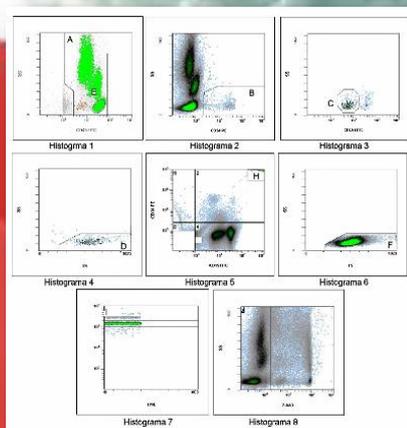
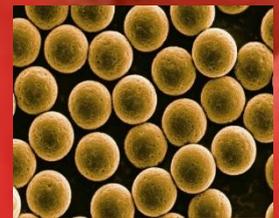


Universidad de la República

# EVALUACIÓN DE CÉLULAS TRONCO/PROGENITORAS HEMATOPOYETICAS

*Optimización de un sistema de aislamiento de células  
tronco a partir de sangre periférica sin estimulación*



Universidad de la República



**INDT**

Instituto Nacional  
de Donación y Trasplante  
de Células, Tejidos y Órganos

**EVALUACIÓN DE CÉLULAS  
TRONCO/PROGENITORAS  
HEMATOPOYETICAS**

*Optimización de un sistema de aislamiento de  
células tronco a partir de sangre periférica sin  
estimulación*

por

**Rodrigo Lucas**

**Informe presentado como uno de los  
requisitos para obtener el título de  
Licenciado en Biología Humana**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2014**

**PÁGINA DE APROBACIÓN**

Informe aprobado por:

Director: -----  
Nombre completo y firma

-----  
Nombre completo y firma

-----  
Nombre completo y firma

Fecha: -----

Autor: -----  
Nombre completo y firma

**“El sentido del conocimiento, y, por tanto, también la medida de su autonomía, no se puede explicar de ningún modo si no es mediante el recurso a su relación con el interés.”**

**Jürgen Habermas**

**“Uno no debería desanimarse por la necesidad de éxito, sino que debería intentar nuevamente sin importar haber fallado. Es incluso bueno repetir experimentos exitosos un número de veces. Todo lo que es posible ver no es descubierto y con frecuencia no será descubierto la primera vez.”**

**Scott Gilbert**

## **AGRADECIMIENTOS**

El amplio tiempo de trabajo dedicado a la elaboración de esta tesis de grado me ha dado la oportunidad de sumergirme en el fascinante universo conceptual y práctico de una de las ramas de la nueva biología humana, la investigación con células tronco. La biología de células tronco, de importancia central para este trabajo, es además una disciplina relativamente joven, en plena efervescencia, en la que se suceden constantemente nuevos hallazgos con importantes repercusiones conceptuales de los que no se puede prescindir. No ha sido una tarea fácil, pero sí enriquecedora.

Ahora bien, está claro que esta aventura no habría podido llegar a término sin la colaboración de muchas personas a las que profundamente debo agradecer.

Quiero, agradecer a:

- Dra. Milka Bengochea, directora de este trabajo y principal responsable de mucho de lo bueno y nada de lo malo que pueda haber en él, por su paciencia y su apoyo constante.
- Dra. Ines Alvarez, directora del Instituto Nacional de Donación y Trasplantes de Células Tejidos y Órganos (INDT) quien me abrió las puertas y me animó a realizar la tesis.
- Quien fue mi colaborador durante todo el tiempo de trabajo, a quien ante todo lo considero un amigo Dr. Roberto Toledo. Aprendí de él a perder el miedo de un principiante frente a una responsabilidad mayor en un laboratorio, brindándome las herramientas necesarias para poder llevar a cabo la pertinente tarea, las largas conversaciones que hemos mantenido han sido siempre de gran valor para mí, ha leído versiones de la tesis o de partes de la misma y ha contribuido a su mejora, en conclusión ha hecho posible que este trabajo llegue a buen término.
- Hemoterapeuta Marta Sosa, quien con su gran conocimiento y experiencia nos permitió corregir algunos procesos y así obtener resultados confiables. Siempre recuerdo sus cuentos y anécdotas.
- Hemoterapeuta Nilo Bentancor, con quien compartimos muchas charlas sobre las células CD34<sup>+</sup> entre otras cuestiones.
- Todo el grupo del INDT quien ha colaborado incondicionalmente para que esta pasantía fuese posible.

- Mi tutora de la carrera y quien siempre me ha ofrecido apoyo total en mis intereses profesionales particulares, la Dr. Gabriela Bedó. A ella con quien siempre estaré en deuda.

- Debo finalmente, y ante todo, agradecer a toda mi familia, que ha contribuido con toda la paciencia y ha sabido reconocer mis esfuerzos.

## **RESUMEN**

La terapéutica basada en el uso de células tronco es todavía un campo controversial, de gran expectativa y oportunidades. La investigación básica así como la aplicada sigue siendo necesario para comprender la biología de estas células. Para tales fines, es fundamental disponer de células tronco en cantidades y en condiciones que garanticen la viabilidad de experimentos. En sangre periférica existe un número reducido de células tronco hematopoyéticas

En virtud de optimizar técnicas de aislamiento y generar estándares de conteo y evaluación de poblaciones de células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica sin previa estimulación medular, la concentración final y el número absoluto de células CD34<sup>+</sup> antes y después de cada procedimiento de concentración y purificación constituyen parámetros de referencia. En un empeño para establecer y validar un método rápido, eficiente y fácilmente reproducible para el aislamiento y la enumeración de estos progenitores, se llevaron a cabo un conjunto de ensayos basados en diferentes recomendaciones para concentración, purificación, análisis paramétricos y estrategias de gateo en citometría. Una vez establecido un protocolo, fueron realizados los ensayos utilizando dos estrategias de concentración/separación de células mononucleares (Ficoll Paque vs Buffy Coat) en vista a comparar los rendimientos de los procesos de concentración y aislamiento de células CD34<sup>+</sup>. En tales ensayos fueron procesadas 16 muestras de sangre periférica, 12 provenientes de donantes normales y 4 de individuos en condiciones de muerte encefálica. Todo lo anterior, con el propósito de validar el conteo y aislamiento según el experimento. A partir del producto de ambos métodos de concentración/separación de células mononucleares para diferentes donantes de muestras de sangre, se empleó un método de selección positiva de células CD34<sup>+</sup> basado en la utilización de perlas inmunomagnéticas (*Invitrogen, Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System*). Para la estrategia de gateo y conteo citométrico se siguieron las recomendaciones establecidas en los protocolos ISHAGE estandarizados por Sutherland *et al.*, 1996.

A partir de las diversas evaluaciones cuantitativas, se observó que en las muestras analizadas de sangre de donantes normales la concentración de células CD34<sup>+</sup> es de  $4,6 \pm 1,64$  células/ $\mu$ l, y con sangre de donantes en muerte encefálica es  $3,6 \pm 1,73$  células/ $\mu$ l. Luego de los diferentes procesamientos, la concentración de células CD34<sup>+</sup> fue incrementada hasta una concentración de  $36,27 \pm 29,46$  células/ $\mu$ l

en los procedimientos con Ficoll-Paque, y  $8,78 \pm 3,55$  células/ $\mu$ l en los procesamientos con la técnica de Buffy Coat. El rendimiento fue del  $4,6\% \pm 2,43$  para los procesamientos con sangre de donantes normales, y  $1,38\% \pm 01,3$  para los procesamientos con sangre de donantes en muerte encefálica. Finalmente, en relación al tipo de método de concentración de células mononucleares, los rendimientos neto fueron de  $7,52\% \pm 3,98$  para el método de Ficoll-Paque, y  $4,57\% \pm 2,48$  para los procesamientos con el método de Buffy Coat.

Por tanto se constató que el método Ficoll-Paque presenta mejor rendimiento general comparado con el método Buffy Coat,

El protocolo elaborado en este trabajo, permite de este modo, el acceso a células CD34<sup>+</sup>, evaluadas a partir de muestras de sangre periférica sin previa estimulación, mediante la conjunción de dos técnicas positivas de separación celular y mediante la tinción de las fracciones resultantes con un kit específicos para citometría de flujo.

**Palabras Clave:** Células Tronco, Antígeno CD34<sup>+</sup>, Ficoll-Paque, Citometría de Flujo.

## INDICE

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>VI</b>
<b>INDICE .....</b>	<b>VIII</b>
<b>PARTE I: .....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCCION .....</b>	<b>12</b>
<b>1. MARCO TEORICO .....</b>	<b>13</b>
<b>1. 1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....</b>	<b>13</b>
<b>1. 2 CÉLULA TRONCAL O MADRE: UNA CUESTIÓN TERMINOLÓGICA.....</b>	<b>14</b>
<b>1. 3 CÉLULA TRONCO: CRITERIOS PARA SU DEFINICIÓN Y ESTANDARIZACIÓN .....</b>	<b>14</b>
<b>1. 4 ¿QUÉ ES UNA CÉLULA TRONCO? (CONCEPCIÓN CLÁSICA ESTÁNDAR).....</b>	<b>15</b>
<b>1.4.1 Proliferación, regeneración y automantenimiento .....</b>	<b>16</b>
<b>1.4.2 Diferenciación .....</b>	<b>18</b>
<b>1.4.3 Células Transitorias/Amplificadoras y Tipos de División Celular.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4.4 Relativismo Funcional, Linajes y Potencialidades.....</b>	<b>22</b>
<b>1.4.5 Síntesis y Algunas Consideraciones Adicionales sobre la Concepción Clásica de Célula Tronco .....</b>	<b>22</b>
<b>1. 5 EL NICHU Y LAS CÉLULAS TRONCO .....</b>	<b>24</b>
<b>1.5.1 Anatomía Estructural .....</b>	<b>25</b>
<b>1.5.2 Anclaje, Señalización y Automantenimiento.....</b>	<b>26</b>
<b>1.5.3 Interacciones Bidireccionales .....</b>	<b>26</b>
<b>1. 6 CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS TRONCO: ORIGEN, TIPOS, FUENTES Y PROPIEDADES .....</b>	<b>26</b>
<b>1.6.1 Células Tronco Embrionarias .....</b>	<b>28</b>
<b>1.6.2 Células Tronco Fetales.....</b>	<b>30</b>
<b>1.6.3 Células Tronco Adultas .....</b>	<b>31</b>
<b>1. 7 ASPECTOS MOLECULARES: AUTOMANTENIMIENTO, POTENCIALIDAD, PLASTICIDAD Y REPROGRAMACIÓN .....</b>	<b>31</b>
<b>1.7.1 Automantenimiento y Potencialidad.....</b>	<b>32</b>
<b>1.7.2 Plasticidad y Reprogramación .....</b>	<b>34</b>
<b>1.7.3 Consideraciones Finales: Hacia una Teoría Sistémica.....</b>	<b>37</b>

1. 8	EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO Y LAS CÉLULAS TRONCO HEMATOPOYÉTICAS CD34 <sup>+</sup> .....	38
1.8.1	Ontogenia del Sistema Hematopoyético .....	40
1.8.2	Células Tronco Hematopoyéticas.....	41
1.8.3	Nichos de Células Tronco Hematopoyéticas .....	42
<b>PARTE II:.....</b>		<b>46</b>
<b>JUSTIFICACION DEL PROYECTO .....</b>		<b>46</b>
<b>OBJETIVOS GENERALES .....</b>		<b>47</b>
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS .....</b>		<b>47</b>
2	<b>METODOS Y MATERIALES .....</b>	<b>48</b>
1. 1	METODOLOGÍAS .....	48
2.1.1	Protocolo Piloto .....	49
2.1.2	Protocolo Final.....	51
2. 2	REACTIVOS Y TÉCNICAS .....	52
2.2.1	Muestras de Sangre .....	52
2.2.2	Anticoagulantes .....	53
2.2.3	Soluciones Buffer .....	53
2.2.4	Métodos de Separación .....	54
2.2.4.1	Gradientes de Densidad con Ficoll-Paque .....	55
2.2.4.2	Buffy Coat .....	56
2.2.4.3	Perlas Inmunomagnéticas Dynal .....	58
2.2.5	Citometría de Flujo .....	59
2.2.5.1	Principios de Funcionamiento .....	60
2.2.5.2	Tinción para Citometría.....	64
2. 3	MÉTODOS DE ANÁLISIS Y REGISTRO .....	65
3	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
3.1	VALORES BASALES PREVIOS AL PROCESAMIENTO DE LA SANGRE .....	66
3.1.1	Concentración de Células Mononucleares en Sangre .....	66
3.1.2	Concentración de Células CD34 <sup>+</sup> en Sangre .....	68
3. 2	MÉTODOS DE PROCESAMIENTO DE LA SANGRE.....	69
3.2.1	Concentración de Células Mononucleares post-Métodos de Concentración/Separación de Células Mononucleares .....	69

3.2.2	Factor de Concentración de Células Mononucleares post-Métodos de Concentración/Separación de Células Mononucleares .....	72
3.2.3	Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares .....	74
3.2.4	Factor de Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares .....	77
3.2.5	Concentración de Células CD34+ post-Método de Aislamiento Inmunomagnético.....	79
3.2.6	Rendimiento del Proceso de Aislamiento Inmunomagnético de Células CD34+ .....	82
3.2.7	Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34+ .....	84
3.3	PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS DE SANGRE .....	87
3.3.1	Concentración de Células Mononucleares post-Métodos de Concentración/Separación de Células Mononucleares .....	87
3.3.2	Factor de Concentración de Células Mononucleares post-Métodos de Concentración/Separación de Células Mononucleares .....	89
3.3.3	Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares .....	91
3.3.4	Factor de Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares .....	93
3.3.5	Concentración de Células CD34+ post-Método de Aislamiento Inmunomagnético.....	95
3.3.6	Rendimiento del Proceso de Aislamiento Inmunomagnético de Células CD34+ .....	97
3.3.7	Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34+ .....	99
4	DISCUSION.....	102
4.1	IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE LAS CÉLULAS TRONCO HEMATOPOYÉTICAS.....	102
4.2	CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES.....	104
4.3	CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS CD34+ EN SANGRE.....	104
4.4	CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES POST-MÉTODO DE CONCENTRACIÓN/SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES.....	105
4.5	FACTOR DE CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES POST-MÉTODO DE CONCENTRACIÓN/SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES.....	105
4.6	CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS CD34+ POST-MÉTODO DE CONCENTRACIÓN/SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES .....	106

4.7	FACTOR DE CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS CD34+ POST-MÉTODO DE CONCENTRACIÓN/SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES .....	106
4.8	CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS CD34+ POST-MÉTODO DE AISLAMIENTO INMUNOMAGNÉTICO .....	106
4.9	RENDIMIENTO DEL PROCESO DE AISLAMIENTO INMUNOMAGNÉTICO DE CÉLULAS CD34+ ..	107
4.10	RENDIMIENTO GENERAL DEL PROCESO DE CONCENTRACIÓN Y AISLAMIENTO DE CÉLULAS CD34+ .....	107
4.11	SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL Y USOS CLÍNICOS DE LAS HSCs.....	108
4.12	CÉLULAS TRONCO: UN DEBATE CIENTÍFICO EN SU CONTEXTO ÉTICO Y SOCIAL.....	110
5	CONCLUSIONES.....	113
6	BIBLIOGRAFIA.....	114
7	APENDICE.....	124
7.1	CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	124
7.2	SOLUCIONES BUFFER .....	125
7.3	DIAGRAMA DE LOS PROCEDIMIENTOS TÉCNICO.....	126
7.4	PROTOCOLOS TÉCNICOS.....	127
7.4.1	Extracción de la Muestra de Sangre de Donantes* Normales .....	127
7.4.2	Técnica de Separación/Concentración de Células mononucleares con Ficoll-Paque ....	127
7.4.3	Técnica de Separación/Concentración de Células mononucleares por Buffy Coat .....	128
7.4.4	Técnica de Conteo en Cámara Neubauer.....	128
7.4.5	Técnica de Aislamiento Inmunomagnético de Células CD34+ (Perlas Dynal).....	128
7.4.6	Tinción para Citometría .....	130
7.5	PANEL DE HISTOGRAMAS Y GATES PARA CONTEOS DE CÉLULAS CD34+ EN CITOMETRÍA .....	131

