CFU-GM de SCUH no difirió significativamente del de MO observándose un máximo de colonias al día 7 tanto con citoquinas como con SA, aunque con este último se mantuvieron niveles altos hasta el día 21. En 8 muestras se observó el desarrollo de colonias hasta el día 35; estos casos mostraron en CD valores superiores a los de MO. El suero de SCUH posee un elevado poder estimulante sobre la MO respecto de un estimulante no específico y también sobre SCUH, sólo que ésta presentó gran dispersión entre las muestras. *Conclusión:* 1) SCUH posee elevado número de progenitores hemopoyéticos existiendo gran dispersión entre las muestras, 2) los sueros poseen alto poder estimulante sin diferencias significativas entre ellos, 3) es posible inducir la expansión de estos progenitores por largos períodos con citoquinas o SA sin perder su potencialidad.

**Palabras clave:** progenitores hemopoyéticos, sangre cordón umbilical

Las células del sistema hematológico, luego de alcanzar la maduración fisiológica tienen vida limitada; por eso se requiere un continuo reemplazo de las mismas<sup>1</sup>. Este proceso llamado hematopoyesis, depende de la proliferación y diferenciación de un pequeño número de *Stem Cells* (o células troncales), con una elevada capacidad de autoperpetuación, que darán lugar a células pertenecientes a todos los linajes linfoides y mieloides ya que son totipotenciales. La hematopoyesis tiene lugar, en los humanos adultos en la médula ósea (MO), y órganos linfáticos. En los

primeros estadios de la embriogénesis en cambio, ésta tiene lugar en el saco vitelino, migrando y colonizando a lo largo del desarrollo embrionario hacia los distintos microambientes hemato-

----

### Glosario:

- SCUH: Sangre de cordón umbilical humano
- MO: Médula ósea normal
- CD: Cultivos directos
- MS: Medio semisólido
- CLT: Cultivo a largo término
- SA: Suero autólogo
- CFU-GM: Unidad formadora de colonias granulocíticas-macrofágicas.
- CFU-CEMM: Unidad formadora de colonias granulocíticas-eritrocíticas-megacariocíticas-macrofágicas.
- BFU-E: Unidad formadora de burst eritóide.
- IL-3: Interleuquina-3
- CSF-GM: Factor estimulante de colonias granulocíticas-macrofágicas.
- SCF: Factor estimulante de *Stem cell*

Recibido: 15-V-1996

Aceptado: 9-X-1996

**Dirección postal:** Lic. Mercedes Alemán, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Pacheco de Melo 3081, 1425 Buenos Aires, Argentina.

poyéticos (por ejemplo el hígado y el bazo), para finalmente establecerse en la MO, unos días antes del nacimiento<sup>2</sup>.

Los conocimientos sobre la ontogenia de la hematopoyesis, permitieron suponer que en sangre de cordón umbilical, existe un alto número de células inmaduras. Fue así, que en el año 1978, Fauser y Messner<sup>3</sup> publicaron el primer hallazgo sobre la presencia de progenitores hemopoyéticos en sangre de cordón umbilical humano (SCUH). Utilizaron para eso las técnicas de cultivo en medio semisólido, tanto para los progenitores granulocíticos macrofágicos (CFU-GM) como para los progenitores granulocíticos eritrocíticos monocíticos y megacariocíticos (CFU-GEMM). Estos ensayos son un buen indicador para determinar la presencia y el número de progenitores hematopoyéticos, ya que luego de 10 a 14 días de cultivo son visibles al microscopio invertido, colonias de células, maduras o no, provenientes de la división de un solo progenitor llamado: Unidad Formadora de Colonias (CFU).

En el año 1981, el equipo de Gallo<sup>4</sup> logra fraccionar y cultivar en medio líquido las células de SCU. Posteriormente, Nakahata y Ogawa<sup>5</sup>, demuestran que éstos poseen un alto potencial proliferativo, comparado con los equivalentes de MO, encontrándose más tarde que son aún más primitivos, dado que son capaces de producir células inmaduras en cultivos secundarios.

