

## **Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica para trasplante de células madre. Método simplificado**

### **Isolation of mononuclear cells of peripheral blood for stem cell transplant. Simplified method**

**Dr. Lázaro Cortina Rosales; Dr. Porfirio Hernández Ramírez; Dra. María del Rosario López De Roux; Dr. Heriberto M. Artaza Sanz; Dra. Elvira Dorticós Balea; Dra. Consuelo Macías Abraham; Lic. Berta B. Socarrás Ferrer; Dra. Rosa María Lam Díaz; Lic. Tania González Suárez; Lic. María de los Ángeles Matamoros; Lic. Ana Iris González Iglesias; Lic. Odalis Salgado Arocena; Téc. Yakima Hernández Rego**

Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado Postal 8070, CP 10800, Ciudad de La Habana, Cuba

---

#### **RESUMEN**

En los últimos años el tema de las "células madre" ha despertado creciente interés por su potencial terapéutico en enfermedades que hasta el momento no tienen un tratamiento efectivo. Se realizó un estudio prospectivo y exploratorio en pacientes con arteriosclerosis ocliterante de miembros inferiores, en el que se evaluó la seguridad y efectividad de un método manual de recolección y procesamiento de células mononucleares y de células CD34+ a partir de sangre periférica movilizada. La sangre se procesó en sistemas cerrados de recolección, utilizando el hidroxietilalmidón como potenciador de la sedimentación eritrocitaria. Los pacientes fueron tratados con factor estimulador de colonias granulocítico en dosis total de 40 µg/kg de peso durante 2 días, y después si el conteo de leucocitos era superior a  $20 \times 10^9/L$  se procedió a la autodonación. Para valorar la eficacia del método se analizaron las cantidades de células nucleadas, de células mononucleares y de células CD 34+ en el concentrado celular; se determinó la viabilidad celular y además se hizo el estudio microbiológico del material obtenido. Se demostró que el método es eficaz y seguro, ya que logra niveles celulares adecuados, con elevada viabilidad y ausencia de contaminación bacteriana. Por otra parte, es sencillo y de bajo costo, lo que permite su extensión a otros centros de salud, en particular a los de menos recursos. Esto facilita que un mayor número de pacientes se puedan beneficiar con el tratamiento a base de células madre.

**Palabras clave:** células madre, factor estimulador de colonias granulocíticas, células mononucleares, hidroxietil almidón.

---

## ABSTRACT

In the last years, the topic of stem cells has arisen an increasing interest for its therapeutic potential in diseases that have not an effective treatment so far. A prospective and exploratory study was conducted in patients with obliterant atherosclerosis of the lower limbs to evaluate the safety and effectiveness of a manual method of collection and processing of mononuclear cells and of CD34+ cells, starting from mobilized peripheral blood. The blood was processed in closed collection systems, using hydroxyethyl starch as a potentiator of erythrocyte sedimentation. The patients were treated with granulocyte colony stimulating factor at total doses of 40µcg/kg of weight during 2 days. Self-donation was performed when the leukocyte count was higher than 20 x 10<sup>9</sup>/L. To assess the efficacy of the method, the amounts of nucleated cells, of mononuclear cells and of CD 34+ cells in the cellular concentrate were analyzed. Cellular viability was determined and a microbiological study of the material obtained was conducted. It was proved that the method is efficient and safe, since adequate cellular levels with a high viability and absence of bacterial contamination are attained. On the other hand, it is simple and cheap, which allows its application in other health centres, particularly in those with less resources. This makes possible that more patients benefit from the stem cell treatment.

