

Evaluación de proteínas relacionadas con la diferenciación de células madre hematopoyéticas CD34+ obtenidas de sangre de cordón umbilical

Evaluation of proteins related to the differentiation of CD34+ hematopoietic stem cells from the umbilical cord

Dra. Ivonne Flechas ^I; MSc. Dra. Claudia Mera ^{II}; Dra. Lina Vargas ^I; MSc. Dra. Viviana Marcela Rodríguez Pardo ^I

^I Laboratorio de Hematología. Grupo de Investigación Inmunobiología y Biología Celular. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

^{II} Grupo de Ingeniería Biomédica. Facultad de Ingeniería Mecánica. Universidad de Los Andes. Colombia.

RESUMEN

La sangre de cordón umbilical es una alternativa para el aislamiento y cultivo de células madre hematopoyéticas CD34+, útiles en terapias de reemplazo medular en el tratamiento de patologías neoplásicas y no neoplásicas. En este trabajo se evalúa la expresión de proteínas relacionadas con la diferenciación de células madre hematopoyéticas CD34+ en cultivo. Las muestras de sangre de cordón fueron recolectadas en bolsas con CPDA (Baxter®) y transportadas al Laboratorio de Hematología de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana. El aislamiento de las células madre hematopoyéticas CD34+ se realizó mediante el uso del sistema Miltenyi biotec Microbeads® a partir de células mononucleares obtenidas por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque Amershan Biosciences®. Las células CD34+ se cultivaban en medio Stem Pro® suplementado con IL3, SCF y GM-CSF entre 5 y 11 días a 37 °C y 5 % CO₂. Se determinó la viabilidad celular, cambios morfológicos por microscopía invertida y la expresión de las proteínas CD34, CD33 y CD38, así como Bcl-2 y CD95 por medio de citometría de flujo. Se establecieron 6 (n=6) cultivos enriquecidos con células hematopoyéticas CD34+, con un promedio de viabilidad del 84,25 % y tiempo de cultivo entre 5 y 11 días. En la evaluación morfológica se observó la aparición de prolongaciones citoplasmáticas o pseudópodos tipo *magnupodia* hasta el día 7 de cultivo. Se observó la co-expresión de los antígenos CD34 y CD33, con un aumento a partir del día 7 de la proteína CD95. Las células madre hematopoyéticas CD34+ obtenidas de sangre de cordón umbilical presentan prolongaciones citoplasmáticas posiblemente

relacionadas con interacciones célula a célula. En nuestro sistema de cultivo, las células madre hematopoyéticas obtenidas inician procesos de diferenciación mieloide que se relacionan indirectamente con la expresión de Bcl-2 y CD95.

Palabras clave: células madre hematopoyéticas, citometría de flujo, cordón umbilical, cultivo celular, médula ósea.

ABSTRACT

Blood from the umbilical cord is an alternative for the isolation and culture of CD34+ hematopoietic stem cells useful for bone marrow replacement therapy in the treatment of neoplastic and nonneoplastic pathologies. The expression of proteins related to the differentiation of CD34+ hematopoietic stem cells under culture was evaluated in this paper. The blood samples from the umbilical cord were collected in bags with CPDA (Baxter®) and transported to the Hematology Laboratory of the Faculty of Sciences of the Pontificia Universidad Javeriana. The isolation of the CD34+ hematopoietic stem cells was carried out by using the Miltenyi biotec Microbeads® system starting from mononuclear cells obtained by density gradient with Ficoll-Hypaque Amershan Biosciences®. The CD34+ cells were cultured in Stem Pro® medium supplemented with IL3, SCF and GM-CSF between 5 and 11 days at 37° C and CO2 5 %. Cellular viability was defined. The morphological changes were determined by inverted microscopy, whereas the expression of the CD34, CD33 and CD38 proteins, and of Bcl-2 and CD95 was identified by flow cytometry. 6 cultures (n=6) enriched with CD34+ hematopoietic cells were established, with a viability average of 84.25 % and a culture time from 5 to 11 days. In the morphological evaluation, it was observed the appearance of cytoplasmic prolongations or magnupodia-like pseudopodes until the seventh day of culture. The coexpression of the CD34 y CD33 antigens with an increase of CD95 protein from the seventh day on was observed. The CD34+ hematopoietic stem cells taken from the blood of the umbilical cord presented cytoplasmic correlations that were possibly associated with cell to cell interactions. In our culture system, the obtained hematopoietic stem cells initiated processes of myeloid differentiation that were indirectly related to the expression of Bcl-2 and CD95.

Key words: hematopoietic stem cells, flow cytometry, umbilical cord, cellular culture, bone marrow.

INTRODUCCIÓN

Durante 40 años las células madre hematopoyéticas (CMH) han sido utilizadas como alternativa terapéutica en enfermedades hematológicas desde que fueron descritas por *Ernest Mc Cullouch* y *James Till* en 1963.^{1,2} Estas células pueden ser obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical (SCU), médula ósea (MO) o sangre periférica movilizada (SPM). La MO siempre ha sido considerada como la principal fuente de estas células, sin embargo, su uso en trasplantes es limitado debido a la estrecha compatibilidad que debe existir entre paciente receptor y donante para evitar el desarrollo de la enfermedad injerto-vs-hospedero (EICH). Contrario a la médula ósea, las CMH de SCU pueden ser empleadas en trasplantes alogénicos con

mayor disparidad entre las moléculas HLA del donante y el receptor sin aumentar el riesgo de desarrollar EICH. ³ Los progenitores hematopoyéticos de sangre de cordón también pueden ser utilizados en pacientes con alotipos de HLA poco frecuentes, en minorías étnicas ó en trasplantes de alta prioridad que no cuentan con donantes relacionados disponibles; ⁴ además, la recolección de SCU es fácil y puede ser obtenida de donantes autólogos, relacionados ó no relacionados. ^{5,6}

Aunque estudios en animales muestran que las CMH de SCU son más eficientes en regeneración medular que sus homólogas de MO, ⁷ a partir de sangre de cordón se puede aislar aproximadamente 1×10^6 células CD34+; un número muy reducido para restablecer ó remplazar la actividad hematopoyética medular de un individuo adulto, si se tiene en cuenta que es necesario trasplantar en promedio 2.5×10^6 células CD34+/Kg PC (peso corporal); ⁸ por este motivo se han desarrollado durante los últimos 20 años diferentes sistemas de expansión celular con el fin de incrementar el número de progenitores hematopoyéticos obtenidos de SCU, ⁹ utilizando diferentes combinaciones de citocinas que inhiben la apoptosis, inducen mitosis y evitan la diferenciación celular. Además se han estudiado otros aspectos relacionados con las condiciones de cultivo como densidad celular, enriquecimiento con poblaciones particulares de progenitores y la periodicidad en el intercambio del medio de cultivo. ^{10,11}