Por todo esto, y por la facilidad en su obtención, es que se ha considerado a la SCUH, como una alternativa a la MO para ser utilizadas en transplantes hematológicos. Fue así como en el año 1989, Gluckman y col.<sup>6</sup> realizan el primer trasplante con células de SCUH, en un paciente pediátrico que padecía Anemia de Fanconi.

Desde entonces la SCUH es usada con éxito en transplantes de niños, según la revisión realizada por Wagner y col.<sup>7</sup> en 1995. Sin embargo, la cantidad de células disponibles, no es suficiente para transplantes en adultos. Broxmeyer y col.<sup>8</sup>, en 1992, evaluaron la capacidad que posee cada muestra colectada, de colonizar la MO adulta y para esto, consideraron no sólo el número sino también el potencial de cada célula troncal progenitora.

El requerimiento de un alto número de progenitores puede ser compensado si las células de SCUH, tuvieran mayor capacidad de autorrenovación que las de MO, luego del trasplante, o

bien si las células de SCUH, pudieran ser inducidas para autorrenovarse *in vitro*, con el fin de aumentar el pool de *stem cells* disponibles para el trasplante.

Hown y col.<sup>9</sup> estudiaron la proliferación de los progenitores de SCU en cultivo en medio líquido, observando que éstos pueden mantener *in vitro* la hematopoyesis por mayores períodos que los de MO.

Con la esperanza de lograr la expansión de estas células *in vitro*, utilizando medios de crecimiento apropiados, con el agregado de diferentes estimulantes (CSF), interleuquinas (IL) o bien por el suero autólogo de cada muestra (SA), nuestros objetivos fueron:

- 1) determinar el número y tipo de progenitores presentes en SCUH;
- 2) analizar la capacidad de estos progenitores de proliferar por largos períodos en presencia de diferentes tipos de estimulantes,
- 3) evaluar la capacidad estimuladora del suero de cada muestra

## Material y métodos

### Obtención de sangre de cordón umbilical y médula ósea

Se estudiaron 19 muestras de SCUH, previa autorización materna. La sangre se obtiene con jeringas estériles y heparinizadas, luego de la expulsión placentaria, por transección de la vena umbilical. Las muestras son transportadas a temperatura ambiente y procesadas dentro de las 18-24 horas. En todos los casos la extracción de la muestra respetó el mismo protocolo, asegurándose además la realización por la misma persona.

Se estudiaron 9 muestras de MO normal, obtenidas bajo consentimiento, por punción del esternón o de cadera ilíaca, con jeringas estériles, heparinizadas.

En todos los casos se efectúa el recuento diferencial de las células nucleadas, en frotis teñidos utilizando la técnica de Giemsa.

Para la obtención del suero, se procede a su separación por centrifugación de la sangre coagulada a 400 g durante 15 minutos. Este será luego utilizado como estimulante, en los ensayos de cultivos semisólidos y líquidos.

### Separación de células mononucleares

La sangre es diluida 1:1, con Iscove's Dulbecco's Medium (IMDM, GIBCO). La fracción de baja densidad que contiene a las células mononucleares de SCUH y MO, se obtiene por separación en gradiente de Ficoll-Hypaque

(densidad 1.077 g/ml), centrifugando a 600 g durante 20 minutos. Se recogen las células de la capa intermedia y se lavan, se resuspenden en IMDM y se centrifugan a 300 g durante 15 minutos. Se repite el lavado una vez más con medio de cultivo y se procede luego al recuento de las células.