**Key words:** stem cells, granulocyte-colony stimulating factor, mononuclear cells, hydroxyethyl starch.

---

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años el tema de las "células madre" (CM) ha despertado creciente interés por su potencial terapéutico en enfermedades que hasta el momento no tienen un tratamiento efectivo. Esta es una aplicación de la Medicina Regenerativa que incluye un conjunto de procedimientos destinados a la obtención, procesamiento e implantación de células en tejidos total o parcialmente dañados, con el objetivo de renovar las células dañadas y de esta forma restablecer la función tisular comprometida.<sup>1,2</sup>

En el momento del nacimiento existen en el cuerpo CM somáticas en la mayoría de los tejidos; estas están integradas a los mecanismos que emplea el organismo para la renovación celular en condiciones fisiológicas o ante un daño tisular.<sup>3</sup> Estudios recientes han mostrado que la población de CM adultas existentes en un tejido es heterogénea, pues además de las propias, hay también otras líneas de CM con potencialidad de diferenciarse en células de otras estirpes.<sup>4,5</sup> El ejemplo más característico es la médula ósea (MO) donde se han identificado los siguientes tipos: hematopoyéticas, endoteliales, estromales/mesenquimales, células progenitoras adultas multipotentes, células ovas y la denominada población lateral.<sup>1,3</sup> En la sangre periférica (SP) se han encontrado poblaciones celulares similares a las anteriormente descritas aunque en menor concentración. Este hecho y la experiencia acumulada durante 50 años en la obtención y procesamiento de progenitores hematopoyéticos han determinado que la MO y la SP sean las fuentes más utilizadas para la obtención de CM.<sup>6</sup>

La colección de CM a partir de MO se realiza en el salón de operaciones mediante punciones múltiples en las crestas ilíacas con los pacientes bajo anestesia.<sup>7-9</sup> La MO obtenida contiene todos los elementos de su entorno natural, y debe someterse a determinados procedimientos, entre ellos: la separación en un gradiente de densidad con Ficoll u otros, que permiten disminuir el volumen del concentrado celular y aumentar la concentración y la pureza de las CM, para luego implantarlas en el órgano diana.<sup>7-10</sup>

---

En SP las CM existen en bajas concentraciones, con escasas probabilidades de que se pueda lograr una recolección adecuada; sin embargo, esta situación puede ser cambiada mediante terapias con factores estimuladores, entre ellos el factor estimulador de colonias granulocíticas (FEC-G), que ocasiona la liberación de las CM desde su *hábitat* natural en los nichos de la MO y su movilización hacia la sangre.<sup>11</sup> (Insunza A. Estrategias de movilización de progenitores hematopoyéticos. Conferencia de actualización. XII Congreso de la Sociedad Española 2001; 5-11). Una vez que se alcanzan los niveles óptimos son recolectadas generalmente con un separador celular.<sup>11-13</sup>

La terapia regenerativa con CM adultas derivadas de la MO se inició en nuestro país en febrero del 2004 en pacientes con arteriosclerosis obliterante crítica de miembros inferiores. Se utilizó como fuente la médula ósea, la que fue procesada en un separador celular o por un método manual de gradiente de densidad con Ficoll.<sup>14</sup> Sin embargo, aunque ambos procedimientos fueron efectivos, no era factible su extensión a otros centros con recursos más limitados, lo que restringía la generalización de estas técnicas.

Ante esta situación, decidimos estandarizar un método de procesamiento de SP, con progenitores hematopoyéticos movilizados, autodonación de sangre y procesamiento manual en un sistema cerrado de bolsas colectoras a las que se adicionó hidroxietil almidón 6 %. Este método de más fácil realización y más económico, facilitaría la introducción de la terapia con células madre en otros centros de la red nacional de Salud Pública.

## MÉTODOS

Se incluyeron en el estudio 98 pacientes seleccionados para terapia celular por el Servicio de Angiología del Hospital General "Enrique Cabrera", desde octubre del 2004 hasta el primer semestre del 2007; de ellos, 33 mujeres y 65 hombres, con una edad promedio de 60 años. Todos los enfermos cumplían los criterios diagnósticos establecidos para la arteriosclerosis obliterante de miembros inferiores, y sus parámetros cardiovasculares y respiratorios se encontraban normales. En ninguno había evidencias de afecciones agudas en el electrocardiograma. La cifra de hemoglobina siempre fue mayor de 100g/L y las determinaciones de glicemia, creatinina y transaminasas hepáticas eran normales.