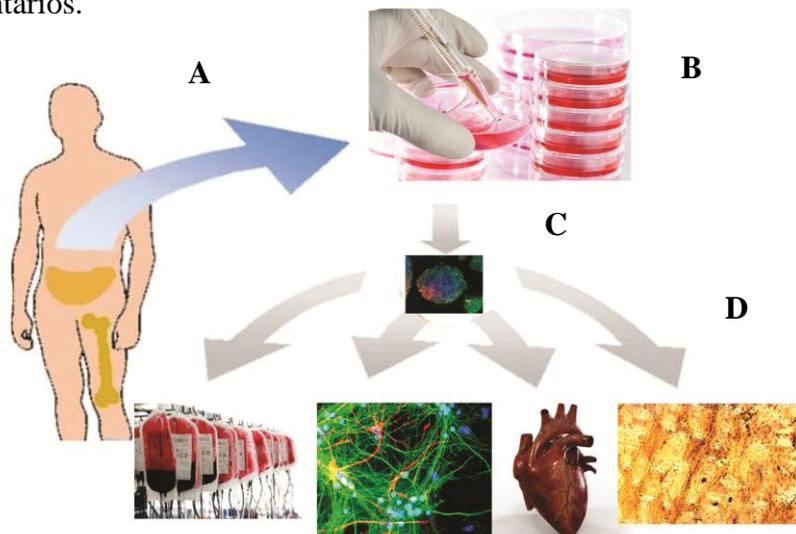
## PARTE I:

### INTRODUCCION

En la actualidad, el avance y el entusiasmo que rodea a las células tronco, se debe a su potencial para revertir la condición de las patologías que tienen gran incidencia sobre todo en las sociedades industrialmente más desarrolladas como el cáncer, la diabetes, las diferentes cardiopatías, la enfermedad de Alzheimer entre otras, mediante el trasplante, proliferación y diferenciación de estas células, para poder restaurar las lesiones estructurales en órganos y tejidos afectados por aquellas patologías que no son reparables con los métodos disponibles en la actualidad (Andersson & Lendahl, 2009).

Recientes progresos en la investigación que utiliza tecnología de células tronco como es la generación de células troncales pluripotenciales inducidas (células iPS), han otorgado gran expectativa y han propulsado a la medicina regenerativa (Wenyan & Dong-An, 2012).

La necesidad de disponer de células tronco para experimentación en laboratorio, se ve favorecida al contar con protocolos que optimicen su concentración en condiciones que no exijan la administración de factores de crecimiento en los donantes voluntarios.



**Figura 1: Medicina Regenerativa:** Esquema conceptual que muestra de forma sintética e idealizada la estrategia en la cual se fecunda la medicina regenerativa: A- Aislamiento de células tronco adulta, B- cultivo para expandir la población de células tronco y reprogramación de las mismas, C- generación de cuerpos embrioides (etapa facultativa) y D - diferenciación hacia algún linaje del tejido lesionado o producción del órgano lesionado mediante ingeniería tisular. Conjunto de imágenes obtenidas y editadas a partir de búsqueda en internet.

## **1. MARCO TEORICO**

### **1. 1 Antecedentes Históricos**

En la década de 1850 Robert Remak (1815–1865), Albert Kölliker (1817–1905) y Rudolf Virchow (1821–1902) demostraron que las células se formaban a partir de la fragmentación de otra célula previa, lo que se sintetiza en el aforismo del propio Virchow *omnis cellula e cellula* (todas las células provienen de otras células). El trabajo de Virchow *Cellularpathologie* (Patología Celular) estableció los enunciados de la teoría celular clásica. Esta teoría estimuló la metodología reduccionista para los problemas biológicos de la época, y se transformó un paradigma estructural de la biología. Las células fueron vistas como los elementos básicos del proceso patológico. Las enfermedades pasaron a ser consideradas entonces (independiente del agente causal) como una alteración de las células de los organismos (Mazzarello, 1999).

En el siglo XX estuvieron disponibles las primeras técnicas de cultivos celulares, condición necesaria para poder indagar en la complejidad funcional del estudio de las células y de los tejidos.

La utilización de células troncales en investigaciones data de la década de 1950. El equipo liderado por E. Donnall (ganador del Nobel) demostró que la infusión intravenosa de células derivadas de la médula ósea tiene la capacidad de reconstruir la médula ósea y generar nuevas células sanguíneas en pacientes cuya médula fuera tratada con quimioterapia.

Las primeras descripciones cuantitativas de la capacidad regenerativa en los trasplantes de médula ósea fueron documentadas por dos investigadores canadienses, James E Till y Ernest A McCulloch entre 1960-63 (Till & McCulloch, 1961)

Los estudios de Till y McCulloch demostraron la naturaleza “clonal” y expansiva del sistema hematopoyético. A partir de sus experimentos se observó, primero que las células de la médula ósea pueden reconstruir el sistema hematopoyético y por lo tanto tiene la capacidad de recuperar un animal receptor que fuera previamente irradiado letalmente, y segundo que a través de trasplantes seriados se constató la capacidad de autorenovación de las células de la médula de origen, ya que cuando las células de las colonias esplénicas formadas en el primer receptor eran trasplantadas hacia un segundo animal también letalmente irradiado, se encontraban nuevamente glóbulos rojos y blancos en los animales receptores.

En base a estos experimentos, las células de la médula ósea fueron definidas como células con capacidad de autorenovación y de diferenciación multilínea<sup>1</sup>.

A partir de entonces, los abordajes sobre este tema se han multiplicado y, con la tecnología de los cultivos de celulares, su aplicación en la medicina regenerativa e ingeniería tisular se ha convertido en el área más extensa de la investigación biomédica.

## 1.2 Célula Troncal o Madre: Una Cuestión Terminológica

Es importante también hacer aquí una aclaración semántica, ya que normalmente, tanto en los medios de comunicación como, incluso, dentro de la propia comunidad científica, se ha utilizado ampliamente el término/concepto *célula madre* el cual resulta ser incorrecto como traducción del término original inglés (*stem cell*). En inglés, “stem” significa “tronco”, no “madre”. En el Vocabulario Científico de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (3ª edición, 1996) se incluye el término “célula tronco” como sinónimo de “célula pluripotencial” o “célula pluripotente”, pero esto no incluye el término “célula madre”. Tampoco el Diccionario de la Lengua Española de la RAE (22ª edición, 2001) incluye el término “célula madre” con el significado conceptual de célula troncal.

De hecho, la palabra “stem” (del inglés: tronco o tallo) fue utilizada por botánicos, para describir justamente estas estructuras de las plantas, y donde fue demostrada la existencia de estas células en las raíces apicales y meristemas de vástagos, que son responsables de la competencia regenerativa de las plantas.

Estas razones justifican, por lo tanto, que en este trabajo se haya optado por la utilización del término **célula troncal** o célula **tronco**.

## 1.3 Célula Tronco: Criterios para su Definición y Estandarización

La biología de las células troncales ha acaparado buena parte de la atención del ambiente científico en los últimos años, como se ha resaltado anteriormente. Si bien el campo de la biología de células tronco ha crecido de forma rápida y

---

<sup>1</sup> Tanto la palabra como el concepto de autorenovación que es aplicado como característica típica de todas las células tronco, así como la capacidad diferenciación multiplaje serán cuestiones analizadas profundamente en las siguientes secciones con el fin de reconocer sus limitaciones e implicancias en las determinaciones experimentales.

sostenida, aún existe considerable confusión y desacuerdo sobre la verdadera naturaleza de estas células (Lanza *et al*, 2009).

Uno de los mayores problemas que surge cuando se intenta definir qué es una célula tronco es, que históricamente se partió de las características funcionales observadas en los experimentos con grandes poblaciones celulares (Potten & Loeffler, 1990), luego se extrapola para caracterizar una célula individual. Otro aspecto conflictivo surge del hecho más general de que para probar un atributo funcional es necesario demostrar su existencia, lo que requiere la manipulación experimental de las células para el proceso del ensayo, que en sí mismo puede alterar dicha característica. Sumado a lo anterior está además la particularidad de que en su estado “homogéneo” estas células no son *a priori* distinguibles morfológicamente.

Esto exige, como primera necesidad, de tener en cuenta para una descripción apropiada de estas células, que los términos empleados deban ser seleccionados de tal manera que eviten ambigüedades y que el protocolo de manipulación para reconocer una determinada característica también deba ser considerado a la hora de concluir tal o cual resultado (Potten & Loeffler, 1990), y como segunda premisa la necesidad de actualizar y reformar los conceptos mediante la incorporación de recientes evidencias y atributos que toman en cuenta los mecanismos regulatorios de los tejidos basados en la interacción célula-célula y célula-entorno a nivel poblacional (Loeffler & Roeder, 2002).

Una descripción conceptual basada en las relaciones célula-célula y célula-entorno permitirá, entre otros aspectos, observar y reconocer la emergencia de la heterogeneidad celular y tisular a través de la plasticidad dependiente de contexto como resultado de procesos de regulación dinámica.

#### **1. 4 ¿Qué es una Célula Tronco? (Concepción clásica estándar)**

Como se mencionó antes, las células tronco han sido definidas en virtud de sus atributos funcionales, y aquí solo recapitularemos las premisas básicas que han formado un concepto consistente con el rol biológico de estas entidades vinculado a características funcionales sobre la regeneración de tejidos. Por tanto se hace explícito que esta concepción ha sido construida en base a estudios en poblaciones de células tronco de los tejidos adultos. Esto ciertamente impone límites y dificultades como se ha comentado y su extrapolación a otros tipos de células tronco demanda la descripción de las particularidades del contexto.

Definiremos inicialmente a las células tronco como:

- Indiferenciadas, esto es, que no presentan morfología altamente especializada. Presentan marcadores exclusivos ausentes en células especializadas funcionalmente (inmunofenotipo).
- Capaces de proliferar, regenerar y automantenerse en determinadas condiciones.
- Capaces de producir progenie de células progenitoras/amplificadoras, a través del mecanismo de división asimétrica. Esto establece un proceso de amplificación, en donde las sucesivas progenies gradualmente “maduran” hacia la especialización funcional y dan origen en última instancia a los discretos linajes de células altamente especializadas y funcionales de los tejidos.

Las propiedades citadas antes constituyen una síntesis de las encontradas en la inmensa mayoría de los trabajos publicados y libros especializados sobre la temática, y son suficientes para nuestros propósitos (ver: Bongso & Lee, 2010; Kolios & Moodley 2013; Lanza *et al.*, 2009 y Loeffler & Roeder, 2002).

Por tanto, de forma idealizada, para poder categorizar una célula o población de células como célula tronco todos estos criterios deberían cumplirse en un determinado momento, sin querer otorgar el derecho de exclusividad. En relación a lo anterior hay que tener presente siempre el hecho de que las limitaciones experimentales solo permiten la comprobación de algunas propiedades funcionales y que la ponderación de los diferentes criterios podrá variar en las diferentes poblaciones.

A continuación se describirán los procesos que conforman algunas premisas conceptuales.

#### **1.4.1 Proliferación, regeneración y automantenimiento**

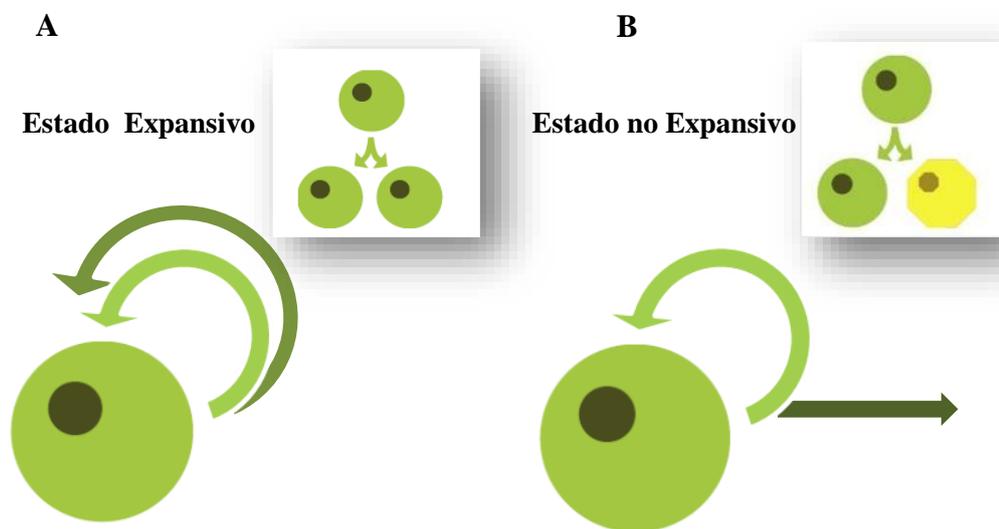
Proliferación es todo el conjunto de procesos metabólicos que involucra un patrón cíclico y secuencial de cambios altamente regulados y sincronizados en la expresión génica y en la interacción de proteínas, que conduce últimamente a la división física de la(s) células(s) (Morgan, 2007). El evento que gobierna este sistema de control, que comanda su duración y coordinación es el ciclo celular.



descendencia es idéntica en todo los sentidos incluyendo genética y epigenéticamente, a su progenitor.

*Replicación* implica duplicación o repetición y tiene connotaciones algo similares a reproducción; y *autoreplicación* implica por tanto producción de pares idénticos.

*Regeneración* refiere a hacer de nuevo/otra vez algo que ya existía. Podría ser aplicado a tejidos o población de células y sería tal vez más apropiado utilizarlo en conexión con otros procesos.



**Figura 3: Proliferación y automantenimiento:** Representación que ilustra en términos de células individuales los procesos de automantenimiento, y autoreproducción. En **A)** se observa que hay automantenimiento con replicación, debido a que se trata de una división simétrica lo que resulta en aumento del número de células en la población. Ya en **B)** hay automantenimiento con preservación del número total de células, ya que se trata de una división asimétrica, y solamente una célula tronco es conservada. Modificado de De Boer *et al.*, 2008.