#### Cultivos directos en medio semisólido

Para el desarrollo in vitro de las CFU-GM se siembran 200.000 cél/ml, en 0,3% de agar, 20% suero fetal bovino (SFB), e IMDM, en cajas de Petri de 35 mm de diámetro por 10 mm de alto, en presencia de las citoquinas: Interleuquina 3 (rIL3 a la concentración de 20 ng/ml), Factor Estimulante de Colonias Granulocíticas-Macrofágicas (rCSF-GM a la concentración de 20 ng/ml) y Stem Cell Factor (rSCF a la concentración de 100 ng/ml). Se incuban a 37°C, en atmósfera saturada de humedad y CO<sub>2</sub> al 5%, analizando los cultivos a los 10 días, bajo microscopio invertido. Las agrupaciones de más de 40 células se consideran como colonias, mientras que aquellas de menos de 40 células se consideran como microcolonias<sup>10</sup>.

Para las CFU-GEMM y BFU-E, se siembran 200.000 cél/ml, en 0,8% de metilcelulosa, 20% SFB, 10% suero humano, o de cordón umbilical, 10% medio condicionado de leucocitos estimulados con fitohemaglutinina (PHA-CM), 1-2 U/ml de Eritropoyetina (EPO), y 0,001% 2-Mercaptoetanol. Se incuba a 37°C, en atmósfera saturada de humedad, y CO<sub>2</sub> al 5%, analizando los cultivos a los 14 días, bajo microscopio invertido.

#### Cultivos a largo término

De cada muestra se siembran 100.000 cél/ml en un caso y 200.000 cél/ml en otro, en frascos de 25 cm<sup>2</sup> de superficie de base, en un total de 6 ml de IMDM, 10% de SFB en presencia alternativamente de: IL-3+SCF+GM-CSF (que llamamos en las figuras, M1) y suero de la misma muestra (SA). Se incuba a 37°C en atmósfera saturada de humedad, y CO<sub>2</sub> al 5%. A los 7 días se extrae la mitad del medio con las células, y se realiza el recuento de éstas, reponiendo el medio, suero, y estimulantes correspondientes, a la vez que se efectúan cultivos en medio semisólido de las células extraídas, con el fin de poner en evidencia los tipos de progenitores presentes<sup>11</sup>.

Se repite este procedimiento cada siete días, durante cinco semanas, monitoreando el contenido celular bajo microscopio invertido y el número de colonias obtenidas de los cultivos en medio semisólido.

#### Ensayos con sueros diferentes

Para estudiar el poder de estimulación del suero de SCUH, se efectuaron cuatro ensayos, comparando:

1. Médula ósea normal (MO) + estimulante versus MO + suero de MO (sMO)
2. MO + estimulante versus MO + suero de SCUH (sSCUH)
3. MO + sMO versus MO + sSCUH
4. Cordón umbilical + estimulante versus cordón umbilical + sSCUH.

En todos los casos se siembran las células en cultivo directo en medio semisólido.

#### Métodos estadísticos

Test para muestras apareadas de Wilcoxon.

Análisis de univarianza para comparación entre grupos, de Kruskall Wallis.

#### Resultados

##### Obtención de SCUH

Se obtuvieron volúmenes de 10 ml aproximadamente, de cada muestra de SCUH. El número de células nucleadas tuvo una media de 9,6.10<sup>6</sup> células por mililitro y el número de células mononucleares recuperadas luego del fraccionamiento en gradiente fue de: 5,7.10<sup>6</sup> células por mililitro, lo que representa un 59,9% de recuperación celular.

##### Cultivo basal en medios semisólidos

La mediana de CFU-GM en los cultivos en agar es de 165 colonias, valor que está dentro de los valores que presentó la MO normal: 112(89-337). Sin embargo, la dispersión es mucho mayor, ya que el valor mínimo observado (5 colonias), nunca se presenta en una médula normal (Tabla 1).

##### Cultivos a largo término

La figura 1A muestra el número de células recuperadas a los 7, 14, 21, 28 y 35 días a partir del día 0, donde se sembraron 200.000 células/ml, en presencia de citoquinas (M1) o bien SA. Si bien el recuento de células fue bajo al día 7, éste aumenta hacia el día 21 en presencia de citoquinas.