Aunque los sistemas de cultivo desarrollados muestran un incremento en el número de las CMH *in vitro*, el uso de sistemas enriquecidos con citocinas inducen en las células madre hematopoyéticas la producción de proteínas reguladoras y/ó inhibitoras como las supresoras de señalización de citocinas (SOCS, del inglés *suppressors of cytokines signalling*), ¹² que son conocidas por suprimir la señal dependiente de citocinas como SCF (*stem cell factor*), Flt-3 (*Fms-related tyrosine kinase 3 ligand*), IL-3 (*interleucina-3*) y TPO (*trombopoyetina*). ¹³ Una vez estas proteínas actúan, las células madre hematopoyéticas pueden iniciar *in vitro* programas de señalización relacionados con diferenciación celular, por ejemplo, induciendo la activación de genes relacionados con la diferenciación mieloide como PU.1 o linfoide como Pax5; ¹⁴ además pueden iniciar la activación de proteínas relacionadas con apoptosis que también están relacionadas con procesos de diferenciación celular; ¹⁵ por esta razón es importante evaluar la expresión de proteínas relacionadas con la diferenciación de células madre hematopoyéticas cuando se utilizan medios suplementados con citocinas, especialmente si se desea estudiar la biología de progenitores celulares muy primitivos. En este trabajo evaluamos en cultivos enriquecidos con células madre hematopoyéticas CD34+ posibles cambios morfológicos, expresión de proteínas relacionadas con linaje mieloide (CD33) y linfoide (CD38) y los niveles de las proteínas Bcl-2 y CD95 con la finalidad de establecer el efecto de las citocinas utilizadas en nuestro protocolo sobre la diferenciación de células CD34+ obtenidas de SCU; para optimizar un sistema de expansión que nos permita mantener durante prolongados periodos de tiempo células madre hematopoyéticas indiferenciadas y así establecer en un futuro cercano protocolos que nos faciliten estudiar en profundidad los mecanismos que controlan la autorrenovación celular y diferenciación de este grupo de células madre.

MÉTODOS

Las muestras de sangre de cordón umbilical se obtuvieron a partir de mujeres entre 18 y 37 años de edad en estado de gravidez normal a término (38-40 semanas de gestación) que asistían al servicio de Ginecoobstetricia del Hospital Universitario San Ignacio y Hospital Occidente de Kennedy (Bogotá, Colombia) y que cumplieran con los criterios de inclusión de edad (mayores de 18 años), participación voluntaria con aceptación y firma del consentimiento informado para la donación

voluntaria de sangre de cordón y marcadores negativos para agentes infecciosos (según datos historia clínica). Las muestras de sangre de cordón se recolectaron en bolsas con CPDA (Baxter®) y transportaron al Laboratorio de Hematología de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana. El aislamiento de la células madre hematopoyéticas CD34+ se realizó mediante el uso del sistema Miltenyi biotec Microbeads® utilizando 100 μ L de Anti CD34 Microbeads® por cada 10×10^7 de células mononucleares obtenidas por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque Amershan Biosciences®. Se determinó la pureza de la población celular obtenida mediante citometría de flujo con 10 μ L de Anti CD34PE (BD® 348057). Las células CD34+ se sembraron en placas de 24 pozos (promedio $3-5 \times 10^5$ células / mL) en medio de cultivo Stem Pro® suplementado con IL3 (20 ng), SCF (40 ng) y GM-CSF (20 ng) entre 5 y 11 días a 37 °C y 5 % CO₂. Cada 24 horas se calculó el porcentaje de viabilidad celular con azul tripano. La evaluación de los cambios morfológicos de las células se realizó directamente en placa de cultivo mediante el registro fotográfico con cámara digital OLYMPUS D-540 CAMEDIA en microscopio invertido OLYMPUS CK2. Las proteínas relacionadas con diferenciación celular fueron determinadas en el citómetro de flujo FACS Calibur BD® mediante el software Cell Quest Pro®; para esto, cada 48 horas se obtenía una alícuota de 10 000 células del cultivo a partir de la cual se evaluaba la expresión de las proteínas CD34 (Anti-CD34 PE, BD® 348057), CD33 (Anti-CD33 APC, BD® 340474) y CD38 (Anti-CD38 FITC, BD® 340927). Para la medición de las proteínas Bcl-2 (anti-Bcl-2 PE, BD® 340575) y CD95 (anti-CD95 APC, BD® 340841) se utilizó una alícuota de 20 000 células, previa fijación con PBS1x - paraformaldehído 0,1% y permeabilización con BD FACS Permeabilizing Solution®. Para evaluar la expresión de las proteínas detectadas por citometría de flujo, se calculó el Índice Medio de Fluorescencia (IMF) que corresponde a la división de la media geométrica de fluorescencia de la muestra problema sobre la media geométrica de fluorescencia del control negativo y/o control de isotipo.¹⁶

En el desarrollo de este estudio se consideró la normatividad ética enunciada en la resolución 008430 capítulo IV de 1993 expedida por el Ministerio de Salud sobre "la investigación en mujeres en edad fértil, embarazadas, durante el trabajo de parto, puerperio, lactancia y recién nacidos; de la utilización de embriones, óvulos y fetos y de la fertilización artificial". La participación de los pacientes en este estudio fue voluntaria y sin ánimo de lucro. Los participantes recibían un consentimiento donde se explicaba de forma clara y precisa el objetivo de la toma de muestra de sangre de cordón umbilical. Éste consentimiento informado fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana.

Mediante la prueba de Shapiro-Wilk se determinó la normalidad de los datos en cada uno de los días de cultivo (11 días), mostrando que la expresión de las proteínas CD34, CD33 y Bcl-2 presentaron una distribución normal ($p > 0.05$), contrario a las proteínas CD38 y CD95 ($p < 0.05$). Por esto para las proteínas con distribución normal se aplicó una prueba de ANOVA y para CD38 y CD95 se utilizó la prueba de Kruskal Wallis en el programa Statistix 6.0.

RESULTADOS

A partir de 10 muestras de sangre de cordón umbilical, se logró el establecimiento de 6 cultivos enriquecidos con células CD34+ (porcentaje de enriquecimiento $> 60\%$) ([tabla](#)).

El promedio del porcentaje de viabilidad celular de los cultivos durante el periodo de tiempo evaluado fue en promedio 84.25% ([fig. 1](#)). A partir del día tres⁽³⁾ de

cultivo, se observó la aparición de prolongaciones citoplasmáticas en los cultivos enriquecidos con células CD34+, que fueron advertidas hasta el día 7 ([fig. 2](#)).