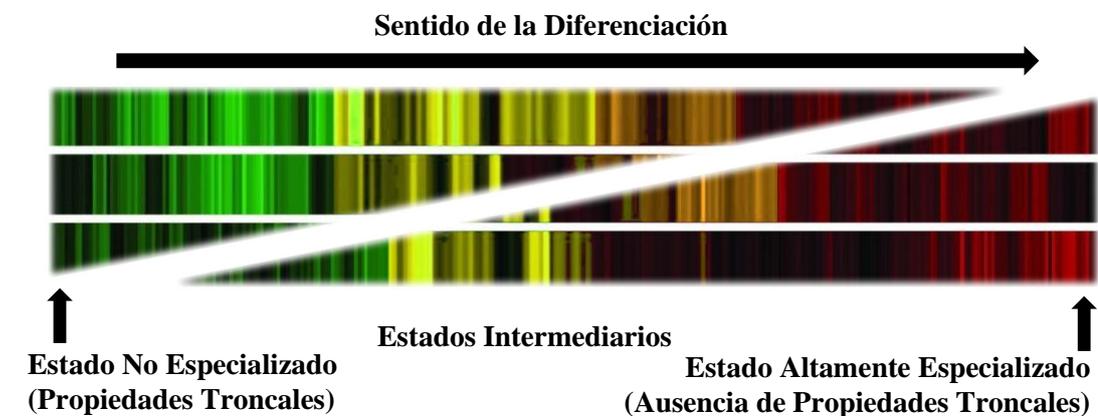
## 1.4.2 Diferenciación

Puede ser muy generalmente definida como la serie de eventos que conduce a cambios cualitativos graduales en el fenotipo celular y que es consecuencia de la expresión genética diferencial, sea esta sobre un gen o conjunto de “nuevos” genes, que se expresa(n) en niveles particularmente regulados (Pepper *et al.*, 2007). Esta síntesis regulada de una o un set de proteínas particulares puede ser reconocible por cambios en la morfofisiología celular o por la presencia de nueva actividad enzimática, que le otorguen la especialización funcional a las células consideradas.

De acuerdo con esta definición, las células se diferencian desde un estado “primitivo”<sup>2</sup> hacia un estado de competencia funcional a través de una serie de eventos cada uno vinculado a un nuevo patrón de activación génica.

En algunas circunstancias se torna útil considerar algunos marcadores moleculares (presencia o ausencia de) como indicadores de troncalidad o diferenciación.

Por el hecho de ser un cambio principalmente cualitativo, una célula puede ser diferenciada solo en relación a otra célula.



**Figura 4: Diferenciación:** Ilustración con código de colores totalmente arbitraria que pretende representar el proceso de diferenciación mediante la modificación del patrón de expresión genómica. Así, a medida que una célula tronco pasa de un estado no especializado representado por la activación de un número particular de genes exclusivos para esta condición (en verde), el patrón de expresión genómico es modificado y pasa a expresar genes que le otorgan gradualmente especificidad funcional y morfológica.

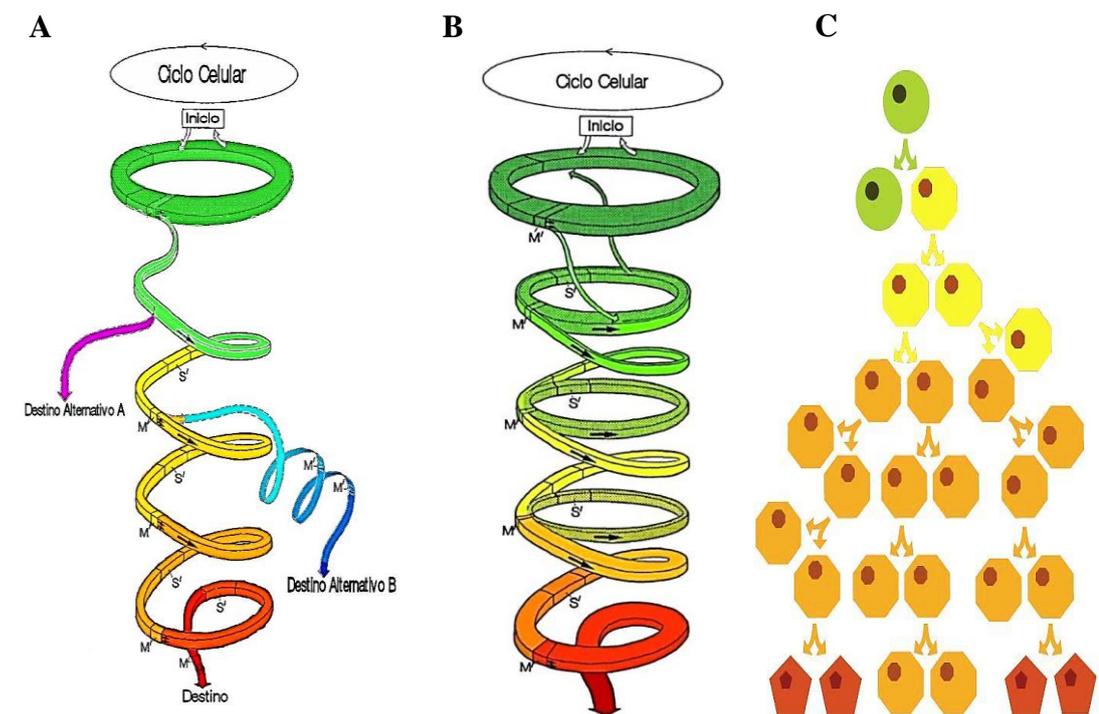
### 1.4.3 Células Transitorias/Amplificadoras y Tipos de División Celular

Las células transitorias/amplificadoras constituyen una población celular con capacidad proliferativa, localizadas (en términos relativos) entre las células tronco y las células altamente especializadas (Lajtha, 1979; Gilbert & Lajtha, 1965; Potten & Loeffler, 1990; Díaz-Flores Jr, *et al.*, 2006). De ahí que se espere que esta población de células transitorias/amplificadoras comparta algunas propiedades en común con las células tronco y otras propiedades con las células especializadas de los tejidos, estableciéndose como una población transitoria (por que se encuentran en tránsito hacia posibles destinos).

<sup>2</sup> Primitivo por el hecho de que las características que exhiben las células tronco están vinculadas o son remanentes de las propiedades de las células embrionarias y que se desvanecen en el proceso de especialización, estableciendo así una relación ontogénica.

Dentro de las propiedades que esta población de células comparte con las células tronco, está la capacidad de reproducción/replicación. En la medida en que esta población se divide, ocurre que las propiedades troncales o de *troncalidad* van gradualmente dando lugar a propiedades especializadas que se expresan en las células descendientes. De ahí el hecho de considerar que esta población está destinada a adquirir competencia funcional.

Otra manera de interpretar y visualizar la transición entre el estado troncal y la competencia funcional sugiere que la población de células transitorias/amplificadoras retiene la capacidad de automantenimiento. Esa propiedad se va perdiendo en las sucesivas generaciones de descendientes. En este caso la característica distintiva entre las poblaciones de células tronco y las transitorias/amplificadoras no sería la de automantenimiento sino la máxima capacidad de autorenovación.

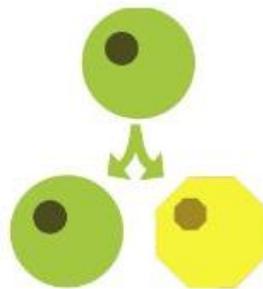


**Figura 5: Modelos de espiral para el proceso de especialización.** Ilustra el proceso de diferenciación mediante dos modelos en espiral (**A** y **B**) donde se intuyen cambios graduales en las características morfológicas y funcionales de las células. Así, a medida que las células tronco se dividen, dan lugar a la población de células transitorias/amplificadoras, que presentan menor probabilidad de automantenimiento y gradualmente adquieren características especializadas. **C**) Ilustración que permite visualizar la población de células transitorias/amplificadoras en el proceso de especialización y reconocer su analogía con los modelos de espiral. A y B modificados de Potten & Loeffler, 1990, y C modificado de De Boer *et al.*, 2008.

En el intento de dar entendimiento al proceso de acoplamiento entre división celular y la decisión de automantenerse o diferenciarse, se ha propuesto la idea de que las células tronco llevan a cabo un tipo de división celular de carácter irregular denominada división asimétrica (Loeffler & Roeder, 2002). Así, por medio de este tipo de división, las células tronco serían capaces de gestionar de manera simultánea en un único proceso divisorio las cualidades de automantenimiento y la de generar progenie diferenciada (Morrison & Kimble, 2006). Mucho se ha escrito sobre este tipo de división. Se han investigado de manera exhaustiva los procesos subyacentes (Horvitz & Herskowitz, 1992; Knoblich, 2008, Gönczy, 2008), a partir de los cuales se han propuesto diversos mecanismos moleculares (intrínsecos y extrínsecos) que pretenden evidenciar las consecuencias que responden en función de este tipo de división.

Se ha sugerido no considerar estas características como una propiedad necesaria y obligatoria para caracterizar a las células tronco de los tejidos adulto<sup>3</sup> (Loeffler & Roeder, 2002), argumentando que la idea de división celular simétrica o asimétrica es potencialmente engañosa para este propósito.

Así, la división celular asimétrica no constituye necesariamente un atributo para reconocer a las células tronco, pero puede verse como una propiedad facultativa que estas células administran para regular y mantener la homeostasis en los tejidos.



---

**Figura 6: División Celular Asimétrica.** Ilustración que captura la idea general sobre la división celular asimétrica donde una célula da origen a dos células, una que es idéntica a sí misma y por tanto mantiene las propiedades tronco y otra que por algunos motivos (intrínsecos y/o extrínsecos) no conserva tales características. Modificado de De Boer, 2008.

---

<sup>3</sup> Otro aspecto a tener en cuenta es que la mayoría de lo que se sabe sobre la división asimétrica proviene de estudios en modelos de animales invertebrados como es el caso del embrión de *C.elegans* y de neuroblastos en *D. melanogaster*. A pesar de esto, se han identificado principios celulares y moleculares evolutivamente conservados en estudios más recientes en vertebrados.

#### **1.4.4 Relativismo Funcional, Linajes y Potencialidades**

Un criterio asumido sobre las células troncales es que estas representarían un estado no especializado, o de indiferenciación, cuando son comparadas con células funcionales especializadas de los tejidos. Este concepto se ha construido sobre la idea de que las células tronco de los tejidos son el sustrato inicial, localizado en la base de un proceso de amplificación conectado a la diferenciación y producción de células funcionales especializadas terminales, teniendo como intermediario a la población de células transitorias/amplificadoras.

Por lo tanto este criterio de células tronco como células indiferenciadas es fundamentalmente una definición relativa ya que vincula las características de las células tronco con la de las células especializadas o relaciona estas con células en estadios tempranos del desarrollo (Potten & Loeffler, 1990; Loeffler & Roeder 2002).

Algunos autores no consideran un criterio obligatorio el que las células tronco de los tejidos adultos exhiban la capacidad de generar múltiples linajes celulares, pero la mayoría<sup>4</sup> de los tejidos estudiados hasta el momento presentan un compartimento común de células tronco responsables de generar los diferentes linajes celulares presentes en este. Así, cualquier relación existente entre células tronco y potencialidad siempre debe estar especificada con respecto al tejido de origen y a las circunstancias particulares de cada experimento.

Además en algunos experimentos muy puntuales se ha observado otra capacidad particularmente interesante, denominada plasticidad, que es la habilidad que las células tronco de un tejido particular lleguen a producir células de otro tejido (Temple, 2001). Esta y otras características son discutidas más adelante.

#### **1.4.5 Síntesis y Algunas Consideraciones Adicionales sobre la Concepción Clásica de Célula Tronco**

A modo de conclusión, sintetizaremos la visión preliminar definiendo a las células tronco de los tejidos adultos como capaces de automantenimiento mediante

---

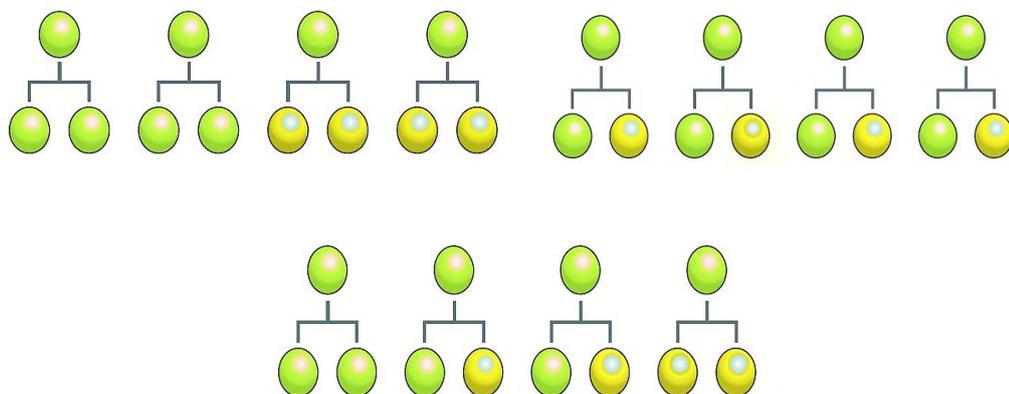
<sup>4</sup> Uno de las pocas células tronco estudiadas hasta el momento que se sabe dan lugar únicamente a un solo tipo de células especializadas, son las células primordiales germinales, las cuales dan origen a las células gametos.

reproducción, regeneración, y con capacidad de dar origen al/los diferentes linajes del tejido particular.

Sin embargo uno de los grandes problemas, como ya se mencionó, que aparece al intentar definir las células tronco, se manifiesta al extrapolar las conclusiones de los experimentos que manejan poblaciones de células para luego caracterizar una célula individual.

Un buen ejemplo para visualizar lo anterior surge cuando analizamos desde un nivel de células individuales, aquellas células que producen dos células hijas que no tienen propiedades troncales, no podrían ser consideradas como células tronco ya que no satisfacen la premisa de automantenimiento. Pero sin embargo la definición es aplicable a una población de células donde se observe que ese nivel se cumple con el criterio de automantenimiento, a pesar de que en esta, puedan existir células individuales que no cumplan con el criterio

Es posible por tanto observar que la definición de células tronco en relación al tamaño del compartimento representa un problema de carácter experimental, del concepto teórico e inclusive ontológico.



**Figura 7: Estrategias Poblacionales de División de Células Tronco.** Las ilustraciones representan algunas posibles variaciones en la estructura de poblaciones de células tronco haciendo referencia a la forma en como administran facultativamente el modo de división asimétrica. **A)** Las células en esta población realizan divisiones exclusivamente de carácter simétrico, generando únicamente células tronco o células destinadas a diferenciarse. **B)** Las células de esta población solamente realizan divisiones asimétricas generando células tronco y células destinadas a diferenciarse en cada división. **C)** Población mixta, donde coexisten células con diferentes tipos de división. A pesar de las diferencias en la estructura, a nivel de poblaciones satisfacen con los criterios que caracterizan a las células tronco, lo que no necesariamente se cumple a nivel celular. Modificado de Morrison & Kimble, 2006

Otro problema que se presenta al considerar las propiedades que manifiestan las células tronco se da en relación a su potencial para generar diferentes linajes celulares. Esto no es puramente una propiedad intrínseca, sino el resultado de las interacciones entre la población de células tronco, y los diferentes microambientes que experimentan las progenies.

Para ampliar y enriquecer esta visión estándar de células tronco, se describirán los componentes y características del entorno en el cual se encuentran y con los cuales interactúan estas células.

## 1. 5 El Nicho y las Células Tronco

La existencia teórica de un compartimento o microambiente fisiológicamente especializado para regular el comportamiento de las células tronco fue propuesto por Schofield (Schofield, 1978), quien acuñó el término **nicho** para tal compartimento. En los últimos años se han estudiado exhaustivamente las nociones sobre el rol del nicho en el comportamiento de las células tronco, que además de ser considerado un entorno modulador del comportamiento, podría inclusive ser reconocido como una interface para la comunicación de información sobre el estado y las demandas del tejido e inclusive del organismo, hacia las células troncales (Lander *et al.*; 2012). Esto establecería capas de “diálogo” bidireccional entre los órganos, tejidos y células que permitiría una remodelación continua dependiente de la función particular del tejido y del metabolismo general de organismo.