Los valores máximos de colonias (Fig. 1B) se observan al día 7, en presencia tanto de citoquinas como de SA, donde se mantienen niveles altos de colonias hasta el día 21.

TABLA 1.— *Cultivo basal en agar y metilcelulosa de sangre de cordón umbilical humano*

| Número de pacientes | AGAR<br>CFU-GM | CFU-GM        | METILCELULOSA<br>CFU-GEMM | BFU-E        |
|---------------------|----------------|---------------|---------------------------|--------------|
| 19                  | 165 (5 - 526)  | 94 (18 - 195) | 2 (0 - 120)               | 52 (2 - 270) |

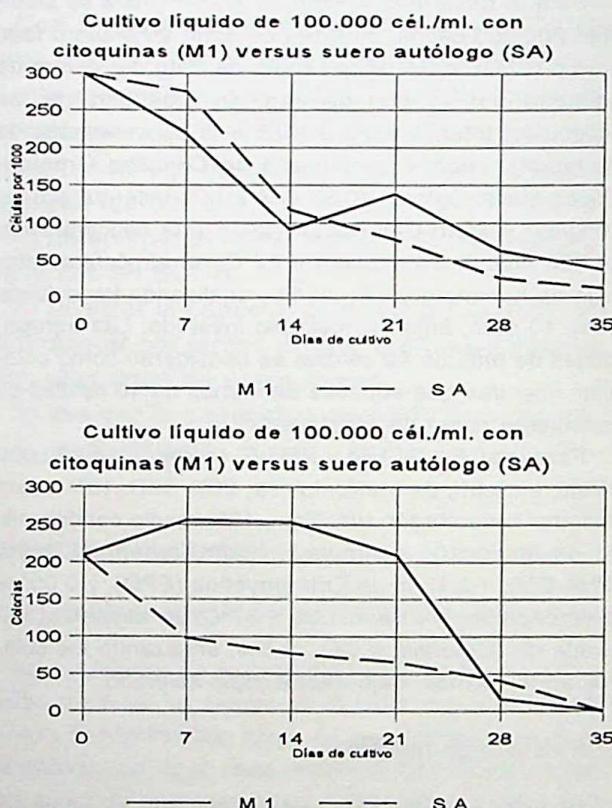
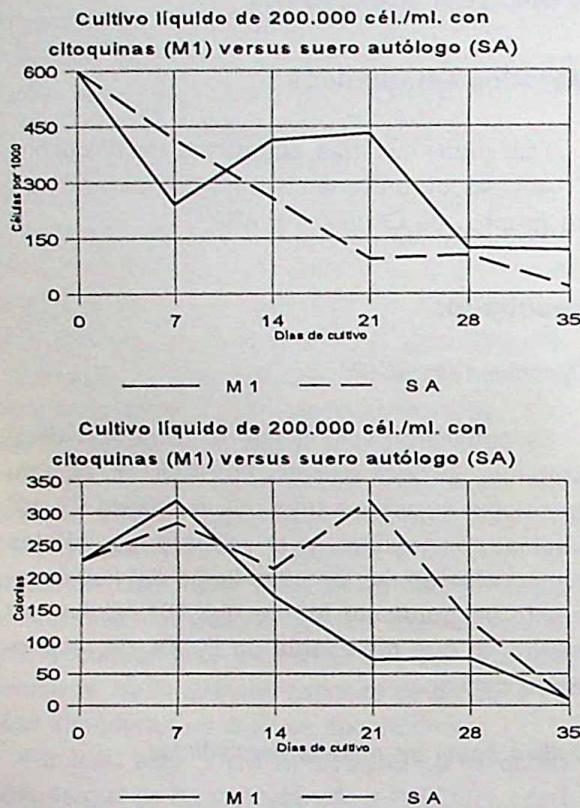


Fig. 1.

Fig. 2.