Se excluyeron los casos con enfermedades malignas; con enfermedades crónicas (insuficiencia cardíaca, renal, hepática y diabetes mellitus) descompensadas y aquellos con evidencia de infección que contraindicara alguna de las etapas requeridas para la obtención e implantación de las células.

La movilización de CM se efectuó con FEC-G (Leukocim, Centro de Inmunología Molecular, La Habana) en dosis de 40 µcg x kg de peso dividido en 4 subdosis de 10µcg x kg de peso cada 12 horas. La última dosis se administró entre 3 y 6 horas antes de la extracción de sangre. Se realizó hemograma antes de la movilización y a las 3 horas de la última dosis de medicamento. Si el conteo de leucocitos era mayor de 20 x 10<sup>9</sup>/L y el resto de los parámetros normales, se procedió a la extracción de sangre periférica. Si el conteo era menor se continuó con la movilización cada 12 horas con 10 mg x kg de peso hasta alcanzar la cifra de leucocitos antes mencionada.

### Método de obtención y separación de las células mononucleares

#### *Autodonación*

Con el paciente acostado en decúbito supino, se le canalizó una vena gruesa en el antebrazo y se efectuó la extracción de sangre hacia una bolsa colectora con CPDA (sistema cuádruple). Una vez alcanzada la cantidad deseada (250 mL), se procedió a cortar la tubuladura y conectar una nueva bolsa (sistema doble) y se repitió el proceder. Al concluir la donación de los primeros 500 mL se retiró la bolsa y la ligadura y se conectó a la línea de acceso a la vena una infusión de solución salina al 0,9 % a goteo lento durante 45 a 60 minutos. A continuación se transfundieron los concentrados de eritrocitos obtenidos de las bolsas donadas. Concluida la transfusión, se procedió a la autodonación de 2 nuevas bolsas de forma similar a la antes señalada. La transfusión de los 2 concentrados de eritrocitos de las últimas bolsas dependió de los niveles de Hb previos y del estado físico del paciente. Efectuada o no la autotransfusión, se infundió solución salina 0,9 % para hidratar al enfermo. Concluido el proceder, se comprobó el examen físico normal del paciente que retornó a la sala de Angiología o se mantuvo ambulatorio según el estado de su enfermedad.

#### *Procesamiento de la sangre periférica*

En un gabinete de seguridad biológica se abrió el sistema de bolsas con la sangre obtenida y se le adicionaron 40 mL de hidroxietil almidón (HES), equivalente a 1 mL de HES por 6 mL de sangre. Se selló nuevamente y se sometió a sedimentación invertida durante 1 hora. Al finalizar la sedimentación, sin abrir el sistema, se pasaron los eritrocitos hacia la bolsa satélite con SAGMan, y en la bolsa madre quedó el plasma rico en leucocitos, plaquetas y CM. Se selló la bolsa con el concentrado de eritrocitos y se separó de todo el sistema para su transfusión al paciente. Con la segunda bolsa donada se repitieron los pasos comentados. En el gabinete de seguridad biológica, las bolsas madres 1 y 2 se abrieron y se unieron a través de un conector. El contenido se pasó a la bolsa madre del sistema cuádruple. Se selló la bolsa y en posición invertida se dejó sedimentar hasta el día siguiente en un refrigerador de 2-6 °C. Al terminar la sedimentación, se hizo una segunda depleción de eritrocitos que se pasaron a otra bolsa, mientras que el plasma y la capa leucoplaquetaria quedaban en la bolsa madre. La capa celular se pasó hacia la última bolsa libre del sistema, mientras que el plasma permaneció en la bolsa madre. Con las bolsas 3 y 4 se repitió el procesamiento descrito.