La expresión de las proteínas relacionadas con la diferenciación de las células CD34+, se determinó mediante el cálculo del índice medio de fluorescencia (IMF) según *Maurillo* y colaboradores. La expresión del antígeno CD34 fue constante hasta los 7 días de cultivo (IMF=2,06+/-0,48), luego disminuyó su expresión entre los días 9 y 11 (IMF=1,32+/-0,22 y IMF=0,66+/-0,06, respectivamente), observándose diferencias estadísticamente significativas para este antígeno ($p=0,0235$) ([fig. 3](#)).

La expresión de CD33 fue mayor al día 7 de cultivo (IMF=7,29+/-1,75) presentando diferencias significativas entre los días evaluados ($p=0,0339$) ([fig. 4](#)), mientras que para el antígeno CD38 no se observaron diferencias estadísticamente significativas en su expresión durante 11 días de cultivo ($p=0,1848$) ([fig. 5](#)). La mayor expresión de la proteína Bcl-2 fue al día 5 de cultivo (IMF=14,42+/-2,07), con una disminución a partir del día 7 (IMF=10,86+/-1,48) aunque no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los días de cultivo ($p=0,2350$) ([fig. 6](#)); para el antígeno CD95, el incremento más importante fue al día 7 (MIF=4,62+/-0,69) con diferencias significativas entre los días evaluados ($p=0,0059$) ([fig. 7](#)). Las poblaciones de células CD33+ y CD38+ a partir de CD34+ se distribuyeron en su mayoría como precursores mieloides (CD34+/CD33+) durante el tiempo de análisis.

DISCUSIÓN

El microambiente donde se desarrollan las células madre hematopoyéticas genera señales que están involucradas en el mantenimiento del balance entre la autorenovación y la diferenciación de estas células.¹⁷ La mayoría de los sistemas de expansión *in vitro* para células madre hematopoyéticas buscan aumentar su número, sin considerar que los medios suplementados con citocinas también pueden inducir la diferenciación de las células con la consecuente pérdida de la pluripotencialidad o generar cambios morfológicos que pueden alterar el comportamiento o fenotipo *in vitro*. Se ha demostrado que las células madre hematopoyéticas, en medios suplementados con citocinas, pueden presentar dos tipos diferentes de prolongaciones citoplasmáticas: 1) *Tenupodiaseudopods* (Ts) o prolongaciones delgadas, que pueden presentar bifurcaciones y conectar células vecinas a una distancia aproximada de 300um; y 2) *Magnupodiaseudopods* (Ms) o prolongaciones gruesas, que son un poco más flexibles y tienen la capacidad de contraerse y retractarse en segundos.¹⁸ Aunque aún no es claro el papel biológico de dichas prolongaciones, estudios muestran que pueden estar estrechamente relacionadas con la movilización fisiológica de estas células entre diferentes nichos *in vivo*,¹⁹ o como mecanismo de supervivencia *in vitro* que procura el contacto célula a célula. En nuestro estudio, encontramos que bajo el sistema de cultivo establecido, se pueden observar prolongaciones citoplasmáticas a partir del día 3 que posiblemente corresponden a seudopodos tipo Ms, sin embargo, es importante tener en cuenta que un porcentaje de las células CD34+ derivadas de sangre de cordón umbilical son precursores endoteliales y estas proyecciones citoplasmáticas también podrían ser atribuidas a esta población celular.^{20, 21} Esperamos que mediante el establecimiento de sistemas de co-cultivo entre células madre hematopoyéticas y células madre mesenquimales evaluadas por microscopía confocal, podamos dilucidar el posible papel biológico de los seudópodos observados.

Una vez establecida la combinación de citocinas para la expansión de células madre hematopoyéticas, es importante evaluar si el sistema provee las señales para el

mantenimiento de la autorrenovación o si por el contrario el medio de cultivo induce en las células madre procesos de diferenciación celular. Nosotros evaluamos la expresión de antígenos de aparición temprana tipo mieloide (CD33) y linfocítico (CD38) y las proteínas Bcl-2 y CD95 sobre células CD34+ con la finalidad de evaluar posibles cambios fenotípicos inducidos por el sistema de cultivo implementado (IL3: 20ng, SCF: 40ng y GM-CSF: 20ng). Durante los días de cultivo, la población de células CD34+ aumentó la expresión del antígeno CD33 en ausencia de CD38, mostrando una prevalencia de precursores de tipo mieloide especialmente en el día 7. Estos resultados se relacionan con otros trabajos que muestran que en el último trimestre de gestación se presenta un aumento en el número de células CD33+ en SCU; ²² de forma similar, *D'Arca* y colaboradores muestran que el fenotipo de las células madre en sangre de cordón es muy heterogéneo, aunque la mayoría son de linaje mieloide CD33+/CD13+. ²³ Es importante tener en cuenta que en nuestro sistema de cultivo utilizamos GM-CSF; esta citosina puede inducir la proliferación de células CD34+ durante los primeros días de cultivo pero posiblemente, de manera simultánea, también favorece el compromiso de la población CD34+ hacia linaje mieloide disminuyendo su pluripotencialidad. Otras proteínas importantes en la evaluación indirecta de la diferenciación de las células madre hematopoyéticas *in vitro* son Bcl-2 y CD95. Desde 1998, *Peters* y colaboradores muestran que la expresión de Bcl-2 está inversamente relacionada con procesos de diferenciación en precursores hematopoyéticos; ²⁴ de manera similar, *Alenzi* y colaboradores ¹⁵ demostraron que la vía de señalización Fas/FasL (CD95/CD95L) inhibe la proliferación y promueve la diferenciación celular. Se observó que la mayor expresión del antígeno CD33 (día 7 de cultivo) coincide con la disminución de la expresión de Bcl-2 y el incremento de CD95 en las células CD34+, lo que podría mostrar que en el sistema de cultivo que establecimos, las proteínas Bcl-2 y CD95 generalmente asociadas con apoptosis, también pueden ser consideradas como marcadores indirectos de diferenciación celular. Es importante tener en cuenta que los cultivos establecidos en este estudio son enriquecidos con células CD34+, por lo tanto contábamos con una población de células CD34 negativas que podrían influir en los procesos de diferenciación celular y/o proliferación de las células CD34+ mediante la secreción de proteínas reguladoras negativas como TGF- β 1 y MIP-1a. ^{25,26} Con este sistema de cultivo, es posible mantener células CD34+ sin diferenciarse durante 5 días de cultivo, a partir del día 7 nuestra combinación de citocinas favorece la diferenciación de las células madre hematopoyéticas hacia progenitores mieloides y no permite realizar estudios relacionados con autorrenovación y/o mantenimiento de la pluripotencialidad de estas células madre.