Por otro lado, cuando las células por algún motivo<sup>5</sup> se “desconectan” del nicho, quedan expuestas a una multitud de nuevas señales que sobre condiciones no alteradas inducen la diferenciación. Sin embargo, eventualmente y bajo una condición de transformación celular, puede ocurrir que las células abandonen el nicho original y se establezcan en otro microambiente permisivo lo que conduce generalmente a procesos de invasión metastásica.

Para hacer conjeturas sobre la biología de las células tronco, se hace primordial la referencia a los componentes y particularidades de los distintos nicho

---

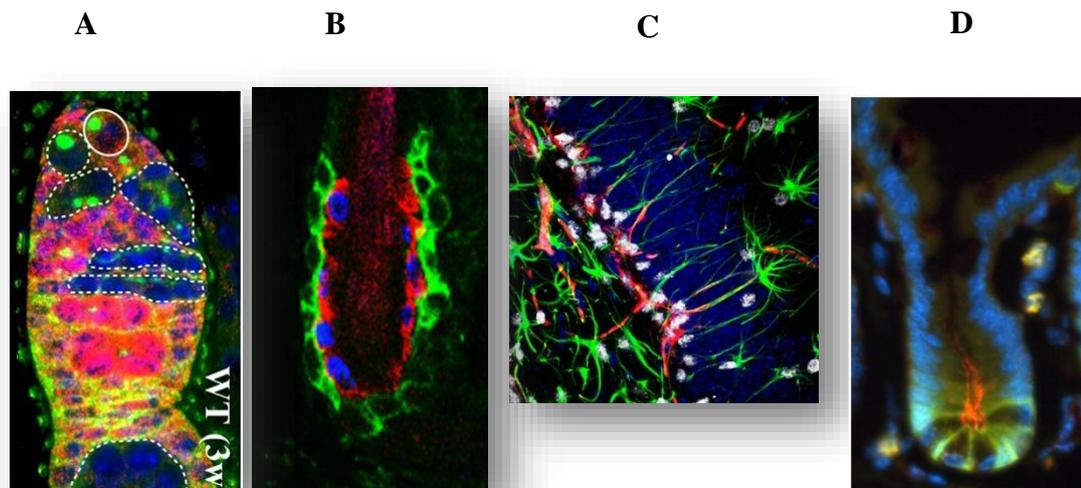
<sup>5</sup> Básicamente existen dos motivos principales por los cuales las células tronco pueden llegar a perder la conexión con el nicho: la propia división de las células tronco (en este caso la división asimétrica), o por algún motivo aberrante en la comunicación con las células del nicho, como es el caso de células malignas.

en la tentativa de formar una idea más integral del proceso de diferenciación y malignidad en base a su relación con el ambiente.

### 1.5.1 Anatomía Estructural

El nicho donde residen las células tronco es un espacio tridimensional constituido por un soporte molecular o más generalmente por un tipo o grupo de células, ubicado en una localización particular en los tejidos.

La arquitectura estructural de los diferentes nichos estudiados ha mostrado ser bastante variable, constituyéndose desde moléculas de la lámina basal del tejido conectivo hasta complejas estructuras anatómicas. Los diferentes componentes que integran cada nicho particular, proporcionan elementos, que garantizan, entre otras cosas, el mantenimiento de la población de células tronco (Spradling *et al.*, 2001).



**Figura 8: Estructura y Componentes de Algunos Nichos Caracterizados.** **A)** Nicho del linaje germinal en la ovariola de *D. melanogaster*, formado por las células de la capsula que asisten directamente a las células tronco germinales (verde entre los círculos), en colaboración con otros tipos de células (Xie & Spradling, 2001). **B)** Nicho del folículo capilar (pelo) en ratón, donde las células tronco epiteliales del pelo están localizadas en la protuberancia (que funciona como el nicho), debajo de la glándula sebácea. Además, la vaina dermal derivada de las células mesenquimáticas adyacentes también puede tener funciones de nicho (Neimann & Watt, 2001; Blanpain *et al.*; 2004) **C)** Nicho de las células tronco neurales del ratón adulto, localizado en dos regiones en el cerebro: la región subventricular (o endimaria) donde las células tronco neurales están en contacto con las células endimarias; y la región subgranular donde las células tronco están en contacto directo con vasos sanguíneos (Duan *et al.*, 2008). **D)** Una cripta intestinal donde se observa la posición (en v verde) en la base de la cripta (Bach *et al.*, 2000).

### **1.5.2 Anclaje, Señalización y Automantenimiento**

El nicho funciona, entre otras cosas, como una estructura física para el anclaje de las células tronco. Para este propósito se utilizan diferentes categorías de proteínas de adhesión celular como N y E caderinas, integrinas y  $\beta$ -catenina entre otras (Fuchs *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2003; Song y Xie, 2002). Este anclaje brinda además elementos moleculares de interacción/integración para que las células ancladas se mantengan en estado trocal a través de la inhibición de la diferenciación y también para modular la tasa de proliferación según la necesidad del tejido. Además de mantener una interacción molecular física, las células que componen el nicho secretan una gran variedad de factores que de una manera extrínseca modulan el número y el destino de las células tronco. Múltiples rutas moleculares señalizadoras están involucradas en la regulación del comportamiento de las células tronco. La presencia de componentes evolutivamente conservados de múltiples rutas regulatorias del desarrollo afianza la idea acerca de que las células tronco retienen la capacidad de responder a estas señales reguladoras y que la orquestación de estas señales es esencial para la “correcta” modulación del comportamiento de estas células.

### **1.5.3 Interacciones Bidireccionales**

Al mismo tiempo que el nicho es un “agente” que en parte modula extrínsecamente el comportamiento de las células tronco, este también responde y es por tanto influido por las células tronco. Además, tanto el nicho como las propias células tronco están en parte vinculados a las influencias y/o alteraciones metabólicas sistémicas del organismo (Drummond-Barbosa, 2008).

## **1. 6 Clasificación de las Células Tronco: Origen, Tipos, Fuentes y Propiedades**

Después de exponer estos conceptos generales sobre las características intrínsecas, en conjunto con algunos componentes y factores externos, que operan para dar formato al modo de comportamiento que definen a las células tronco, se

proseguirá con la descripción de las pautas de clasificación que permiten ordenar a las células tronco en diferentes subtipos.

La clasificación de las células tronco se construye principalmente en torno dos amplios criterios que son, el origen y el potencial, dado que entre estos existe un vínculo ontogénico<sup>6</sup> (Bongso & Lee, 2005).

En base al origen se las puede clasificar, de forma muy general, a las células troncales en dos amplias categorías: células tronco embrionarias y células tronco adultas. Para ofrecer una descripción más extendida que permita vislumbrar la relación entre el estadio del desarrollo y las propiedades de cada subtipo, se clasificarán a las células tronco en tres<sup>7</sup> grandes grupos: células tronco embrionarias, células tronco fetales (donde se incluyen las células tronco de cordón umbilical), células tronco adultas.

Por otro lado, según el criterio de potencialidad las células tronco pueden ser categorizadas como: *totipotentes o totipotenciales*, que tienen la capacidad de formar un organismo entero; *pluripotentes o pluripotenciales* capaces de dar origen a cualquier linaje derivado de las tres capas germinales de un embrión trilaminar incluyendo a las células de la línea germinal, con excepción de los tejidos extraembrionarios (trofoblasto) ; *multipotentes o multipotenciales* que tiene la capacidad de generar una gama de linajes diferentes pero no de todas las tres capas embrionarias; *oligopotentes u oligopotenciales* que pueden diferenciarse en pocos linajes distintos [generalmente dos (*bipotenciales*) o tres] y *unipotentes o unipotenciales* que forman células especializadas de un solo linaje (Bissels *et al.*; 2011).

Si bien aún no existe un consenso sobre los procesos moleculares subyacentes a la identidad *per se* de cada tipo de células tronco en los diferentes estadios del desarrollo y en los diferentes tejidos, algunas evidencias permiten reconocer que las diferentes categorías de hecho presentan una identidad singular. Esta identidad está en parte vinculada al patrón o estado epigenómico (ver sección 1.7.1) de las diversas categorías de células troncales (Spivakov & Fisher, 2007).

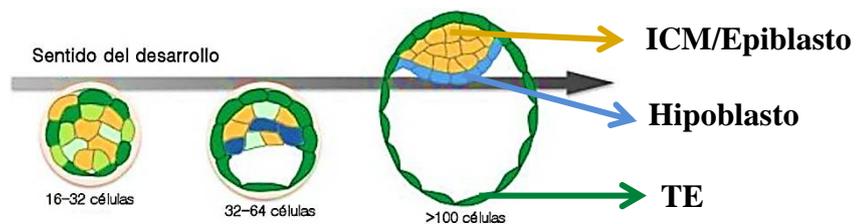
---

<sup>6</sup> Hace referencia al procesos del desarrollo; entendiendo como los cambios continuos que se dan en función del tiempo.

<sup>7</sup> A pesar de que otros tipos son también reconocibles como las células de teratocarcinomas, las células tronco germinales y las células tronco de cáncer.

### 1.6.1 Células Tronco Embrionarias

En los mamíferos, como en la mayoría de los animales, luego de la fecundación, prosigue una etapa caracterizada por una sucesión de divisiones del cigoto y sus descendientes blastómeras. En el estadio de 32 a 64 células el embrión, que ahora se denomina blastocisto, forma la cavidad del *blastocela*<sup>8</sup>, y se presenta estructuralmente como una esfera hueca constituida por una lámina de células denominadas trofoectodermo que dará origen al tejidos extraembrionarios del corion, y un acumulo interno de células en contacto con este, denominada masa celular interna (ICM; del inglés *inner cell mass*) (Marikawa & Alarcón, 2009) que darán origen a todos<sup>9</sup> los tejidos del embrión propiamente dicho, contribuyendo también con los tejidos extraembrionarios del saco vitelino, alantoides y amnios.



**Figura 9: Establecimiento de los primeros linajes en el embrión de ratón:** Ilustración que reconstruye la transición de un embrión temprano hasta el estadio de blastocisto, donde se distingue la localización de los diferentes linajes, masa celular interna/epiblasto (amarillo), hipoblasto (celeste) y trofoectodermo (TE) (verde). Modificado de Bergsmedh *et al.*, 2011.

Cunado las células de la ICM/epiblasto de un embrión<sup>10</sup> en etapa de blastocisto son aisladas y cultivadas *in vitro* bajo condiciones muy particulares que permiten la expansión clonal de las mismas, dan lugar a las células tronco embrionarias (ES; del inglés *embryonic stem*) o línea de células tronco embrionarias (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson *et al.*, 1998; Smith, 2001; Semb, 2005; Nichols & Smith, 2010).

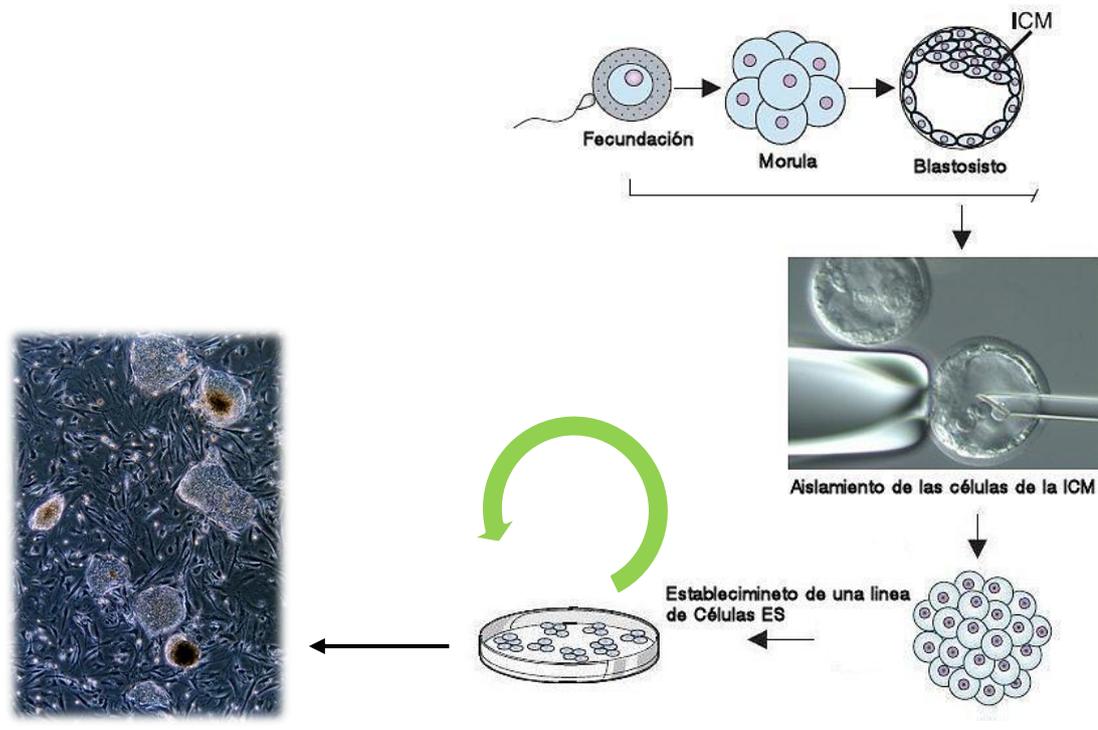
Sin embargo y a pesar de que las células ES deriven de la ICM, esto no significa necesariamente que las líneas de células ES son equivalentes a las células

<sup>8</sup> Es una cavidad que se forma en el embrión en estadio de blastocisto como resultado de un proceso denominado cavitación (Watson, 1992).

<sup>9</sup> De las tres capas germinales de un embrión trilaminar: ectodermo, mesodermo y endodermo.

<sup>10</sup> Las células ES inicialmente fueron obtenidas a partir de embriones de ratón (1981) y relativamente más tarde derivadas de embriones humanos (1998), a pesar de que la técnica comparte la mayoría de las etapas y condiciones.

de la ICM. Estas últimas existen únicamente de manera transitoria en el embrión en desarrollo antes de que experimenten diferenciación de manera inevitable y no operan, por tanto como un compartimento de células tronco verdaderas *in vivo*. El establecimiento de una línea de células ES involucra una configuración artificial que permite el automantenimiento de las células en esta fase originalmente transitoria de pluripotencialidad mediante la disrupción de las señales inductivas del microambiente embrionario original. Se debe entender entonces, que las propiedades que manifiestan estas células en cultivo son en parte producto de selección y adaptación a las condiciones particulares del cultivo.



**Diagrama 1: Metodología para la obtención de una línea de células tronco embrionaria:** De manera muy simplificada se detallan los principales pasos para el aislamiento y posterior cultivo de células tronco embrionarias, resaltando el origen de las ICM de un embrión en blastocisto. Modificado de Smith, 2001.