Las 2 bolsas con el contenido celular se abrieron y se unieron a través de un conector para pasar el contenido a una sola bolsa. Después se homogenizó ese contenido, se determinó el volumen en mL y se tomaron muestras para estudios microbiológicos y de viabilidad celular. Posteriormente se selló la bolsa y rotuló con el nombre del paciente, la fecha y los mililitros que contenía. Finalmente se almacenó entre 2-6 °C hasta su entrega para la implantación celular.

#### *Estudio del concentrado*

- Conteo de células mononucleares (CMN). Se utilizaron las siguientes variables: el conteo de leucocitos/L (efectuado en el contador automático de células SINNOWA HB-7021, República Popular China), el volumen del concentrado y el porcentaje de CMN.

- El recuento diferencial se determinó mediante microscopía óptica en extensiones del concentrado celular teñidas con May-Grunwald Giemsa, lo que permitió el porcentaje de CMN. Se consideraron CMN: los linfocitos, monocitos, células linfocitoides, monocitoides, mieloides inmaduras, proeritroblastos y eritroblastos. El porcentaje de células CD34+ se determinó por citometría de flujo en un FaC Scan (Becton-Dickinson, EE.UU.) y se aplicó para obtener su valor absoluto a partir del número de CMN en el concentrado.

- La determinación de la viabilidad celular se hizo mediante la coloración con azul Tripán, según el método empleado en nuestra institución. La tinción de Gram y los cultivos bacteriológicos se realizaron por los métodos habituales del laboratorio de Microbiología.

### **Análisis estadístico**

Se obtuvieron la media, mediana y rango de los números absolutos y porcentajes de CMN y células CD34+ contenidas en el concentrado y del porcentaje de viabilidad celular encontrado en el mismo, y se evaluó el porcentaje de unidades contaminadas según los estudios bacteriológicos realizados y el porcentaje de complicaciones secundarias al proceso de movilización y de extracción.

## **RESULTADOS**

El conteo de leucocitos fue superior a  $20 \times 10^9/L$  en 96 (98 %) pacientes; solo que 2 casos necesitaron de estimulación adicional con 2 nuevas dosis de FSC-G. El resto de los parámetros del hemograma mantuvieron cifras adecuadas que permitieron la donación de un litro de sangre de la forma en que fue planificada (tabla 1).

**Tabla 1.** Parámetros hematológicos antes de la autodonación

| Parámetro                  | Media | Mediana | Rango     |
|----------------------------|-------|---------|-----------|
| Hemoglobina (Hb) g/L       | 127,3 | 126     | 95-171,6  |
| Hematocrito (Hto)          | 0,39  | 0,39    | 0,28-0,52 |
| Leucocitos $\times 10^9/L$ | 35,3  | 35      | 20-93     |
| Segmentados %              | 75    | 78      | 58-95     |
| Células mononucleares %    | 22    | 20      | 3-40      |
| Plaquetas $\times 10^9/L$  | 295   | 280     | 167 - 600 |

Durante la administración del FEC-G, 19 enfermos (19,3 %) presentaron dolores óseos, 5 (5,1 %) cefalea y 2 (2 %) mialgias, lo que se produjo generalmente a partir de la tercera dosis. En el proceso de donación 2 casos tuvieron un hematoma en el sitio de punción, con necesidad de canalizar una nueva vena. No se produjeron alteraciones cardiovasculares ni otras manifestaciones secundarias.

El volumen promedio de los concentrados de CMN obtenidos fue de 106 mL, con un contenido medio de leucocitos de  $20,3 \times 10^9$ ; el porcentaje de CMN fue de 29 % y el contenido promedio de CMN del concentrado fue de  $5,35 \times 10^9$ . Solo a 43 de los pacientes estudiados se le pudo determinar el número de células CD 34+ en el concentrado celular. El porcentaje promedio fue 2,4 % con un número absoluto promedio de  $121,2 \times 10^6$  (tabla 2).