El estudio de la biología de las células madre hematopoyéticas es más eficiente si se trabaja con una población purificada de ST-HSC (*Short-term Hematopoietic Stem Cells*) o LT-HSC (*Long-term Hematopoietic Stem Cells*), lo que puede ser posible con la implementación de sistemas de separación celular más específicos como el utilizado a través de citometría de flujo con sistema *Sorting*, que permite aislar células tipo *side population* en un número apreciable y así realizar ensayos de diferenciación celular con poblaciones celulares puras y primitivas. ²⁷

Mediante este trabajo, determinamos proteínas relacionadas con diferenciación celular en poblaciones enriquecidas con células CD34+ expuestas a un medio de cultivo con citocinas que pueden favorecer la activación de moléculas tipo *SOCS* e inducir diferenciación celular ^(12,13), sin embargo, pudimos establecer que nuestro protocolo nos permite mantener durante 5 días de cultivo células hematopoyéticas sin diferenciación mieloide ni linfocítica según su inmunofenotipo. Para establecer con certeza la pluripotencialidad de estas células madre hematopoyéticas mantenidas *in vitro*, es importante determinar la activación de otros marcadores como factores de transcripción *GATA-1*, *GATA-2*, *c-myc*, *PU.1* y *Aiolos* para establecer la diferenciación temprana de células primitivas (LT-HSC o *Long-term hematopoietic*

stem cell y ST-HSC o *short-term hematopoietic stem cell*) o la expresión de receptores de citocinas como IL-7 y eritropoyetina para determinar la diferenciación linfoide o mieloide en sus etapas iniciales. Esperamos establecer en un futuro cercano cultivos purificados de células madre hematopoyéticas con un amplio perfil fenotípico que nos permita realizar estudios con poblaciones muy primitivas, con alta capacidad de regeneración tisular, para profundizar en las señales que controlan su diferenciación.

Agradecimientos

Esta investigación es de carácter exclusivamente académico, por lo tanto no presenta conflicto de intereses con la empresa pública o con la empresa privada.

Este trabajo fue realizado gracias a la colaboración del Servicio de Ginecoobstetricia del Hospital Universitario San Ignacio y del Hospital Occidente de Kennedy y al personal de la Unidad de Citometría de Flujo del Departamento de Microbiología en la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, así como al personal de la Universidad de los Andes. El apoyo financiero fue asegurado por la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Siminovitch L, McCullouch, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol* 1963;62:327-36.
2. Clift RA, Thomas ED. Seattle Marrow Transplant Team. Follow-up 26 years after treatment for acute myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2004;351:2456-7.
3. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood* 2004;104:1923-30.
4. Benito AJ, Diaz MA, Gonzalez-Vicent M, Sevilla J, Madero L. Hematopoietic stem cell transplantation using umbilical cord blood progenitors: review of current clinical results. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:675-90.
5. Warwick R, Armitage S. Cord blood banking. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:995-1011.
6. Watt SM, Contreras M. Stem Cell medicine: Umbilical cord blood and its stem cell potential. *Semin Fetal Neon Med* 2005;10:209-20.
7. Broxmeyer HE. Cord Blood: biology, immunology, banking and clinical transplantation. Bethesda, MD: AABB Press. 2004.
8. Zhang Y, Chai C, Jiang XS, Teoh SH, Leong KW. Co-culture of umbilical cord blood CD34+ cells with Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng* 2006;12:2161-70.
9. Devine SM, Lazarus HM, Emerson SG. Clinical application of hematopoietic progenitor cell expansion: current status and future prospects. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:241-52.

10. Heike T, Nakahata T. Ex vivo expansion to hematopoietic stem cells by cytokines. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:313-21.
11. Kohler T, Plettig R, Wetzstein W, Schaffer B, Ordemann R, Nagels HO, et al. Defining optimum conditions for the ex vivo expansion of human umbilical cord blood cells. Influences of progenitor enrichment, interference with feeder layers, early-acting cytokines and agitation of culture vessels. *Stem Cells* 1999;17:19-24.
12. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrkowski Z, Kowalska MA, et al. Numerous growth factors, cytokines and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood* 2001;97:3075-85.
13. Nicola NA, Greenhalgh CJ. The suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins: Important feedback inhibitors of cytokine action. *Exp Hematol* 2000;28:1105-12.
14. Rosmarin AG, Yang Z, Resendes K. Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation and leukemogenesis. *Exp Hematol* 2005 33:131-43.
15. Alenzi FQB, Marley SB, Lewis JL, Chandrashekrana A, Warrwms AN, Goldman JM et al. A role for the Fas/Fas ligand apoptotic pathway in regulating myeloid progenitor cell kinetics. *Exp Hematol* 2002;30:1428-35.
16. Maurillo L, Del Poeta G, Venditti A, Bucciana F, Battaglia A, Santinelli S, et al. Quantitative Analysis of Fas and Bcl-2 expression in haematopoietic precursors. *Haematologica* 2001; 86:237-43.
17. Ross J, Li L. Recent advances in understanding extrinsic control of hematopoietic stem cell fate. *Curr Opin Hematol* 2006;13:237-42.
18. Francis K, Ramakrishna R, Holloway W, Palsson BQ. Two new pseudopod morphologies displayed by the human hematopoietic KG1a progenitor cell line and by primary human CD34+ cells. *Blood* 1998; 92:3616-23.
19. Frimberger AE, McAuliffe CI, Werme KA, Tuft RA, Fogarty KE, Benoit BO, et al. The fleet feet of haematopoietic stem cells: rapid motility, interaction and proteopodia. *Br J Haematol* 2001;112:644-54.
20. Ho AD. Kinetics and symmetry of divisions of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2005; 33:1-8.
21. Yoo ES, Lee KE, Seo JW, Yoo EH, Lee MA, Im SA, et al. Adherent Cells Generated During Long-Term Culture of Human Umbilical Cord Blood CD34+ Cells Have Characteristics of Endothelial Cells and Beneficial Effect on Cord Blood Ex Vivo Expansion. *Stem Cells* 2003; 21: 228-35.
22. Opie TM, Shields LE, Andrews RG. Cell surface antigen expression in early and term gestation fetal hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 1998; 16:343-8.
23. D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, DiGiorgio G, Zendoli F, Carotenuto M. Human umbilical cord blood: immunophenotypic heterogeneity of CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Haematologica* 1996;81:404-9.

24. Peters R, Leyvraz S, Perey L. Apoptotic regulation in Primitive Hematopoietic Precursors. *Blood* 1998; 92:2041-52.
25. Madlambayan GJ, Rogers I, Kirouac DC, Yamanaka N, Mazurier F, Doedens M et al. Dynamic changes in cellular and microenvironment composition can be controlled to elicit in vitro human hematopoietic stem cell expansion. *Exp Hematol* 2000;28:1297-305.
26. Kirouac DC, Zandstra PW. Understanding cellular networks to improve hematopoietic stem cell expansion cultures. *Current Opin Biotechnol* 2006; 17:538-47.
27. Lin KK, Goodell MA. Purification of hematopoietic stem cells using the side population. *Method Enzymol* 2006; 420:255-64.