Para comprobar que la disminución en el número de células en suspensión al día 7 se debía posiblemente a una disminución de los nutrientes por un exceso de células sembradas, se procedió a realizar el mismo protocolo, pero sembrando al día 0, 100.000 células/ml (Fig. 2). Efectivamente, el efecto competitivo desapareció al día 7,

observándose una cierta disminución en el día 14 en el recuento de células, mientras que el número de colonias permanecía elevado en presencia de M1 y bajo en presencia de SA.

Ocho pacientes desarrollaron colonias hasta el día 35 de cultivo en medio líquido (Tabla 2), los mismos que en cultivo directo mostraron un pro-

TABLA 2.— *Resultados de ocho SCUH cuyos cultivos dieron colonias hasta el día 35*

| Número de casos | AGAR<br>CFU-GM   | CFU-GM           | METILCELULOSA<br>CFU-GEMM | BFU-E          |
|-----------------|------------------|------------------|---------------------------|----------------|
| 8               | 50 < 254,7 < 526 | 67 < 118,6 < 195 | 0 < 20 < 120              | 4 < 86,5 < 270 |

medio de CFU-GM de 254,7 (valor que es superior a la mediana de todos los casos estudiados, que es de 165).

#### Ensayos con suero autólogo

En la Fig. 3 se comparan diferentes grupos, analizando la significación entre ellos:

1) Cuando se comparó la MO estimulada con factores estimulantes de colonias (media: 259,8) versus MO estimulada con su correspondiente

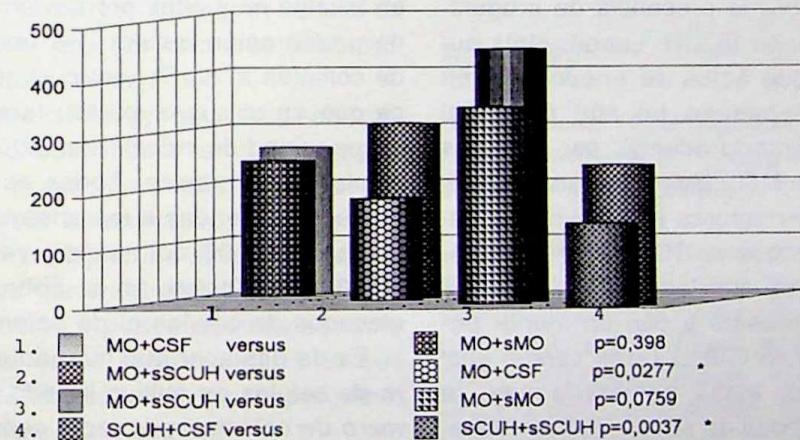
suero (sMO): (media: 231,4), no hubo diferencia significativa,  $p: 0,398$ .

2) Cuando se comparó la MO estimulada con factores estimulantes de colonias (media: 169) versus MO estimulada con suero de SCUH (sSCUH) : (media: 296,3), se observó que existía diferencia significativa,  $p: 0,0277$ .

3) Cuando se comparó la MO estimulada con sMO (media: 336) versus MO estimulada con sSCUH (media: 418,8), no se observó diferencia significativa,  $p: 0,0759$ .

### Ensayos con sueros en médula ósea y sangre de cordón umbilical humano.

#### Comparación entre grupos: p



#### Referencia abreviaturas:

MO : Médula ósea humana.  
sMO : Suero de médula ósea.  
sSCUH: Suero de sangre de cordón umbilical humano.

CSF : Factores estimulantes de colonias.  
SCUH : Sangre de cordón umbilical humano.

\* : Diferencia significativa.

Fig. 3.

TABLA 3.— Análisis de univarianza de MO y SCUH frente a sueros de SCUH

|      | Número | Número promedio de colonias | Varianza | Desvió standard | Error standard |
|------|--------|-----------------------------|----------|-----------------|----------------|
| MO   | 14     | 99,3                        | 2150,4   | 46,4            | 12,4           |
| SCUH | 13     | 362,3                       | 11491,7  | 107,2           | 29,7           |

4) Cuando se comparó SCUH estimulado con factores estimulantes de colonias (media: 223,5) versus SCUH estimulada con sSCUH (media: 114,4), se observó que existía diferencia significativa,  $p: 0.0037$ .