**Tabla 2.** Características de los concentrados celulares

| Parámetro   | Media | Mediana | Rango      |
|---|-------|---------|------------|
| Volumen mL  | 106   | 100     | 40-170     |
| Contenido total de leucocitos x 10 <sup>9</sup> /L                  | 18,3  | 16,8    | 4,7 - 49,5 |
| Células mononucleares (CMN) (%)                                     | 29    | 27      | 6-70       |
| Contenido Total de CMN x 10 <sup>9</sup>                            | 5,35  | 4,2     | 0,66 -21   |
| Células CD34 <sup>+</sup> (%)<br>n=43                               | 2,4   | 1,2     | 0,18 -8,4  |
| Contenido total células CD34 <sup>+</sup> x 10 <sup>6</sup><br>n=43 | 121,1 | 61,6    | 7 -650     |

La viabilidad celular en los concentrados se mantuvo en un rango entre 95 y 99 %. En todos los casos los cultivos microbiológicos y la tinción de Gram fueron negativos (tabla 3).

**Tabla 3.** Comparación con otros grupos de trabajo

| Método  | Volumen (mL) | Fuente | CMN x 10 <sup>9</sup> | CD 34+ x 10 <sup>7</sup> |
|---|--------------|--------|-----------------------|--------------------------|
| Japón <sup>(20)</sup><br>Automatizado n =50   | 500          | MO     | 1,6                   | 3,7                      |
| Polonia <sup>(21)</sup><br>Automatizado n= 10   | 500          | MO     | 3,28 ±2,19            | 6,35 0,7- 8,1            |
| Instituto de Hematología e Inmunología<br>Gradiente de densidad con Ficoll <sup>(14)</sup><br>n = 6 | 500 -600     | MO     | 2,47 ± 1,48           | 7,90 ± 5,46              |
| Automatizado <sup>(14)</sup><br>n = 7   | 500 -600     | MO     | 1,74 ± 1,23           | 8,14 ± 6,67              |
| Manual con HES  | 1 000        | SP     | 5,35<br>n = 98        | 12,11<br>n = 43          |

HES: hidroxietil almidón 6 %; MO: médula ósea; SP: sangre periférica.

Entre paréntesis la referencia bibliográfica.

## DISCUSIÓN

Durante muchos años la médula ósea fue la fuente convencional de células progenitoras hematopoyéticas.<sup>6</sup> En la década de los 60 del siglo pasado se conoció la existencia de esas células progenitoras circulantes en la sangre periférica, aunque en niveles muy bajos para lograr una colección significativa.<sup>15</sup> Posteriormente en las décadas 1980-90, se reportó que bajo determinadas circunstancias fisiológicas, como ejercicios e infecciones, estas células aumentan sus niveles en la sangre; igualmente que este fenómeno podía lograrse mediante estimulación con quimioterapia y citocinas.<sup>16-18</sup> Esto unido con el desarrollo tecnológico de los separadores celulares, permitió que las células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica puedan ser recolectadas y utilizadas para trasplante.<sup>18,19</sup>

La aplicación del trasplante de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica, ha facilitado identificar una serie de ventajas en relación con el de médula ósea, como son: la recolecta de un mayor número de CM; la frecuencia menor de efectos adversos, que cuando ocurren son menos intensos y menos duraderos; la no necesidad de salón de operaciones, ni de anestesia; y además que se puede realizar en caso de deformaciones o afecciones óseas que contraindiquen la punción ósea para la obtención de la médula ósea.<sup>8,9,12</sup> Estas circunstancias determinan beneficios directos para el paciente y para el centro de trasplante, ya que disminuye la estadía hospitalaria y se abaratan los costos del proceder.