Dra. Viviana Marcela Rodríguez Pardo. Carrera 7ª No. 43-82. Laboratorio 105 Hematología. Edificio Félix Restrepo. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. Colombia. Tel. 3208320, ext 4153 / 4022 / 4025. e-mail: vivianar@javeriana.edu.co

vivianarodrigu@gmail.com

Departamento de Microbiología, Grupo de Inmunobiología y Biología Celular, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Tabla. Porcentaje de enriquecimiento con células CD 34+

Cultivo	Porcentaje población de células CD34+ (%)	Duración del cultivo (días)
190705	81.78	11
060905	88.83	5
200905	70.08	9
290905	67.70	11
151005	63.76	9
201005	61.12	7

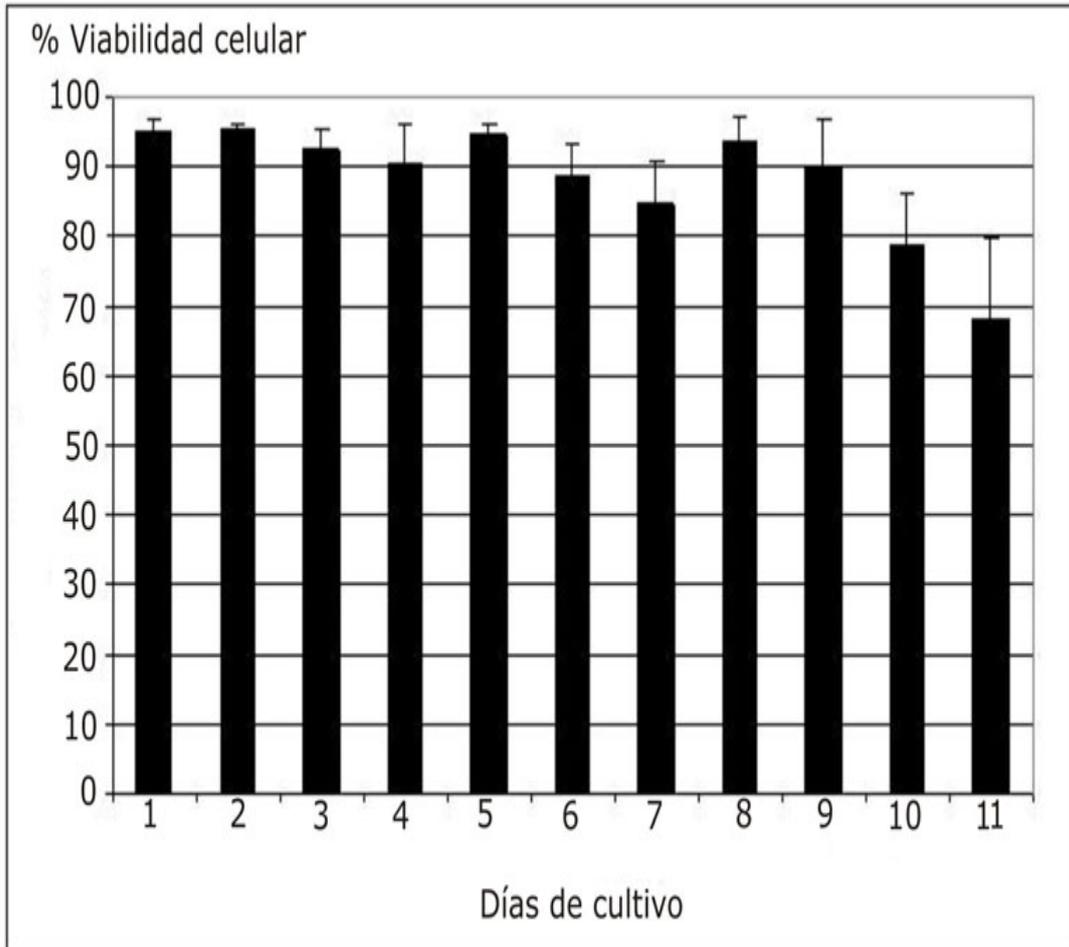


Fig. 1. Promedio del porcentaje de viabilidad celular durante los días de cultivo evaluados