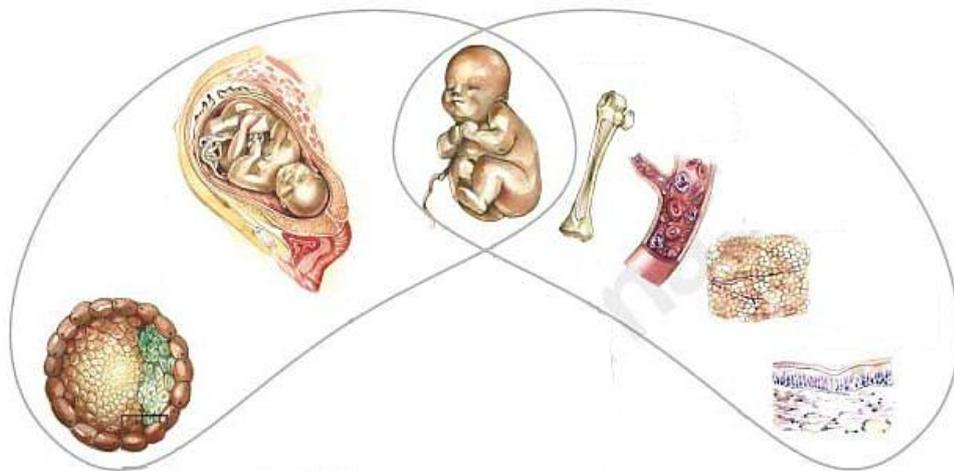
Durante mucho tiempo se pensó que las células ES constituía la categoría que tendría más posibilidades para futuros usos terapéuticos dado su privilegiado potencial de diferenciación. Sin embargo, como se verá más adelante, la tecnología de reprogramación celular ha encontrado una alternativa más eficiente, menos costosa y que resuelve, al menos parcialmente las implicancias éticas, para la obtención y manejo de células pluripotenciales.

## 1.6.2 Células Tronco Fetales.

Estas categorías de células son básicamente las que se encuentran en los nichos proliferativos de los órganos fetales. Si bien se han realizado, desde hace relativamente bastante tiempo, algunos ensayos puntales mediante el aislamiento de estas células a partir de fetos abortivos (Washington, 1997; Ranalli, 1999), aun representan un grupo poco estudiado en relación a los otros grupos de células tronco.

Estudios más recientemente han logrado progresos importantes y han permitido reconocer propiedades singulares dentro de este grupo, al tiempo que han ofrecido un conjunto de información relevante para la comprensión de la biología de las células tronco en general, inspirando nuevas estrategias para gestionar sus propiedades en futuras aplicaciones terapéuticas.

Las células tronco fetales pueden ser derivadas directamente desde los órganos del feto, o a partir de las estructuras anatómicas extraembrionarias de origen fetal donde se incluyen las células del líquido (In't Anker *et al.*, 2003), de la membrana amniótica (DeCopppe *et al.*, 2007), de la gelatina de Wharton<sup>11</sup>(Wang *et al.*, 2004), de la placenta (Fukuchi *et al.*, 2004) y del cordón umbilical<sup>12</sup>.



**Figura 12: Fuentes de las diversas clases de células tronco:** Las ilustraciones señalan los diferentes estadios del desarrollo y los tipos de células tronco que se corresponden. Así, es posible identificar y conjeturar sobre el posible grado de potencialidad relativa que pueden estar dotadas las células tronco fetales, lo que las torna una fuente muy prometedora para aplicaciones clínicas. Modificado de Nanog International LifeScience y disponible en:

<http://www.nanoginternational.com/international/eng/cellule-staminali.asp>

<sup>11</sup> Es el tejido mesenquimal rico en mucopolisacáridos que rodea al cordón umbilical.

<sup>12</sup> Tanto el origen como las aplicaciones terapéuticas de este tipo de células serán descritas en la sección 1.8.5.

### 1.6.3 Células Tronco Adultas

Este grupo de células tronco son la que se encuentran en los diferentes órganos y tejidos del organismo adulto<sup>13</sup>. Algunos de los subtipos más estudiados constituyen las células tronco intestinales, musculares, neurales, de la piel, y hematopoyéticas (tal vez las más estudiadas de las células tronco tanto en humanos adultos como en el modelo ratón). Debido a que este trabajo se realiza sobre este último tipo de células tronco, las mismas serán analizadas detalladamente en una sección exclusiva (sección 1.8).

## 1. 7 Aspectos Moleculares: Automantenimiento, Potencialidad, Plasticidad y Reprogramación

Desde el inicio de las investigaciones que llevaron al establecimiento de líneas de células tronco embrionarias en cultivo, la caracterización molecular de los procesos subyacentes al automantenimiento ha significado uno de los grandes desafíos en la biología de células tronco. Gran parte de tal caracterización, ha provenido de estudios sobre los requerimientos de los medios de cultivo que garantizan la expansión clonal de las células tronco embrionarias<sup>14</sup> (Liu *et al.*, 2006).

Describiremos de forma general, un conjunto de factores y vías moleculares que permiten que las célula tronco (principalmente las embrionarias) sean capaces de reproducirse y expandirse clonalmente, así como algunas propiedades, que ofrecen indicios sobre una naturaleza flexibles de las células tronco adultas (plasticidad). También mencionaremos algunos factores que en estrecha asociación con los primeros, ofrecen la posibilidad de reprogramar una célula diferenciada hacia uno estado pluripotencial tipo embrionario.

---

<sup>13</sup> Más específicamente, desde las etapas tempranas de la vida hasta la muerte.

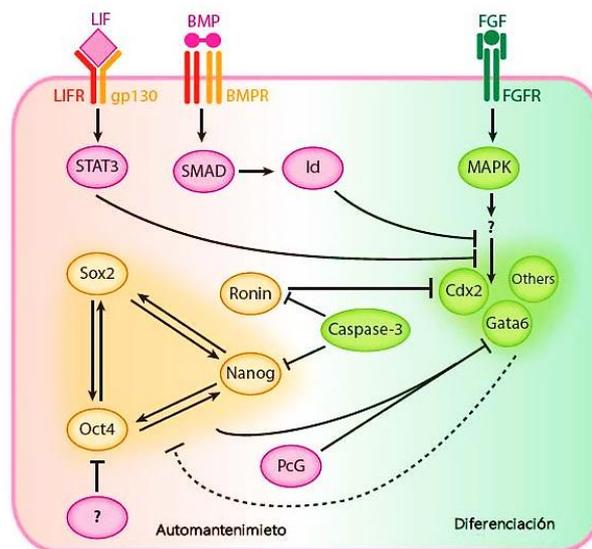
<sup>14</sup> Si bien la mayoría de lo que se sabe, es sobre la regulación del automantenimiento en células tronco embrionarias, en los últimos años se han comenzado a explorar también los mecanismos moleculares involucrados en el automantenimiento de las categorías de células tronco fetales y adultas.

### 1.7.1 Automantenimiento y Potencialidad

El proceso de automantenimiento está regulado, en las células tronco embrionarias, por un conjunto de factores intrínsecos y otro de factores extrínsecos que de manera exclusiva controla el perfil transcripcional y el ciclo celular.

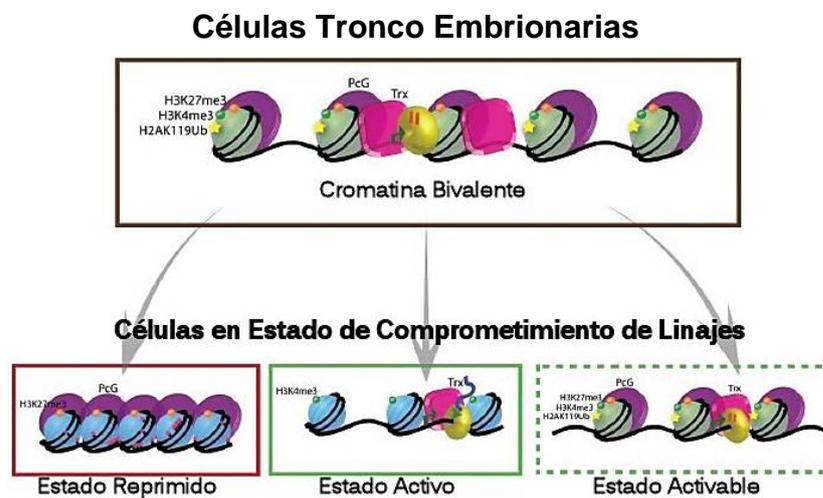
Así, de una manera intrínseca, los factores Oct4, Sox2 y Nanog conforman el núcleo de una red de circuitos que inducen la expresión de genes que conservan el estado pluripotente, al tiempo que reprimen genes que induce la diferenciación (Boyer *et al.*, 2005; Masui *et al.*, 2007 y Loh *et al.*, 2006). Estos tres factores de transcripción interactúan físicamente uno con el otro, y co-ocupan regiones reguladoras en muchos genes, permitiendo de manera coordinada regular el estado pluripotente. Además, estos factores regulan su propia expresión y mutuamente la del otro, formando una red de retroalimentación positiva. Por otro lado, dos conjuntos de factores extrínsecos operan para garantizar la conservación de estado indiferenciado mediante la inhibición de la diferenciación (Ying *et al.*, 2008).

La inhibición de la diferenciación representa por tanto un mecanismo común que opera bajo las acciones de los grupos factores intrínsecos y extrínsecos para garantizar la preservación del estado pluripotencial en cultivos de células ES.



**Figura 13: Mecanismos moleculares involucrados en la regulación del automantenimiento y conservación de la pluripotencialidad en células ES en cultivo.** El proceso de automantenimiento es controlado por un circuito molecular donde los factores Oct4/Sox2/Nanog son los elementos críticos, que forman una sistema de retroalimentación positiva, y que negativamente regula la expresión de genes promotores de la diferenciación. Además, los factores extrínsecos como LIF y BMP también tienen participación en la supresión de la diferenciación mediante la inhibición de la vía de señalización MAPK. Modificado de He *et al.*, 2009.

Más allá de las vías regulatorias, hay todo un marco de elementos regulatorios que cumple funciones críticas en la preservación de la identidad así como de la diferenciación tanto en las células ES como en las demás categorías de células tronco. Este marco es constituido por todo universo dinámico de factores que actúan sobre el DNA, conocidos como epigenómica. El conjunto de características epigenómicas así como la forma en cómo se conservan o alteran tras la división celular se estudiaron utilizando tecnología de alto desempeño como ChIP-on-chip y métodos relacionados, y esto conduce a proponer que el estatus de la cromatina tiene un rol central en la identidad celular y en la determinación de los espectros de diferenciación (Spivakov & Fisher, 2007; Sha & Boyer, 2009).



**Figura 14: Estructura de la cromatina en diferentes estados de las células tronco.** Los estados de pluripotencialidad atribuidos a las células tempranas del embrión así como a las diferentes líneas de células derivadas de este, se caracterizan por una estructura de cromatina que presentes ciertos dominios marcadores exclusivos como lo son la cromatina bivalente en regiones promotoras de genes maestros del desarrollo. Estas marcas van dando lugar a una estructura menos accesible de la cromatina, a medida que avanza el desarrollo, posibilitando la activación de programas génicos de destino o linaje particular y restringiendo, por consiguiente, el potencial de diferenciación de las células. Modificado de Sha & Boyer, 2009.

Hay otros procesos moleculares que también contribuyen al mantenimiento de la identidad e integridad genómica, determinan la configuración de un estado de pluripotencia, y protegen frente al deterioro o eventual malignización de las células tronco. La caracterización de todo este conjunto de vías y factores que de una manera operan coordinadamente y que cambian con el paso del tiempo, están comenzando a vislumbrar en detalles los mecanismos íntimos subyacentes a la identidad y propiedades que exhiben las diferentes categorías de células tronco lo que abre toda

una nueva visión sobre el proceso de diferenciación y requiere la búsqueda de protocolos que direccionen la diferenciación específica de las células tronco en cultivo.

### 1.7.2 Plasticidad y Reprogramación

A partir de distintos experimentos de trasplantes de células tronco, se han observado una serie de comportamientos que subyacen en el concepto de plasticidad celular (Temple, 2001; Graf & Envert, 2009). Así, *transdiferenciación* hace referencia al proceso de reconfigurar<sup>15</sup> un tipo especializado de células en otro tipo diferente sin la necesidad de un proceso intermediario de reprogramación a un estado de pluripotencia. *Transdeterminación* refiere a la reconfiguración de células comprometidas en un linaje (pero no diferenciadas en un estado último terminal) hacia células de otro linaje diferente. *Desdiferenciación* hace referencia al proceso en el cual células terminalmente diferenciadas revierten su estado hacia un estado menos diferenciado dentro del mismo linaje. Durante este proceso las células recuperan la capacidad de dividirse. Luego a continuación, las células pueden experimentar *rediferenciación*, que en algunas especies permite la regeneración de alguna parte<sup>16</sup> comprometida por el traumatismo.

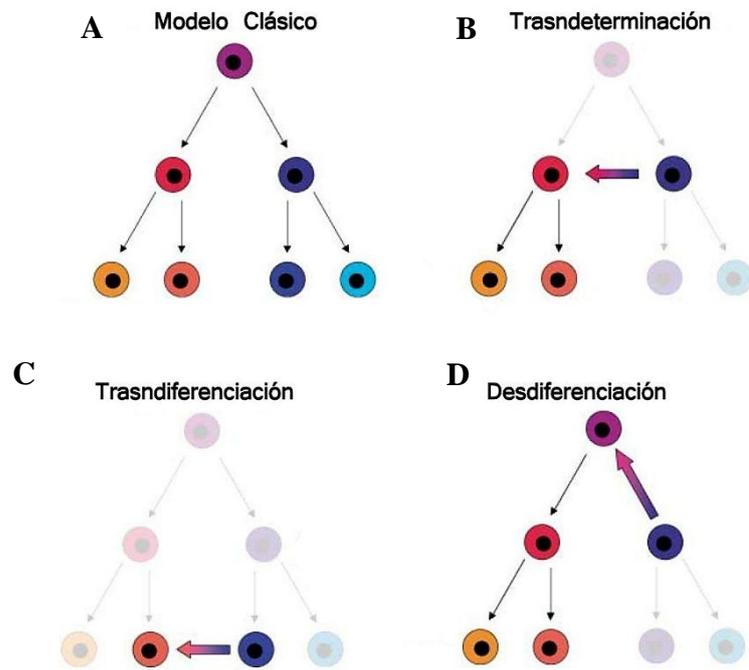
Es evidente que cada una de estas propiedades eventualmente atribuibles a las células, con mayor énfasis a las células tronco adultas, causa gran expectativa ya que adiciona todo un espectro de opciones que podrán ser colocados a disposición de eventuales usos terapéuticos. Sin embargo, aún persisten grandes controversias debido a que muchas de las observaciones acusadas pueden estar asociadas con una configuración experimental donde se trabaja con gran heterogeneidad celular y/o con los criterios utilizados para identificar cambios reales de identidad celular<sup>17</sup>. Estos artefactos experimentales por tanto pueden conducir a conclusiones precipitadas y en muchos casos han impedido la reproducción de los experimentos, o al menos de las conclusiones más optimistas (Raff, 2003).

---

<sup>15</sup> Se refiere a todo el conjunto de procesos de regulación génica, epigenómica y fenotípica que hacen a la identidad celular (ver sección anterior).

<sup>16</sup> Este fenómeno ha sido bastante estudiado en el proceso regenerativo del miembro de salamandra tras la amputación.

<sup>17</sup> Es importante resaltar que una cuestión central subyacente en los procesos de plasticidad es la configuración epigenómica, la cual a través de sus espectros dinámicos de reestructuración permitiría eventualmente ciertas oportunidades frente a la capacidad de interconversión celular.