La colección a partir de sangre periférica movilizada se realiza habitualmente con una máquina separadora de células, lo cual no era dificultad para nuestro trabajo, pues contamos con dicho equipamiento. Sin embargo, al valorar la extensión del proceder hacia otras instituciones del salud, esto sí constituía una limitante, ya que pocos centros del país poseen esta tecnología y adquirir el equipo constituye un gasto significativo de recursos, ya que su valor oscila entre 50 000 y 60 000 dólares en el mercado internacional, a lo que se suma el alto costo en moneda libremente convertible del material desechable necesario para el procesamiento celular. Ante esta situación, nuestro grupo de trabajo, aprovechando su experiencia en las técnicas de bancos de sangre y de trasplante de progenitores hematopoyéticos, diseñó el método descrito en este trabajo. La movilización celular en personas que no padecen enfermedades oncológicas se realiza con citocinas y de estas, la más utilizada es el FSC-G mediante el método en que se utilizan habitualmente dosis de 5 µg x kg de peso cada 12 horas durante 5 días y la recolección se hace los días cuarto y quinto.<sup>11</sup> (Torrabadella M, Parra R, Acebedo G, Ortega JJ, Gallur L, Massuet L. Comparación de dos dosis de G-CSF para movilizar células progenitoras en donantes sanos. [CD-ROM]. Posters 173. Santander del 10-12 de junio del 2001. XII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea. Resúmenes).

En nuestro trabajo se empleó un esquema de movilización más corto, pero con incremento de la dosis diaria de FSC-G y se hizo su seguimiento con conteos de leucocitos. Esto fue motivado por el hecho de que el número de CM requeridas para la terapia regenerativa vascular es mucho menor que el estipulado para el trasplante de progenitores hematopoyéticos.<sup>20,21</sup> Además, publicaciones de otros investigadores refieren que con una dosis hasta de 20 µg x kg de peso/día existe una clara relación dosis-efecto en la acción movilizadora del FSC-G, y que el umbral de recolección se logra en menor tiempo, e incluso este aumento de la dosis puede hacer desaparecer las diferencias de movilización debidas a la edad.<sup>22,23</sup> Con nuestro proceder se apreció que en el 98 % de los pacientes se obtuvo un incremento del conteo de leucocitos superior al mínimo requerido y el contenido de CMN y de células CD 34+ del concentrado estuvo dentro de los parámetros planteados por otros investigadores.<sup>20,21,24</sup> Esta forma de movilización tiene la ventaja de que es menos traumática para el paciente y acorta la estadía hospitalaria.

Comunicaciones de otros investigadores han señalado hasta en un 20 % los donantes sanos que pueden ser pobres movilizadores, aunque solo el 3 % suele movilizar de manera insuficiente. Esto explicaría por qué en 2 donantes no logramos el conteo de leucocitos

requerido y necesitaron dosis adicionales de FSC-G (*Insunza A.*, citado anteriormente) (*Hernández C, Arrieta R, Fernández C, Galindo I, Hernández-Navarro F.* Factores predictivos en la recolección de células CD34+ en donantes. [CD-ROM]. Posters 185. Santander del 10-12 de junio del 2001. XII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea. Resúmenes). Los efectos adversos como consecuencia de la movilización fueron ligeros: cefalea, mialgias y dolores óseos, coincidentes con los referidos en trabajos previos. En ningún paciente se presentaron complicaciones severas como la trombosis arterial,<sup>24</sup> aunque es cierto que como parte del tratamiento de su enfermedad de base ellos mantienen terapia con antiagregantes plaquetarios.

La edad no fue causa de exclusión. Los parámetros del hemograma estuvieron dentro de las cifras aceptadas para la autodonación, y el hecho de que se fraccionara la extracción facilitó que fuera tolerada adecuadamente. Desde los años 70 se utiliza el HES al 6 % para depletar la médula ósea de los eritrocitos por métodos manuales.<sup>7,9,10</sup> La mezcla de la médula ósea con el HES 6 % da lugar al fenómeno de agrupación de los eritrocitos en pila de monedas *rouleaux* promoviendo su rápida sedimentación y facilitando la separación de la capa leucoplaquetaria.<sup>7,9,10</sup> El HES 6 % también se ha combinado con las sustancias anticoagulantes empleadas en los separadores celulares durante la obtención de CM de sangre periférica.<sup>7,9,10</sup> En nuestro método la separación de las CMN de la sangre periférica se ejecuta por técnicas manuales que incluye la adición de HES 6 %. Es de destacar que el mismo toma elementos de las técnicas de separación tradicionales, aunque tiene características propias que lo identifican y lo diferencian de los métodos comentados.