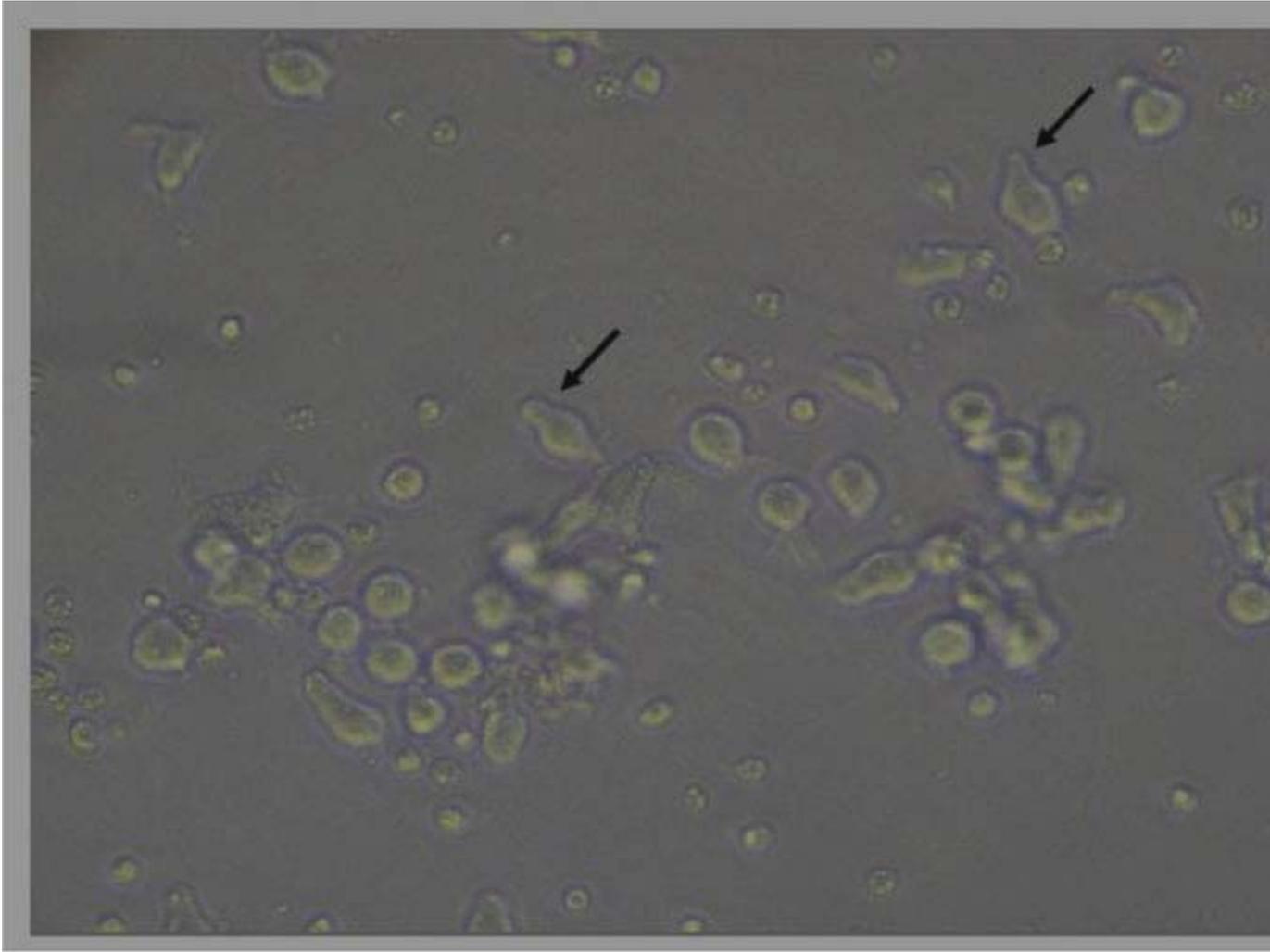


Fig. 2. Imagen que muestra la aparición de prolongaciones cito en los cultivos enriquecidos con células Cd34+. Las flechas prolongaciones citoplasmáticas.

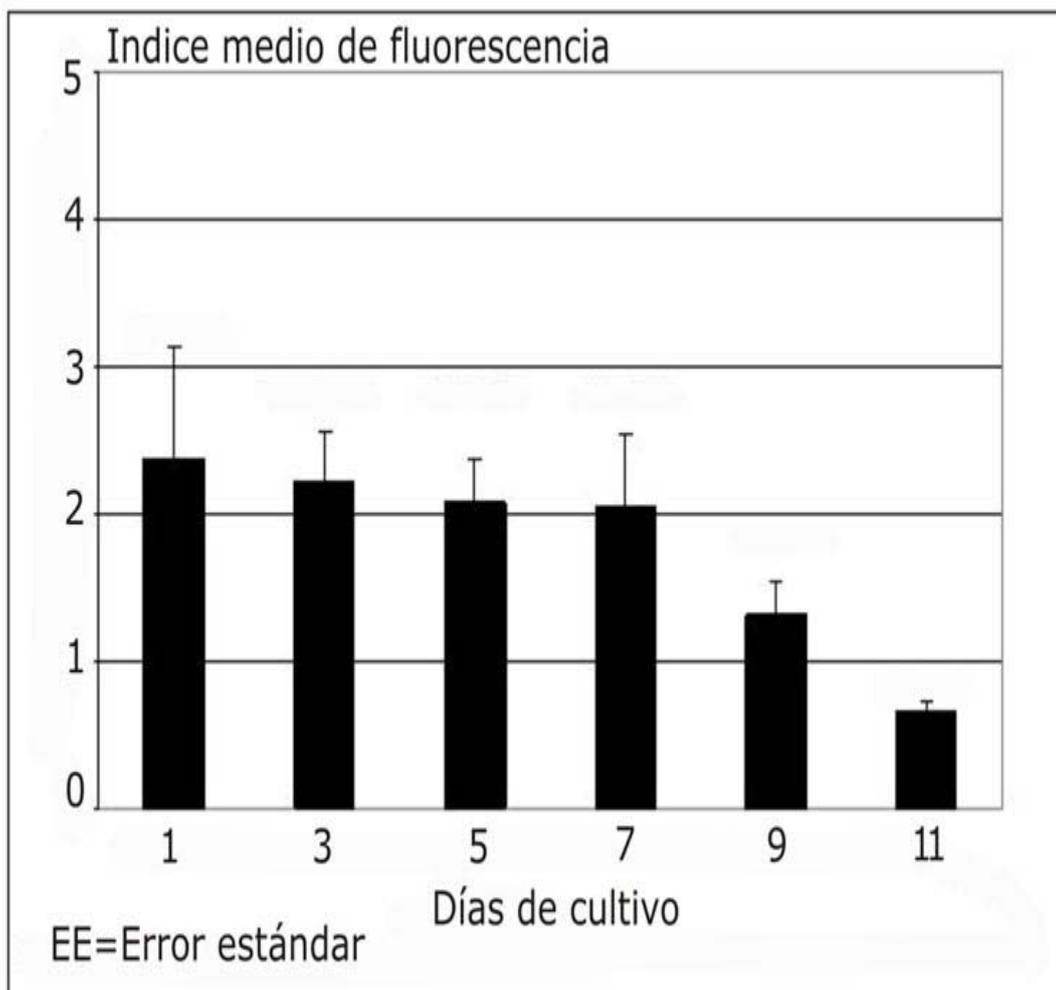


Fig. 3. Expresión de las proteínas relacionada con la diferenciación de las células Cd34+ mediante el índice medio de fluorescencia.