**Figura 15: Representación de los diferentes modelos y mecanismos de plasticidad:** A) Es la representación del modelo clásico jerárquico de células tronco. B, C, y D) Representación de los diferentes procesos de plasticidad celular (detallados en el texto), donde la flecha indica la “posición y dirección” en relación al modelo clásico, que toma lugar el proceso particular de interconversión celular. El código de colores de las flechas también hace referencia al sentido del proceso. Modificado de Frisé, 2002.

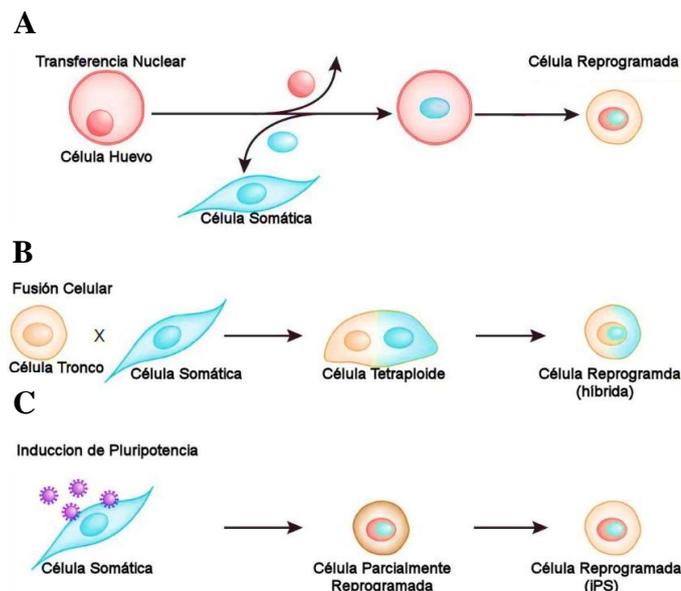
Más allá de todas estas intrigantes y atractivas propiedades atribuibles bien a la naturaleza biológica *per se* de las células tronco o a las configuraciones artificiales, desde hace bastante tiempo se han explorado diferentes metodologías que buscan hacer que células somáticas adultas ya diferenciadas readquieran un fenotipo toti o al menos pluripotencial.

Hace relativamente poco tiempo, el desarrollo de una novedosa tecnología ha ocasionado gran impacto y expectativa en el ámbito de la reprogramación celular. A finales del 2006 dos investigadores japoneses, Kazutoshi Takahashi y Shinya Yamanaka, de la Universidad de Kyoto, publicaron un artículo en la revista Cell donde anunciaron la obtención de células tipo ES denominadas células tronco pluripotenciales inducidas (iPS; del inglés Induced Pluripotent Stem Cells), a partir de fibroblastos adultos mediante la inducción de cuatro factores (Oct-3/4, SOX2, c-Myc, y Klf4) utilizando vectores lentivirales (Takahashi & Yamanaka, 2006).

Esto sin lugar a dudas enriquece enormemente el espectro de opciones terapéuticos de gran eficiencia y especificidad que permitan recuperar tejidos e

inclusive órganos completos, mediante la utilización de iPS específicas de cada paciente, tornando una realidad las finalidades ultimas de lo que se ha denominado medicina regenerativa (Lengner, 2010).

Por último, actualmente otra nueva forma de reprogramar células adultas es anunciada en dos artículos publicados en la revista Nature por el equipo de la investigadora japonesa Haruko Obokata, del Centro Riken de Biología del Desarrollo en Kobe. Este nuevo método denominado STAP (del inglés; Stimulus-triggered acquisition of pluripotency) es sorprendentemente simple, ya que se basa apenas en la exposición al estrés de las células adultas en cultivo (como la disminución del pH del medio), lo que evita la transferencia nuclear o la introducción de factores de transcripción, y se obtienen células inclusive más maleables que las iPS. Además, las células reprogramadas mediante STAP también pueden formar tejido placentario, algo que ni las iPS ni las ES pueden hacer (Obokata *et al.*, 2014a,b).



**Figura 16: Estrategias de Reprogramación Celular:** **A)** Método de transferencia nuclear, donde es aislado el núcleo de células somáticas y reintroducido en un ovocito donde previamente también se le ha eliminado el núcleo. Cuando estas células son activadas, generalmente por un mecanismo eléctrico, y luego introducidas en un útero que soporte el desarrollo del embrión, dará lugar a animales genéticamente idénticos al del núcleo de la célula somática original. **B)** Método de fusión celular, donde la célula somática es fusionada con la célula tronco mediante algún tratamiento (eléctrico, químico o viral) que resulta en células heterocarontes reprogramadas. **C)** Método de pluripotencia inducida, en el cual se usan cuatro factores transportados por vectores lentivirales para transformar células somáticas, que adquieren un fenotipo tipo ES, evidenciado por pruebas típicas de estas últimas. Más recientemente se ha optimizado este método donde se usan las proteínas directamente para reprogramar las células. Modificado de Cantone & Fisher, 2013.

### **1.7.3 Consideraciones Finales: Hacia una Teoría Sistémica**

La enorme acumulación de conocimiento generada mayoritariamente en los últimos años, debida en gran parte al acoplamiento de tecnologías informatizadas junto a las nuevas técnicas experimentales para investigar la biología de las células tronco, está ofreciendo un panorama impresionantemente detallado sobre los procesos funcionales íntimos que caracterizan estas células.

La extrapolación de las observaciones sobre el comportamiento celular a partir de experimentos bajo circunstancias artificiales hacia sistemas biológicos intactos aun representa un marco bastante contradictorio (Flake, 2004).

Es por eso que muchos grupos de investigación han comenzado, en una labor de enorme empeño y discernimiento, a aplicar los principios de la teoría sistémica a los sistemas biológicos, como un aditivo en la comprensión de los procesos generales del comportamiento de las células tronco y en la resolución de los grandes conflictos sobre la regulación en la decisión de destino. Y si bien la visión sistémica ha tenido origen luego de la segunda guerra mundial en los trabajos Ludwig von Bertalanffy, quien en 1928 acuñó el término biología de sistemas, además de otros, su aplicación en los contextos biológicos ha logrado una mayor notoriedad recién en los últimos años (Laszlo & Krippner, 1998).

En lugar de focalizarse sobre el funcionamiento de los genes individualmente, de las proteínas y de las rutas metabólicas de los fenómenos biológicos a nivel microscópico, el objetivo de una perspectiva sistémica en biología, particularmente en la biología de células tronco, es la caracterización de las reglas esenciales de interacción entre los diferentes componentes y módulos y en los diferentes niveles de organización que componen el organismo. Así, el entendimiento de los principios y orígenes de la robustez en los sistemas biológicos hará colocar los fenómenos del comportamiento de las células tronco en una nueva perspectiva y conducirá a catalizar la reformulación de principios y conceptos a nivel sistémico (Kitano, 2007). Además, esta nueva perspectiva podrá tener un impacto positivo en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas contribuyendo directamente en la esfera práctica.

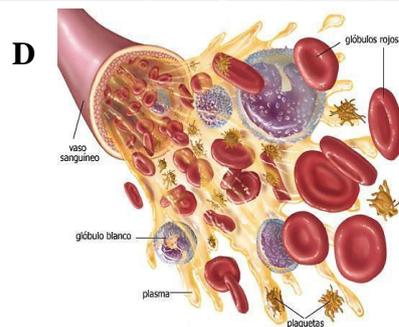
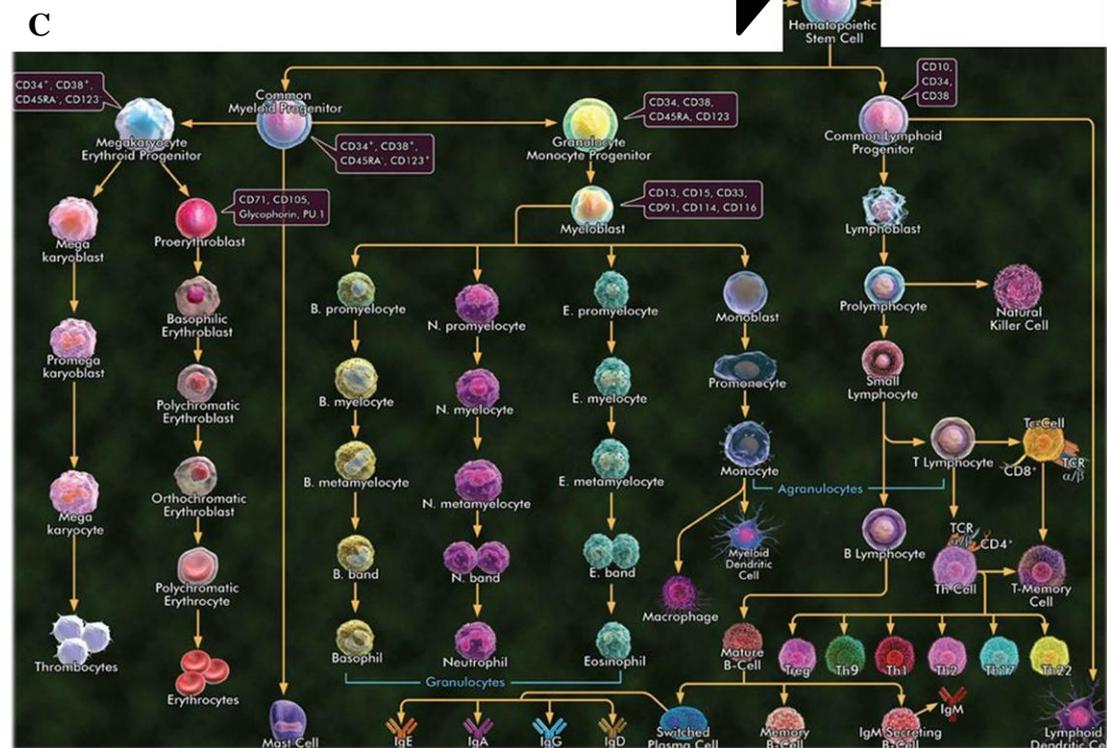
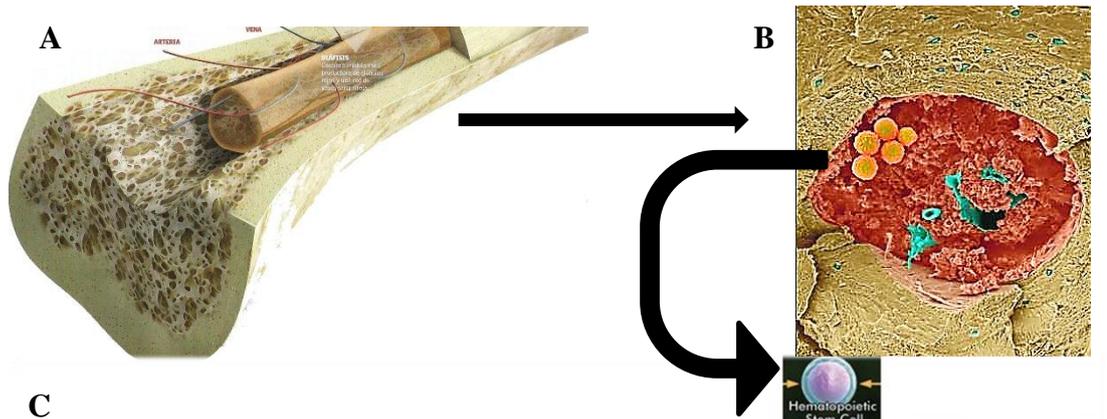
## **1. 8 El Sistema Hematopoyético y las Células Tronco Hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>**

Descritos los grandes conceptos y tópicos en relación al universo que rodea la investigación y aplicación con células tronco, se señalarán la principales características del sistema hematopoyético y más específicamente las células tronco hematopoyéticas que constituyen el sustrato principal de este trabajo.

La sangre es una forma especializada del tejido conjuntivo, que está formada por dos componentes: un componente intercelular líquido llamada plasma que constituye el 55% del volumen total, compuesto por un 90 % de agua, un 7 % de proteína (fibrinógeno, albúmina y globulinas) y un 3 % de sales inorgánicas, y los denominados elementos formes constituidos por las células de los diferentes linajes del sistema hematopoyético suspendidos en el plasma (Ross & Pawlina, 2013). El sistema hematopoyético en el adulto puede ser dividido en base a dos criterios: el del grado de madurez de las células que lo conforman, y el de los distintos linajes celulares que de él se generan (Mayani *et al.*, 2007). De acuerdo al grado de maduración de las células se subdivide al sistema hematopoyético en cuatro compartimentos que guardan una relación directa con el modelo jerárquico de células tronco. Así, el primer compartimiento corresponde al de las células tronco, llamadas células troncales hematopoyéticas (HSCs, del inglés Hematopoietic Stem Cells) y residen en la porción medular de los huesos largos, que conforman el nicho primario. Las HSCs dan origen a células progenitoras hematopoyéticas, que corresponden a la población las células transitorias/amplificadoras (ver sección 1.4.3) y constituyen el segundo compartimiento. Estas células progenitoras generan a su vez las denominadas células precursoras que constituyen subdivisiones jerárquicas dentro de los diferentes linajes particulares y que corresponden a la gran mayoría de las células de la médula ósea (>90% de las células hematopoyéticas residentes en la cavidad medular). Finalmente, los precursores hematopoyéticos al madurar, generan las células sanguíneas circulantes especializadas de cada linaje particular estableciendo el cuarto compartimiento.

De acuerdo al criterio de los linajes, el sistema hematopoyético se divide en dos grandes grupos: mieloide, y linfoide. El primer linaje comprende a los granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), monocitos, eritrocitos y trombocitos (plaquetas), mientras que el segundo comprende a los linfocitos B, linfocitos T y

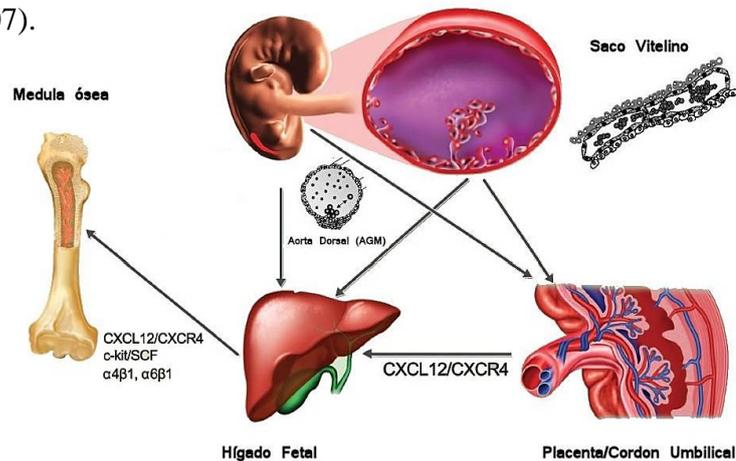
células NK (Natural Killers). Las células mieloides son producidas a través de un proceso conocido como mielopoyesis, mientras que las células linfoides son resultado de la linfopoyesis. Ambos procesos, están controlados por programas genéticos independientes, pero muy relacionados, y la interacción que existe entre células de uno y otro es muy estrecha.