Con el análisis de univarianza para comparación entre grupos, de Kruskall Wallis, (T3) se observa que los valores de los ensayos de SCUH estimulados con suero autólogo presentan una gran dispersión, hecho que no ocurre con MO en las mismas condiciones, lo que indica la existencia de una gran variabilidad entre cada muestra de SCUH.

## Discusión

En el año 1978, Fauser y Messner<sup>3</sup> publican el primer trabajo sobre la presencia de progenitores hemopoyéticos en SCUH. Luego, otros autores demuestran que éstos se encuentran en número elevado, y poseen un alto potencial proliferativo<sup>5</sup>, encontrando además ser aún más primitivos que los de MO, dado que son capaces de generar células inmaduras en cultivos secundarios. Hoy se sabe que la SCUH, contiene células T más primitivas que las de MO, con alta actividad Helper-Supresora y con un menor potencial de inducción de GVHD (*graft versus host disease*). Por todas estas características, la SCUH tiene la capacidad de ofrecer menor rechazo en transplantes alogeneicos.

Debido a la poca cantidad de sangre recuperada de la placenta, se ha considerado la posibilidad de aumentar el pool de células progenitoras transplantables, de manera tal de poder realizar el transplante en individuos adultos. Para esto, se han ideado cultivos a largo término en medio líquido<sup>9</sup>, con el fin de inducir un aumento en el número de estos progenitores.

Carow y Broxmeyer<sup>13</sup> en el año 1993, demuestran que el plasma de SCUH, produce un aumento en la capacidad de replaquéo. Observan además que ejerce un efecto estimulatorio en cultivos de SCUH mayor que en los de MO y que el efecto producido por dicho plasma es mucho mayor que el de las citoquinas involucradas en la hematopoyesis. Por otro lado Traycoff y col<sup>14</sup>, estudian el efecto del plasma de SCUH sobre la progresión del ciclo celular de las células CD34+ HLA DR+, sea de SCUH como de MO. En SCUH observan,

que en presencia de 10% de plasma y de SCF, éste ejerce un efecto sinérgico produciendo la salida de la fase G0/G1 mucho más rápidamente que al incubar solamente con SCF, mientras que en MO estas respuestas no son tan significativas.

En este trabajo observamos que el número de colonias desarrolladas en medio semisólido de progenitores presentes en SCUH se aproxima al de MO si bien las colonias obtenidas de SCUH están constituidas por un número mayor de células, lo cual indicaría que se originarían de progenitores más inmaduros.

En los cultivos líquidos (Fig. 1 y 2) observamos que el suero extraído de SCUH estimula la proliferación de los progenitores de igual manera que las citoquinas utilizadas, lo cual evidenciaría que en el suero existirían factores estimulantes en niveles muy altos promoviendo así una elevada proliferación celular. Se observa un máximo de colonias al día 7, y otro al día 21, lo que indica que en el suero existen factores que poseen la capacidad de inducir aumento en el número de células progenitoras. Todas estas consideraciones están referidas a los ensayos donde se sembraron 200.000 células/ml, ya que al sembrar 100.000 células/ml, no se obtuvieron valores tan elevados de células ni de colonias.

Es de destacar que cuando aumenta el número de células en cultivo líquido, disminuye el número de colonias en medio semisólido y viceversa. Pensamos que este hecho sería debido a la menor disponibilidad de nutrientes en el medio cuando la concentración celular se hace muy elevada, por ejemplo al sembrar 200.000 células/ml, causando un freno en la proliferación de progenitores, que se traduciría en un menor número de colonias desarrolladas. Obsérvese la disminución en el número de células que se produce en la primera semana. En cambio, al sembrar 100.000 células/ml, la concentración celular no se ve tan afectada.