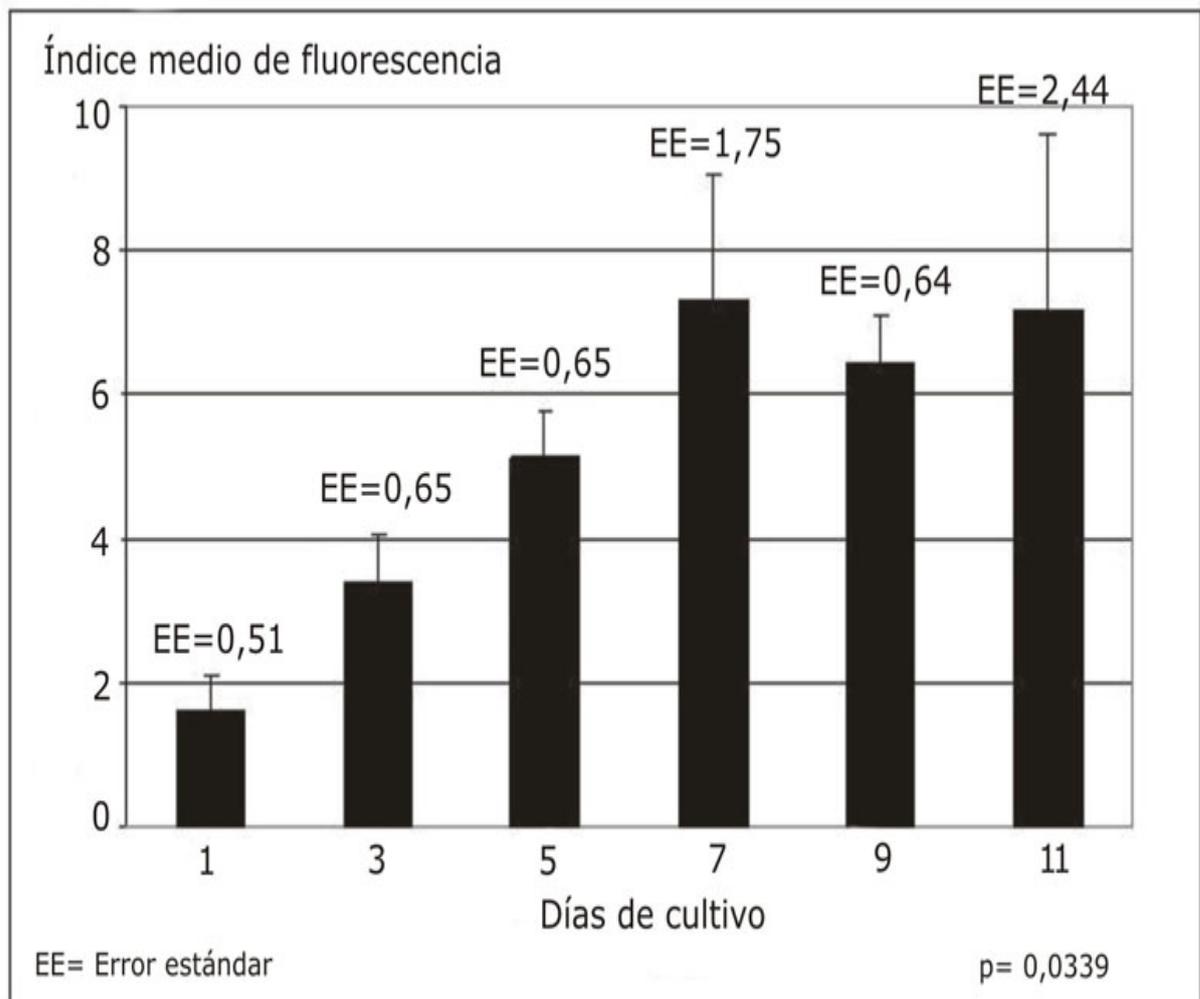


Fig. 4. Expresión del antígeno CD33 determinada mediante el índice medio de fluorescencia.

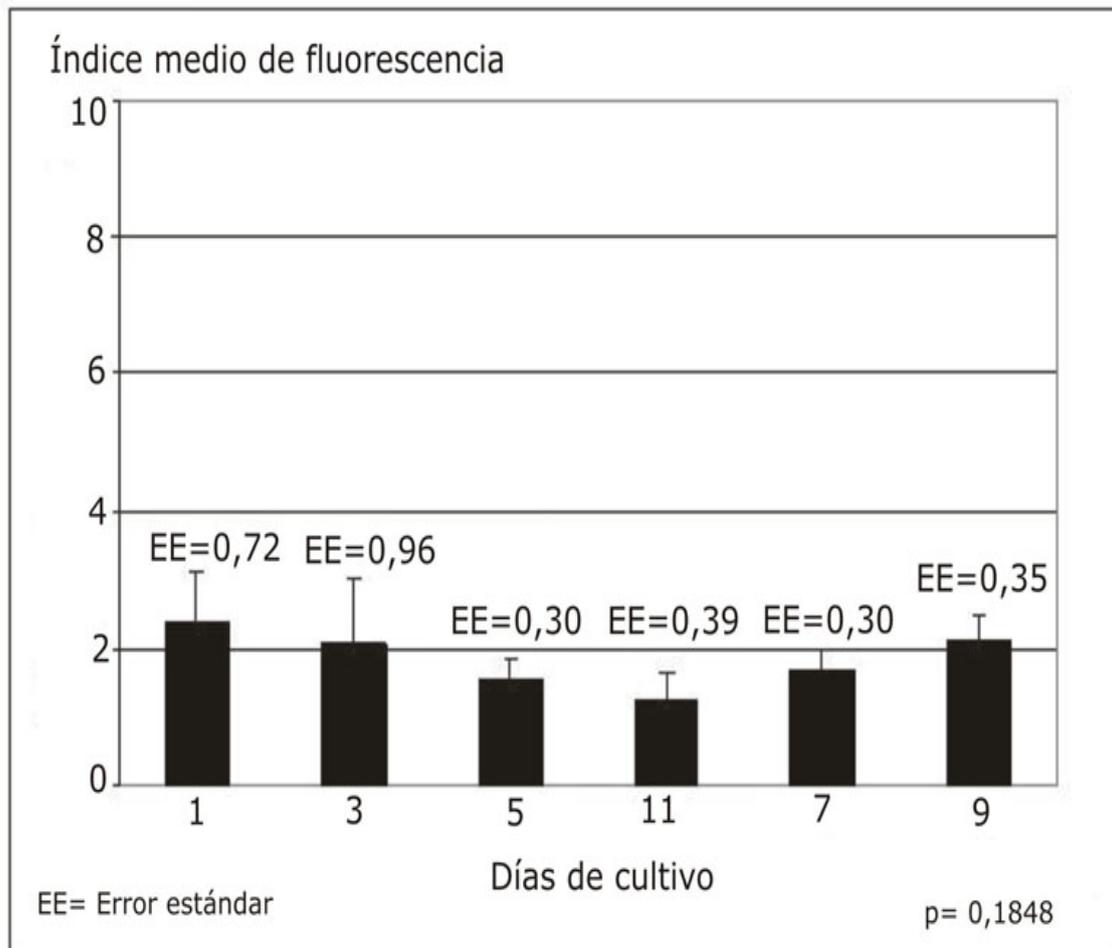


Fig. 5. Expresión del antígeno CD38 determinada mediante el índice medio de fluorescencia.