**Figura 17: Compartimentos y Linajes del Sistema Hematopoyético:** A) Estructura de un hueso largo típico de adulto donde se observa la porción de hueso compacto, esponjoso y la médula en la cavidad central. B) Microfotografía electrónica de barrido donde se observa una porción de la médula ósea y en donde se destacan un grupo de HSCs. C) Estructura jerárquica del sistema hematopoyético donde las HSCs ocupan la posición de mayor jerarquía. Estas dan lugar a los progenitores (mieloide y linfoide), y estos a su vez dan lugar a precursores cada vez más comprometidos que finalmente generan las células especializadas que transitan en el sistemas circulatorio (D). Conjunto de imágenes obtenidas y rearregladas a partir de búsqueda en internet.

### 1.8.1 Ontogenia del Sistema Hematopoyético

El origen y la potencialidad de las HSCs han sido cuestionados durante mucho tiempo. Más allá de los conflictos existentes sobre cuál es el sitio<sup>18</sup> primario fuente de las células hematopoyéticas con capacidad de trasplante a largo-plazo, es ampliamente aceptado que lo procesos primitivos hematopoyéticos en la región extraembrionaria del saco vitelino preceden al de las regiones intraembrionarias. Así, durante la embriogénesis mamífera, la hematopoyesis es claramente iniciada en el compartimento extraembrionariamente del saco vitelino, y a continuación intraembrionariamente en las regiones llamadas esplacnopleura para-aortica, y aorta-gónada-mesonefro. A partir de estas regiones, las células primitivas colonizan el hígado, el bazo y el timo respectivamente, y finalmente la médula de los huesos, donde se establecen como el sitio predominante de la hematopoyesis adulta (Cumano & Godin, 2007).



<sup>18</sup> Si bien la hematopoyesis primitiva es claramente iniciada en el saco vitelino, se han documentado, a partir de varios experimentos, indicios que ponen en duda sobre cuál podría ser el sitio de origen de las primeras HSCs con capacidad multipotente. En algunos de estos experimentos se observó que las células de origen en el saco vitelino no tendrían capacidad de reconstitución completa del sistema hematopoyético cuando son trasplantadas hacia animales letalmente irradiados. Sin embargo, otros estudios han indicado que progenitores multipotentes derivados del saco vitelino, aislados en cierta fase temprana tendrían el potencial de repoblación, no en animales adultos, pero sí en ratones neonatos. Por tanto aún permanece en debate el origen de las células con total capacidad de regeneración del sistema hematopoyético.

---

**Figura 18: Ontogenia del Sistema Hematopoyético:** Se ilustran los diferentes compartimentos anatómicos de origen y proliferación de las células hematopoyéticas durante el desarrollo. Así, las HSCs más primitivas surgen en el tejido extraembionario del saco vitelino y luego en la región aorta-gónada-mesonefro. Posteriormente migran y colonizan otros órganos como el hígado. Finalmente se establecen en la médula ósea. Modificado de Magnon & Frenette, 2008.

## 1.8.2 Células Tronco Hematopoyéticas

Desde los trabajos Donnal, pasando por los Till y McCulloch y tras un extenso proceso de pruebas, ensayos funcionales y caracterización de las HSCs se llegó a un consenso de estandarización inmunofenotípica<sup>19</sup> que permitió el desarrollo de protocolos para purificar estas células. Dentro de las combinaciones de marcadores que se han estandarizados para el aislamiento de las HSCs, el antígeno CD34 se ha consolidado como el más representativo<sup>20</sup> para identificar la población de células tronco hematopoyéticas en la médula ósea (Lanza *et al.*, 2001).

Mediante la utilización de estos protocolos de aislamiento en combinación con estudios de trasplantes se ha evaluado el conjunto de criterios conceptuales que caracterizan a las células tronco en general. Además se ha estudiado el potencial de diferenciación de las HSCs mediante estudios de plasticidad celular, y más recientemente se han realizado estudios de genómica funcional. Como consecuencia de esto, hoy en día se dispone de un importante conjunto de conocimiento sobre las características funcional y molecular de las HSCs que quedan completamente examinadas en las lecturas de Kondo, 2003, 2010 y Hackney & Moore, 2005.

Más allá de los detalles funcionales y moleculares, el criterio que ha resultado ser más relevante en el área clínica a partir de estos estudios, es la clasificación de las HSCs en dos grandes poblaciones: células tronco hematopoyéticas a largo plazo (HSCs-LP) que tiene la mayor capacidad de división y diferenciación, y células tronco hematopoyéticas a corto plazo (HSCs-CP) que tiene un potencial más restringido en relación a las anteriores (Kondo *et al.*, 2003).

Sin embargo, una cuestión problemática que ha limitado el estudio de las HSCs en humanos resulta del hecho de que estas células aún no se han podido expandir adecuadamente en condiciones artificiales de cultivos celulares. Es por tal

---

<sup>19</sup> Es una caracterización que asume un conjunto de marcadores para identificar una población particular de células (generalmente mediante citometría de flujo), por el hecho de que son exclusivamente expresados en estas células, o que el patrón de reactividad es único en esa población.

<sup>20</sup> En la sección Discusión se describen otros marcadores representativos de las diferentes poblaciones de HSCs.

motivo que un número cada mayor de estudios se enfoca en las particularidades del nicho, con fin de identificar las moléculas que controlan los procesos de automantenimiento.

### **1.8.3 Nichos de Células Tronco Hematopoyéticas**

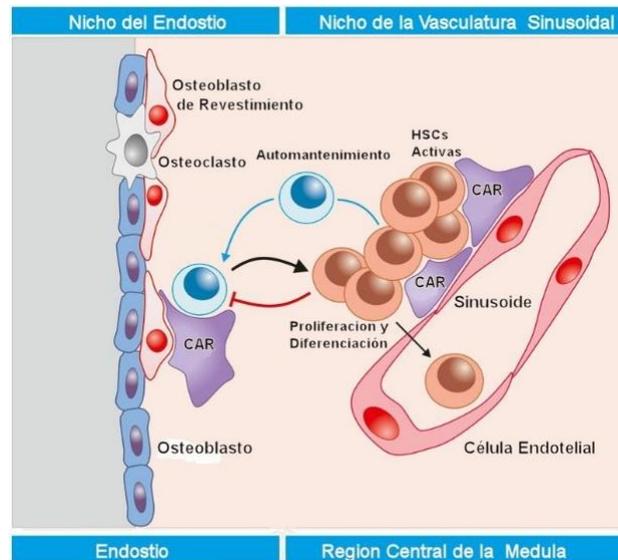
Es en el interior del hueso que yace la médula ósea, la cual integra los elementos que físicamente soportan y fisiológicamente mantienen el tejido hematopoyético en el individuo adulto (Travalos, 2006). Este microambiente hematopoyético en la médula ósea está compuesto por una compleja combinación de diferentes tipos de células y componentes de la matriz extracelular que albergan las HSCs (Zhu & Emerson, 2004). Varios estudios han explorado la localización física de estas células y han constatado, a partir de evidencias morfológicas, que las HSCs se encuentran localizadas en estrecha asociación con el revestimiento del endostio en la región trabecular de la cavidad medular, y que por otro lado las células más comprometidas son encontradas con mayor frecuencia en la región más central (Wilson & Trumpp, 2006).

Dentro de este nicho del endostio, varios estudios han evidenciado que las células que tienen un rol directo como elemento que regula el comportamiento y mantenimiento de las HSCs son los osteoblastos. Así, dos estudios han mostrado que un aumento en el número de osteoblastos directamente se correlaciona con el número de HSCs-LP funcionales, indicando que aquellas células (o una subpoblación de ellas) representan un componente esencial del nicho hematopoyético (Calvi, 2003; Zhang *et al.*, 2003). Es muy esperable que además de estas, otras células como los osteoclastos, fibroblastos estromales y células endoteliales también contribuyan en la estructura y funciones del nicho hematopoyético.

Otros ensayos que utilizan inmunofluorescencia han revelado que la única estructura en la médula ósea que se co-localiza adyacente a las HSCs es el epitelio fenestrado de la vasculatura sinusoidal (Lo Celso & Scadden, 2011). Este nicho posiblemente contenga la mayoría de las HSCs en estado quiescentes y eventualmente una pequeña porción de células proliferativas, sirviendo de este modo como un nicho secundario de reserva.

Probablemente ambos nichos representen compartimentos donde las HSCs puedan intercambiarse en función de mantener la homeostasis según las demandas del

entorno. Además, colectivamente tanto el nicho del endostio como el vascular cooperan en la modulación del comportamiento de las HSCs, regulando la tasa de proliferación y automantenimiento incluyendo el balance en la producción de cada linaje según las demandas.



**Figura 20: Nichos de las Células Tronco Hematopoyéticas:** Ilustración donde se distinguen las dos regiones del hueso que componen los nichos de las HSCs: el nicho del endostio y el de la vasculatura sinoidal. Se observa también los diferentes tipos de células que participan en cada una de estas regiones y su relación en el comportamiento de las HSCs. Así, en el nicho del endostio, los osteoblastos mantiene una asociación estrecha con las HSCs, y estas a su vez se relacionan con las células reticulares abundantes en CXCL-12 (CAR, del inglés CXCL12-abundant reticular cells), tanto en el nicho del endostio como en el vascular, regulando el comportamiento. Modificado de Suárez-Álvarez *et al.*, 2012.

#### 1.8.4 Mecanismos de Control del Automantenimiento y Dinámica Migratoria de las Células Tronco Hematopoyéticas

Como se comentó antes, existe un sistema de control que es capaz de resolver las necesidades homeostáticas del mantenimiento del tejido, al tiempo que garantiza la estabilidad del número poblacional de células tronco (Lander *et al.*, 2009), siendo que una cuota importante de la modulación del comportamiento de las células tronco recae en las interacciones de estas células con los componentes del nicho.

En el sistema hematopoyético el automantenimiento de las HSCs se ha asociado con la actividad de las vías Hedgehog (Hh), Notch, Wingless (Wnt), BMPs y HoxB4 entre otros (Seita & Weissman, 2010). Sin embargo, debido a que estas células, y en general todas las células tronco adulta, no han podido ser cultivadas con

éxito a largo plazo, el conocimiento de las vías moleculares que intervienen en el control del automantenimiento ha sido limitado.

Uno de los grandes desafíos que se pretende alcanzar mediante el entendimiento de los circuitos reguladores, está en lograr cultivar y expandir las HSCs *in vitro*.

En estrecha asociación con los mecanismos de automantenimiento, se encuentran los fenómenos de movilidad de las HSCs (Magno & Frenette, 2008). Y si bien, como ya se comentó, que la vasta mayoría de las HSCs residen en la médula ósea, estas son remarcablemente móviles. En respuesta a ciertas señales específicas las HSCs pueden abandonar el nicho medular y aumentar su número en la circulación<sup>21</sup>, o eventualmente el proceso contrario, fenómeno conocido como *homing*<sup>22</sup> (Mazo *et al.*, 2011). Es interesante constatar que bajo condiciones homeostáticas normales es posible detectar, aunque en cantidades muy bajas, células progenitoras hematopoyéticas siendo constantemente liberadas en la circulación. Aún no se comprende exactamente su papel fisiológico, siendo que algunos autores han sugerido que podrían representar una fuente de acceso rápido, aunque muy limitado, de HSCs en áreas traumatizadas, o alternativamente representarían una consecuencia secundaria de la permanente remodelación de los huesos que causa una constante destrucción y reformación del nicho medular.

Muchas moléculas de adhesión célula-a-célula donde se incluyen selectinas e integrinas, son críticas para los procesos de movilización y homing (Sahin & Buitenhuis, 2012). Uno de los factores de mayor relevancia involucrados en la migración, retención y movilización de las HSCs durante la homeostasis y luego de injuria es CXCL12, que es expresado por varios tipos de células estromales de la médula ósea incluyendo los osteoblastos y las células vasculares endoteliales. Su expresión y secreción es inducida por la erosión de las células hematopoyéticas durante la irradiación, quimioterapia o hipoxia, y cuando HSCs aisladas son reintroducidas luego de estos tratamientos, migran exclusivamente hacia esos lugares

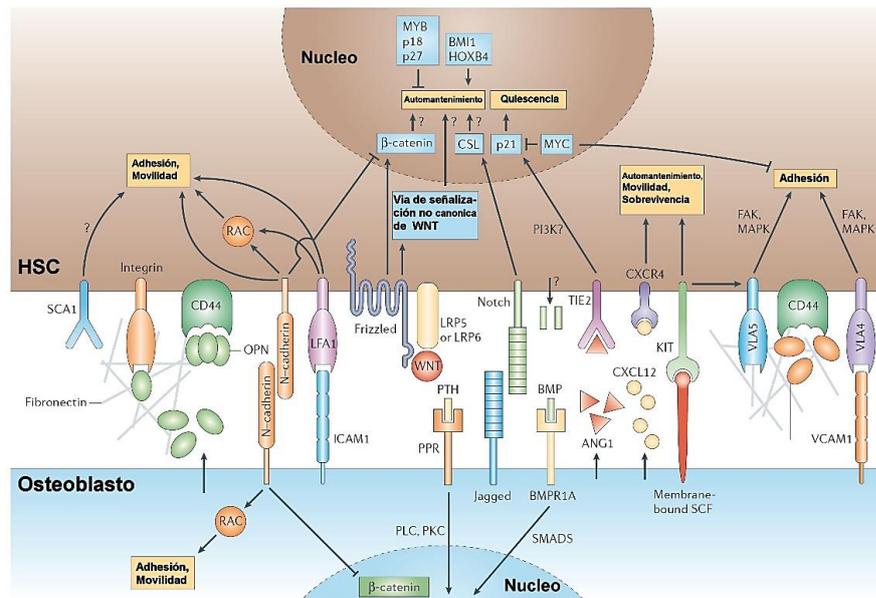
---

<sup>21</sup> Este fenómeno es denominado movilización, y cuando es provocado mediante la administración exógena de citoquinas como Factor Estimulante de Colonia de Granuloso (G-CSF del inglés Granulocyte colony-stimulating factor), se torna una estrategia eficiente previo a un tratamiento de trasplante autólogo (Molineux *et al.*, 1990).

<sup>22</sup> Este fenómeno ha sido bastante estudiado en los últimos años, y es el proceso responsable que garantiza a que las células del donador, luego de un tratamiento de trasplante de médula encuentren el nicho medular.

de expresión. Otras moléculas de adhesión también participan en los procesos migratorios.

Por tanto, una intrincada combinación de señalización, adhesión, migración y homing toman lugar en la interface entre las HSCs y los elementos que constituyen el nicho tanto primario como secundario o las regiones donde estas transitan.



**Figura 21: Interacciones Moleculares entre las HSCs y los Osteoblastos del Nicho:** Ilustración donde se representan algunas de las moléculas y vías que participan en la interacción entre las HSCs y los osteoblastos que conforman el nicho del endostio. También se detallan algunos de los comportamientos que son asociados con la actividad de ciertas moléculas y/o vías. Por tanto es posible reconocer las intrincadas redes interactivas entre las células HSCs y los componentes del nicho. Es importante recordar también, que existen otros elementos celulares y moleculares que participan en la regulación del comportamiento de las HSCs, y además que señales provenientes de otras regiones del organismo también pueden afectar el comportamiento, como la movilización. Modificado de Wilson & Trumpp, 2006.