La gran ventaja de los separadores celulares está en que pueden procesar los volúmenes de sangre que se consideren necesarios hasta lograr el contenido celular deseado; además los concentrados obtenidos no necesitan manipulación posterior, lo que disminuye las posibilidades de contaminación bacteriana. Esto planteaba la interrogante de si nuestro método manual podía ser suficientemente eficiente como para emplearse en lugar del automatizado; un aspecto que no se ha precisado aún es cuántas células son necesarias para el tratamiento de la arteriosclerosis obliterante de miembros inferiores. Nuestro grupo, tomando como referencia otros trabajos publicados sobre el tema, estableció como cifra mínima de CMN  $1 \times 10^9$  y de células CD34+  $3 \times 10^7$ , cifras que fueron superadas. El contenido celular del concentrado fue equiparable a las de otros trabajos que utilizaban como fuente la médula ósea, entre los que se incluye el trabajo pionero sobre el tema, y uno nuestro, publicado recientemente en la revista (tabla 3),<sup>14,20,21,25,26-28</sup> lo que evidenció que la recolección con nuestro método es cuantitativamente suficiente. En otro orden debe destacarse que los sistemas de bolsas permitieron realizar la mayor parte de la manipulación en un circuito cerrado y en los pasos en que fue necesario abrirlo, esto se efectuó en un gabinete de seguridad biológica, todo lo cual le confirió al método la seguridad microbiológica adecuada que fue avalada por los resultados de los cultivos microbiológico y de la tinción de Gram realizadas a cada concentrado, y además por el hecho de que ninguno de los pacientes presentó complicaciones infecciosas como consecuencia del implante celular, a esto se une al alto porcentaje de viabilidad celular obtenido.

Las características del método manual de colección de CM que se ha empleado permite definirlo como un proceder simple, económico y eficiente, que puede ser empleado satisfactoriamente en centros de salud con pocos recursos en que se desee introducir la terapia celular regenerativa, lo que podría ser una solución factible no solo para nuestro país, sino también para otros comprendidos entre los menos desarrollados.

En la actualidad este método ya se está aplicando en el Hospital Provincial "Abel Santamaría Cuadrado", de Pinar del Río, en el Hospital Provincial "Arnaldo Milián Castro" de Santa Clara y en el Hospital Provincial "Dr. Gustavo Aldereguía" de Cienfuegos.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hernández P, Dorticós E. Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 2004;20;(3) Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-02892004000300001&lng=es&nrm=iso&tling=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892004000300001&lng=es&nrm=iso&tling=es)
2. Daley GQ, Goodell MA, Snyder EY. Realistic prospects for stem cell therapeutics. Hematology 2003;1:398-418.
3. Mato E. Células madre: un nuevo concepto de medicina regenerativa. Rev Cubana Endocrinol 2004;15:1-9.
4. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu D, Hwang S, Gardner R, et al. Multi-organ, multi-lineaje engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. Cell 2001;105:369-77.
5. Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:14482-6.
6. McCarthy LJ, Danielson CF, Cornetta K, Srour E, Broun R. Autologous Bone Marrow Transplantation. Crit Rev Clin Lab Sci 1995;32:67-119.
7. Pamphilon D. Stem-cell harvesting and manipulation. Vox Sang 2004;87:520-5.
8. American Association of Blood Banks, Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunología. "Celulas Tronco" (Stem Cells) y Progenitores Hematopoyéticos. En: American Association of Blood Banks, Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunología. Manual técnico. 12 ed. Buenos Aires: Edigraf; 1997. p. 407-19.
9. Demko SG. Transplantation procedures. Burt RK, Joachim Deeg H, Lothian ST, Santos GW, eds. Bone Marrow Transplantation. Georgetown: Landes Bioscience; 1999. p. 39-51.
10. López M, Andreu G, Beaujean F, Ehram A, Gerota J, Herve P. Human bone marrow processing in view of further in vitro treatment and cryppreservation. Blood Transf Inmunohaematol 1995;5:411-25.
11. McCullough J, Clay M, Herr G, Smith J, Stroncek D. Effects of granulocyte-colony-stimulating factor on potential normal granulocyte donors. Transfusion 1999;39:1136-40.
12. Mazzara R, Lozano M. Obtención de PH de sangre periférica. Carreras E. Manual de Trasplante Hemopoyético. 2 ed. Barcelona: Editorial Antares; 2000. p. 245-9.
13. Boogaerts MA. Rational use of myeloid growth factors in Hemato-Oncology. Acta Clin Belg 1999;54:312-5.
14. Hernández P, Cortina L, Artaza H, Pol N, Lam RM, Dorticós E, et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation in patients with severe lower limb ischaemia: A comparison of using blood cell separator and Ficoll density gradient centrifugation. Atherosclerosis 2007;194:52-6.
15. Goodman JW, Hodgson GS. Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. Blood 1962;19:702-14.