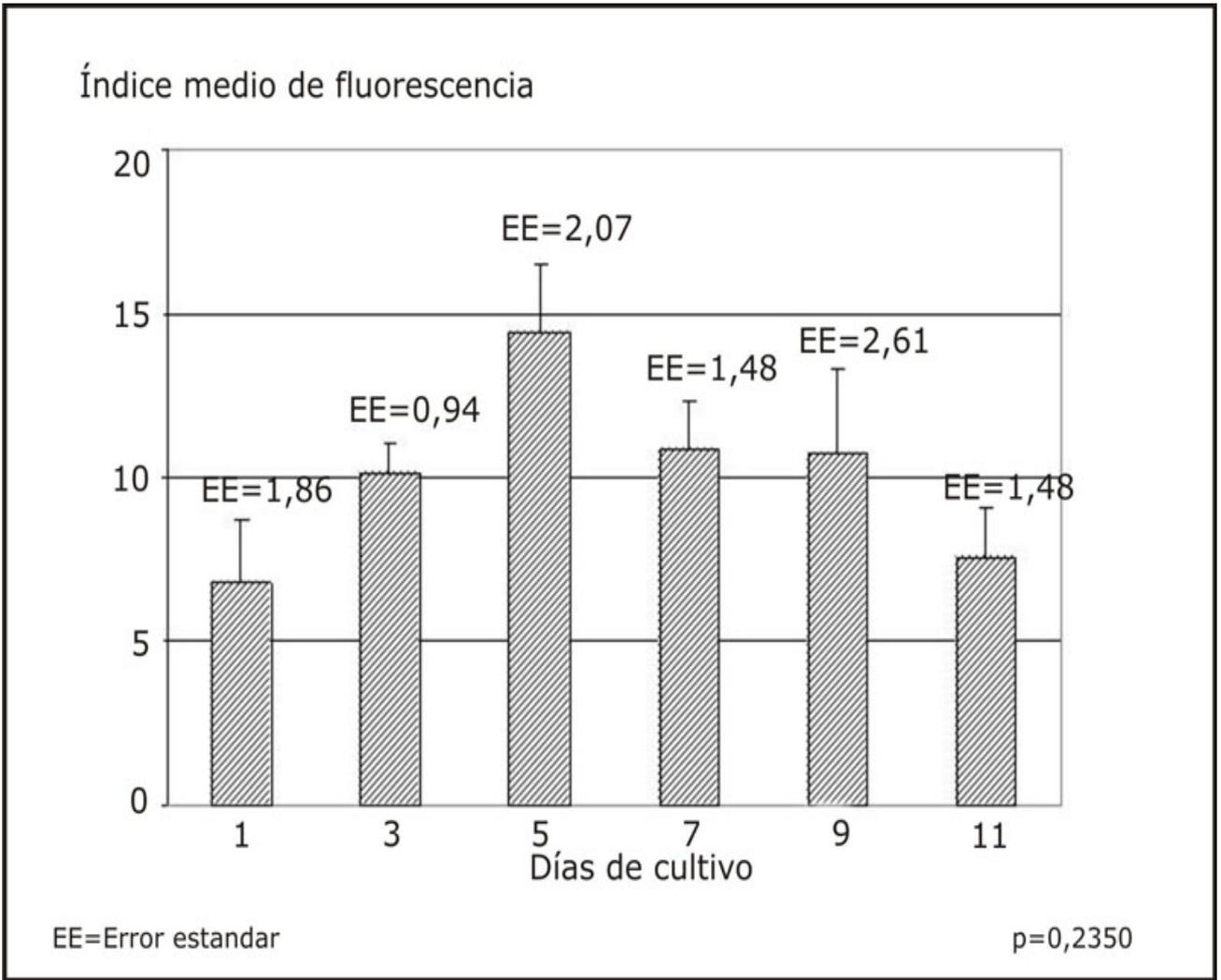


Fig. 6. Expresion de la proteina Bcl-2 determinada mediante el índice medio de fluorescencia.

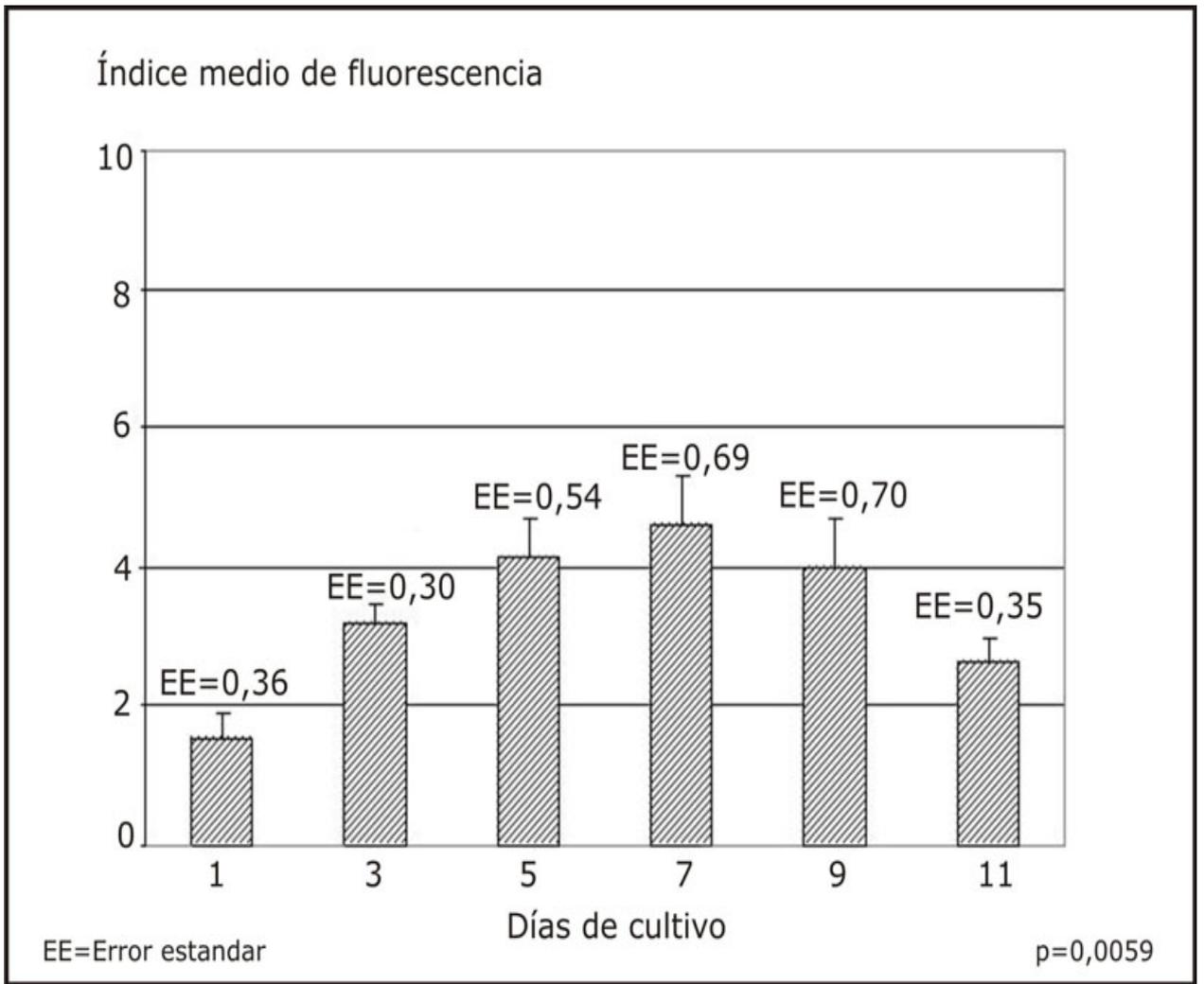


Fig. 7. Expresión del antígeno Cd95 determinada mediante el índice medio de fluorescencia.