El suero de SCUH tiene un elevado poder estimulador en cultivos de MO y de SCUH que es superior a los factores estimulantes de colonias exógenos utilizados por nosotros. Sin embargo, en presencia de suero de un dador normal el poder estimulador no difiere significativamente, lo cual podría deberse a que el suero de SCUH no se utilizó en forma inmediata y debió congelarse, desactivándose así los factores estimulantes presentes

en él. Además, de cultivos directos en metilcelulosa para colonias de CFU-GEMM en presencia de suero fresco de SCUH, se obtuvieron bursts con mayor hemoglobinización que los correspondientes cultivados con sueros no frescos, lo cual indicaría que en estas últimas la Epo podría haberse desactivado (datos no consignados).

El análisis de univarianza muestra que el número de colonias obtenidas en SCUH estimulada con suero autólogo (SA) presenta una gran dispersión, lo que no ocurre con MO en las mismas condiciones. Esto sería debido a la existencia de una gran variabilidad entre las muestras de SCUH y no a diferencias en el potencial estimulador de los sueros. Se descarta diferencias en la calidad de las muestras ya que, como se dijo anteriormente, éstas fueron colectadas con el mismo cuidado y con los mismos recaudos y además en la separación en gradiente, se obtuvieron valores de recuperación celular que normalmente encontramos en nuestro laboratorio.

El análisis *in vitro* de los progenitores hemopoéticos, permite conocer más a fondo el comportamiento de esta población celular, que por las características antes enumeradas, ha sido utilizada con éxito en transplantes alogeneicos<sup>6, 7, 12</sup>. Esta sangre que es generalmente descartada, es de muy fácil obtención y puede además ser congelada sin pérdida de su potencialidad<sup>15</sup>, lo que llevó a iniciar el establecimiento de un programa de reserva de sangre de placenta<sup>16</sup>.

Los ensayos presentados en este trabajo evocan sin embargo que existe una gran variabilidad entre las muestras de SCUH en cuanto al número de colonias que desarrollan *in vitro*, teniendo en algunos casos un desarrollo nulo. ¿Se podría en tal caso creer que estas muestras no ofrecen suficientes progenitores para ser transplantados? Por otra parte, observamos que aquellas muestras que poseen un alto desarrollo de colonias, mantienen la hematopoyesis en medio líquido por mucho tiempo, lo que indicaría que el pool de progenitores presentes poseería un alto potencial proliferativo. ¿Son éstas las muestras que deben tenerse en cuenta? Será necesario en todo caso conocer la relación que existe entre estos factores y el restablecimiento del paciente transplantado.

Vimos también que es posible aumentar el número de células en cultivo líquido, y que sobre la expansión de las células, el suero de SCUH tie-

ne un efecto importante, aún hasta el día 21 de cultivo. Este elevado poder de estimulación se observa también sobre el desarrollo de las colonias.

Como conclusión final podemos afirmar que es posible obtener *in vitro* expansión de células de sangre de cordón umbilical humano, lo cual permitiría disponer de mayor número de progenitores, en los casos en que fueran necesarios para el trasplante en adultos.

**Agradecimientos:** El factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (Neupogen) fue facilitado gentilmente por Schering Plough. Se agradece a la Lic. María Teresa Santarelli su colaboración en la realización de los análisis estadísticos y la colaboración del Prof. Angel Fausto Di Risio por su ayuda en la confección de los gráficos y tablas, y por sus valiosos consejos.