16. Körbling M, Burke P, Braine H, Eifenbein G, Santos G, Kaizer H. Successful engraftment of blood-derived normal hemopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 1981;9:684-90.
17. Hill JM, Finkel A, Quyyumit A. Endothelial progenitor cells and endothelial dysfunction. *N Engl J Med* 2003;348:593-600.
18. Kessinger A. Utilization of peripheral blood stem cell in autotransplantation. *Hematol Oncol Clin North Am* 1993;7:535-45.
19. Rowley SD, Prather K, Bui KT, Appel M, Felt T, Bensinger WI. Collection of peripheral blood progenitor cells with an automated leukapheresis system. *Transfusion* 1999;39:1200-6.
20. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda V, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone marrow cells: A pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet* 2002;360:427-35.
21. Nizankowski R, Petriczek T, Skotnicki A, Szczeklik A. The treatment of advanced chronic lower limb ischaemia with marrow stem cell autotransplantation. *Kardiol Pol* 2005; 63:351-9.
22. Halle P, Kanold J, Rapatel C, Boiret N, Berger M, Stephan JL, et al. Granulocyte colony-stimulating factor alone at 20 micrograms/kg vs. 10 micrograms/kg for peripheral blood stem cell mobilization in children. *Pediatr Transplant* 2000;4:285-8.
23. Martínez C, Urbano-Ispizua A, Marín P, Merino A, Rovira M, Carreras E, et al. Efficacy and toxicity of a high-dose G-CSF schedule for peripheral blood progenitor cell mobilization in healthy donors. *Bone Marrow Transplant* 1999;24:1273-8.
24. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomized clinical trial. *Lancet* 2004;363:751-6.
25. Bartsh T, Falke T, Brehn M, Zeus T, Kogler G, Wernet P, et al. Intra-arterial and intramuscular transplantation of adult, autologous bone marrow stem cells. Novel treatment for therapy refractory peripheral arterial occlusive disease. *Dtsch Med Wochenschr* 2006;13:79-83.
26. Lenk K, Adams V, Lurz P, Linke A, Gielen S, Schmidt A, et al. Therapeutical potential of blood-derived progenitor cells in patients with peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischaemia. *Eur Heart J* 2005;26:1903-9.
27. Li S, Zhou B, Han ZC. Therapeutic neovascularization by transplantation of mobilized peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. A comparison between CD34+ and CD34- mononuclear cell. *Thromb Haemost* 2005;95:301-11.
28. Huang P, Li Sh, Han M, Xiao Z, Yang R, Han ZC. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:2155-60.

Recibido: 13 de enero de 2008.

Aprobado: 10 de marzo de 2008.

Prof. *Porfirio Hernández Ramírez*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado Postal 8070, CP 10800, Ciudad de La Habana, Cuba. Tel (537) 6438268, 6438695, Fax (537) 6442334. E-mail: [ihidir@hemato.sld.cu](mailto:ihidir@hemato.sld.cu)