## Summary

*In vitro study of hemopoietic progenitors in human umbilical cord blood treated with different cytokines and autologous serum*

The aim was to obtain the *ex vivo* expansion of human umbilical cord blood (HUCB) cells. A total of 19 samples were assayed to evaluate the number and type of hemopoietic progenitor cells, their proliferating capacity and the stimulating potency of cord blood serum. **Methods:** a) CFU-GM, CFU-GEMM and BFU-E cultures in the presence of CSF, BM serum or HUCB serum; b) 35 day LTC in liquid media whether in presence of IL-3+GM-CSF+SCF or autologous serum (AS). Cells were demidepopulated at 7-day intervals and fresh medium and cytokines were added. Harvested cells were cultured in bone marrow (BM)/SM and colonies were evaluated after 10 days. **Results:** The mean number of CFU-GM was similar to BM values; the maximum number of colonies was observed at day 7 and remained high until day 21 whether in addition of cytokines or AS. A total of 8 samples gave rise to colonies up to day 35; these samples showed higher values than BM in SM; HUCB serum has a great stimulating effect on BM cells and HUCB cells compared with nonspecific stimulating factors; moreover, HUCB showed a large dispersion. **Conclusion:** 1) HUCB contains a high number of hemopoietic progenitor cells with a large dispersion coefficient, 2) HUCB plasma has a great stimulatory capacity, 3) it is possible to induce the expansion of HUCB progenitors in LTC either in

the presence of cytokines or of AS without loss of potency.

## Bibliografía

1. Wheton AD, Dexter TM. Haemopoietic growth factors. *Trends Biochem Sci* 1986; 11: 207-11.
2. Moore MAS, Metcalf D. Ontogeny of haematopoietic system, yolk sac origin of the in vivo and in vitro colony forming cell in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* 1970; 18: 279-96.
3. Fauser AA, Messner HA. Granuloerythropoietic colonies in human bone marrow, peripheral blood and umbilical cord blood. *Blood* 1978; 52: 1243-8.
4. Zaki Salahuddin BS, Markham PD, Ruscetti FW, Gallo RC. Long term suspension cultures of human cord blood myeloid cells. *Blood* 1981; 58: 931-7.
5. Nakahata T, Ogawa M. Hemopoietic colony forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono and multipotential hemopoietic progenitors. *J Clin Invest* 1982; 70: 1324-8.
6. Gluckman E, Broxmeyer HE. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi anemia by means of umbilical cord blood from HLA identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321: 1174-8.
7. Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M, et al. Allogeneic sibling umbilical cord blood transplantation in children with malignant and non malignant disease. *Lancet* 1995; 346: 214-9.
8. Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 4109-13.
9. Hous JM, Bradley BA, Testa NG, Dexter TM. Growth of human umbilical cord blood in long term hemopoietic cultures. *Lancet* 1992; 340: 7376-80.
10. Messner HA. Properties of human pluripotent hemopoietic progenitors. *Blood Cells* 1980; 6: 595.
11. Durand B, Migliaccio G, Yeens Eddleman K, Adamson JW. Long term of human mast cells in serum free cultures of CD34+ cord blood cells stimulated with SCF and interleukin-3. *Blood* 1994; 84: 3667-74.
12. Vanlemmens P, Pouvier E, Amsalem D, Herve P. Transplantation of umbilical cord blood in neuroblastoma. *Nouv Rev Fr Hemat* 1992; 34: 243-6.
13. Carow CE, Hangoc G, Broxmeyer HE. Human multipotential progenitor cells (CFU-GEMM) have extensive replating capacity for secondary CFU-GEMM: an effect enhanced by cord blood plasma. *Blood*, 1993; 81: 942-8.
14. Taycoff CM, Abbond MR, Laver J, et al. Rapid exit from Go/G1 phases of 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: 1264-72.
15. Palmares MC, Mariz JM, Mendes C, et al. The effects of cryopreservation on the mononuclear cell population of umbilical cord blood. *Exp Hematol* 1995; 23: 912.
16. Bertolini F, Lazzari L, Corsini C, et al. Establishment of a placental blood program. *Exp Hematol* 1995; 23: 910.

-----

*Donde no hay libros hace frío. Vale para las casas, las ciudades, los países. Un frío de cataclismo, un páramo de amnesia.*

María Elena Walsh