## **PARTE II:**

### **JUSTIFICACION DEL PROYECTO**

En los últimos años ha crecido marcadamente el interés por el aislamiento y la evaluación de células troncales/progenitoras adultas a partir de diferentes tejidos. Esta categoría de células manifiestan, bajo determinadas condiciones de laboratorio, ciertas propiedades atractivas y deseadas, además de las implicadas en cuestiones bioéticas, como base para futuras aplicaciones en tratamientos regenerativos basados en células (Hodgkinson T. *et al*, 2009), razón por la cual se han tornado centro de numerosas líneas de investigación tanto básica como aplicada.

En situaciones fisiológicas normales la sangre periférica contiene una cantidad muy reducida de células con propiedades troncal/progenitora en circulación (Goodman & Hodgson, 1962). Este tejido está constituido por varios tipos o linajes celulares; las células que presentan propiedades troncal/progenitora en este tejido constituyen a su vez una subpoblación bastante heterogénea, incluidas en la fracción de células mononuclear (principalmente linfocitos y monocitos) (Schroeder, 2010).

Sin embargo, esta subpoblación de células con propiedades troncal/progenitora expresan una combinación singular de proteínas de membrana, algunas de las cuales son bien conocidas y entre las que se encuentra la glicoproteína **CD34<sup>+</sup>** (Lanza & Sutherland, 2001) hecho este, que permite identificarlas mediante ciertas técnicas de laboratorio. El volumen de las muestras y los métodos de separación empleados condicionan la viabilidad, la concentración final y el número absoluto de estas células obtenidas en el laboratorio.

La evaluación y validación de protocolos de separación celular que optimicen el rendimiento cuanti y cualitativo de los métodos de obtención de estas células para fines de investigación, es un objetivo del Laboratorio de Inmunogenética e Histocompatibilidad del Instituto Nacional de Donación y Trasplantes de Células Tejidos y Órganos (INDT).

De ahí que, la protocolización de un método de aislamiento y conteo de células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> de sangre periférica de donantes en diferentes condiciones vitales pero sin previa estimulación médular (donantes que *no* fueron previamente sometidos a un proceso de movilización médular), constituya un aporte

importante en esta línea de trabajo y se establece como un planteamiento que justifica su realización.

Como parte de este informe también se expondrán, las mencionadas implicancias bioéticas que acarrearía la utilización de estas tecnologías en futuras aplicaciones clínicas

Se intentan exponer conceptos y progresos de un campo particular de la investigación biomédica, en base a una visión holística de los hechos y su entorno.

### **OBJETIVOS GENERALES**

El propósito más general de esta pasantía se enfoca en experimentar un acercamiento a la forma de investigación científica en general y más específicamente a algunos métodos aplicados al trabajo con células tronco.

En lo referente al objetivo del trabajo práctico, se propuso en esta ocasión diseñar un protocolo optimizado de aislamiento y conteo de células troncales/progenitoras hematopoyéticas (células CD34<sup>+</sup>), a partir de muestras de sangre periférica sin previa estimulación médular, aptas para ulteriores evaluaciones.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Estudiar y realizar procedimientos de laboratorio utilizados en investigación biomédica.
- Conocer y manejar equipos e instrumentos y realizar preparaciones de reactivos y soluciones.
- Explorar diferentes técnicas utilizadas en el Laboratorio y evaluar un procedimiento técnico de separación de células CD34<sup>+</sup>.
- Proponer la implementación de un método de separación de células troncales/progenitoras hematopoyéticas para al objetivo planteado.
- Utilizar la citometría de flujo en la evaluación cuanti y cualitativa de las células aisladas, para adquirir conocimiento y manejo de esta tecnología.

## **2 METODOS Y MATERIALES**

El diseño y posterior optimización del protocolo que permitió concentrar, aislar y evaluar células CD34<sup>+</sup> se llevó a cabo mediante la utilización de diferentes herramientas disponibles en el Laboratorio de Inmunogenética e Histocompatibilidad del INDT.

### **1. 1 Metodologías**

La primera etapa de este trabajo consistió en la adquisición personal de conocimientos teóricos y destrezas prácticas, referidas a la metodología aplicada en diferentes áreas del Laboratorio de Inmunogenética e Histocompatibilidad. Luego, a partir de la evaluación de las características de las diferentes alternativas técnicas para la obtención de CD34<sup>+</sup> se inició el diseño de un protocolo piloto orientado a cumplir con la etapa de concentración de células mononucleares como parte de los objetivos del proyecto.

Una vez establecido, este protocolo piloto fue llevado a la práctica con muestras de sangre periférica procedentes de individuos donantes normales<sup>23</sup> (identificados como DN), con consentimiento informado y muestras procedentes de donantes en muerte encefálica<sup>24</sup> (identificados como DME) con expresión total de donación, como control experimental. La evaluación de algunas variables en torno al proceso de concentración/separación de células mononucleares para este protocolo piloto, permitió el ajuste de estas y otras variables que posibilitaron mejorar el rendimiento general del proceso de concentración, así como adecuar un sistema de registro de información para el análisis estadístico. Paralelamente a estos ajustes, fue necesario elegir un sistema de aislamiento de células CD34<sup>+</sup>, y preparar los protocolos específicos para la recolección de datos de citometría flujo referidos a estas células.

Así, los ajustes realizados sobre este protocolo piloto dieron lugar a una propuesta final con un protocolo de mayor eficiencia y eficacia, que permitió la evaluación de células CD34<sup>+</sup> para dos métodos de separación de células mononucleares. Esto brindó la posibilidad de comparar el rendimiento de cada

---

<sup>23</sup> Que no fueron sometidas a un proceso de movilización o estimulación con factores de crecimiento (Molineux *et al.*, 1990).

<sup>24</sup> Ver [Consenso Nacional de Muerte Encefálica](#)

método de concentración/separación a partir de diferentes tipos de muestras de sangre periférica sin estimulación médular previa.

### 2.1.1 Protocolo Piloto

En esta fase se aplicaron:

- Técnica de separación de células mononucleares por gradiente de densidad en [Ficoll-Paque Plus](#)
- Conteo de células mononucleares en cámara [Neubauer](#), y evaluación de la viabilidad mediante tinción con azul tripán
- Ajustes de la concentración final de células mononucleares
- Método de selección positiva inmunomagnética de células CD34<sup>+</sup>
- Método de cuantificación de células CD34<sup>+</sup> en citometría de flujo

En base a los datos de referencia para el aislamiento de células mononucleares con Ficoll-Paque, que es de  $1-2 \times 10^6$  células mononucleares por ml de sangre normal (Kanof *et al.*, 2001), se calculó el volumen inicial a partir del cual se podría obtener una concentración mínima de  $4 \times 10^7$  células mononucleares por ml. Determinamos como valor inicial un volumen aproximado a 30 ml. Este volumen fue luego incrementado en base al resultado insuficiente del conteo de mononucleares en cámara Neubauer, fijándose como volumen mínimo de sangre periférica 40 ml.

Dentro de los ajustes técnicos que llevo a la optimización en la etapa de concentración/separación en términos cuantitativos está el fraccionamiento de la muestra. Inicialmente se trabajó con 5 tubos de ensayo normales para separación de gradientes de mononucleares. Posteriormente se probó una mayor fragmentación de la muestra y se detectó que, con una serie de 16 tubos de ensayo normales para la primera centrifugación (separación del gradiente), luego 8 tubos cónicos y 1 tubo cónico para el primer y segundo lavado de células respectivamente, mejoraba el rendimiento cuantitativo general de la técnica de separación de células mononucleares.

Fue necesario ajustar también la relación de volúmenes sangre diluida/ ficoll utilizada para la obtención del gradiente: inicialmente se trabajó con una relación 4 a 1, para finalmente trabajar con una relación 3 a 1. Además de estas modificaciones,

se ajustó el tiempo y la velocidad de centrifugación de las fases de separación de gradientes y de los lavados. Todas estas modificaciones permitieron la obtención de una cantidad mínima superior a  $4 \times 10^7$  células mononucleares por mililitro de buffer a partir de un volumen de 40 ml de sangre.

Una vez optimizado la técnica de concentración/separación de células mononucleares, y a partir de los datos de referencia de concentración de células CD34<sup>+</sup> en sangre periférica, que es de 2 a 4 células por  $\mu\text{l}$  de sangre normal (ver sección 1.8.2), se eligió un método de separación de las células en relación a los recursos humanos, materiales, y de costos necesarios. Dentro de las varias estrategias de separación de células (Kumar *et al.*, 2011) se optó por el modo de selección positiva de células CD34<sup>+</sup> utilizando un sistema de perlas inmunomagnéticas. Se adquirió el producto comercializado por el fabricante *Invitrogen*, [Dyna<sup>l</sup>® CD34 Progenitor Cell Selection System](#) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Sin embargo en la etapa de la separación de las perlas (paso 3.5 del manual del fabricante; Detachment Procedure), se presentaron algunos problemas, debido a que el agitador no cumplía con las recomendaciones del protocolo original. Se probó utilizar un sistema de agitación alternativo, pero posiblemente sus componentes electromagnéticos de alguna manera interferían en el proceso de separación, dado que la recuperación de células CD34<sup>+</sup> cuando eran cuantificadas por citometría<sup>25</sup> resultaba muy pobre. Esto nos llevó a cambiar el sistema de agitación utilizando un vortex a baja velocidad con el tubo inclinado en un ángulo de entre 20° y 60°. Esta modificación resultó exitosa, y permitió continuar con el desarrollo del protocolo de conteo de células CD34<sup>+</sup> por citometría.

Para obtener la cuantificación específica de cada una de las diferentes fracciones celulares, se adquirió el producto comercial del fabricante *Dako* [CD34Count Kit](#), que permite teñir las células y contrastar las distintas subpoblaciones mediante su evaluación en citometría de flujo. Dichas evaluaciones fueron realizadas con un citómetro [COULTER EPICS XL™ Flow Cytometer](#), utilizando el software System II de Beckman Coulter., siguiendo las recomendaciones estandarizadas en los protocolos ISHAGE (Sutherland *et al.*, 1996). Sin embargo fue necesario adaptar los histogramas y ajustar la compensación color ya que los protocolos ISHAGE utilizan un software de operación del citómetro

---

<sup>25</sup> En esta etapa se utilizaba un kit desactualizado de tinción para citometría utilizado por el Dr. Roberto Toledo. Sin embargo, los propósitos para esta fase piloto del proyecto eran totalmente garantizados. Mas una vez, le agradezco al Dr. Roberto su colaboración.

diferente al disponible en el INDT. Para lograr la adaptación de estos histogramas<sup>26</sup> contamos con la colaboración del Dr. Hugo Giordano del Laboratorio de Técnicas Especializadas de la Asociación Española Primera de Socorros Mutuos.

Concluida esta etapa de ajustes, se presentó y discutió con la tutora una propuesta de protocolo técnico global. La tutora sugirió adicionar otra alternativa de separación de células mononucleares utilizando la técnica de Buffy Coat. Esta es una técnica más rudimentaria, que permite separar células del plasma con una simple centrifugación (Sengar *et al.*, 1968; Kay & Locke, 1985). Se enfrentaron algunos inconvenientes relacionados a la contaminación con células rojas. Lo anterior es respaldado por varios trabajos previos en los cuales los autores notifican contaminaciones no deseadas de este tipo (Brooimans *et al.*, 2009). Con el fin de eliminar esta contaminación, se contempló la utilización de un buffer de lisis eritrocitario para los lavados luego de la primera centrifugación. El tiempo de lisis, así como la velocidad y el tiempo en las centrifugaciones de los lavados, se ajustaron de manera de eliminar la mayor cantidad de células rojas sin afectar los conteos de células mononucleares.

Finalmente se logró establecer una propuesta de trabajo que permitió la comparación entre metodologías de concentración/separación de células mononucleares utilizando un sistema de selección inmunomagnético positivo para el aislamiento de células CD34<sup>+</sup> sobre diferentes tipos de muestras de sangre periférico sin estimulación médular previa.

### **2.1.2 Protocolo Final**

En la sección anterior se describió todo el proceso de armado y configuración del protocolo final optimizado. Se ha enfatizado en los detalles técnicos y sus dificultades. La información brindada, constituye una adquisición de experiencias personales en el trabajo de laboratorio. A partir del momento en que se llegó a un consenso sobre los detalles de ajuste del protocolo final, se iniciaron los ensayos con una colección de muestras de sangre periférica provenientes tanto de donantes normales y en condición de muerte encefálica, utilizando el método de Ficoll y el Buffy Coat según la disponibilidad de muestras.

---

<sup>26</sup> En el apéndice 7.5 está una muestra del panel de histogramas y *gates* adaptados a partir de los protocolos ISHAGES.

El apéndice 7.3 se muestra un diagrama del procedimiento técnico tal cual fue llevado a cabo en la mesa del laboratorio, y en el apéndice 7.4 se detallan cada una de las técnicas y etapas diagramadas.

## 2. 2 Reactivos y Técnicas

En esta sección se describen los reactivos usados en el protocolo final, así como el principio de las técnicas y la forma en la cual se utilizaron en este trabajo, siguiendo la secuencia establecida. En la sección anterior ya se han nombrado las técnicas y los protocolos utilizados, pero aquí se enfatiza en algunos detalles no mencionados, como la composición y la dilución de los reactivos. Los apéndices, detallan los procedimientos en forma de diagrama y en forma descriptiva, tal como fueron llevados a cabo en este trabajo.

### 2.2.1 Muestras de Sangre

Las muestras de sangre (N=12) de los donantes normales (personal del laboratorio) fueron obtenidas<sup>27</sup> a través de procedimiento de venopunción, en la sala de extracciones del INDT donde se recogieron aproximadamente 40ml en 2 jeringas.



**Figura 29: Procedimiento de obtención de muestras de sangre:** Las muestras de donantes en condiciones normales fueron obtenidas mediante procedimiento de venpunción, utilizando un catéter adaptador con la jeringa colectora.

<sup>27</sup>Mediante consentimiento informado, cuyo modelo esta adjunto en la sección 7.1 del apéndice.

### 2.2.2 Anticoagulantes

Una vez que completada la extracción de la cantidad especificada de sangre en las jeringas, se pasó todo el volumen de sangre a un tubo Falcon de 50ml conteniendo 5 gotas de anticoagulante.

El anticoagulante que se utilizó en el protocolo final fue Heparina. Si bien en algunos ensayos comparativos se probó utilizar EDTA di potásico (EDTAK<sub>2</sub>), no se observaron diferencias significativas en los conteos. Por este motivo se decidió seguir utilizando heparina ya que en el laboratorio es el anticoagulante de uso cotidiano y de más fácil acceso.

### 2.2.3 Soluciones Buffer

En general la mayoría de los procedimientos de laboratorio se realizan en suspensiones que garanticen la estabilidad de las especies biológicas. Para poder cumplir con las diferentes técnicas realizadas en el protocolo final, básicamente se utilizaron tres tipos de soluciones buffer: Veronal, de Aislamiento y de Lisis.

El buffer Veronal es de uso cotidiano en el Laboratorio de Inmunogenética e Histocompatibilidad del INDT, y es preparado a una concentración de 5X por el personal técnico (ver apéndice 4). En este trabajo se usó únicamente para la dilución de las muestras de sangre a una concentración de 1X. Esta concentración del buffer fue ajustada mediante la preparación de una solución de 50ml finales, compuesta por 40 ml de agua destilada y 10ml de buffer Veronal 5X.

Así, las muestras de sangre, una vez en el tubo Falcon conteniendo anticoagulante, fueron repartida en dos tubos Falcon de 50ml y diluidas con buffer Veronal 1X, en una proporción de 1:1, esto es 20ml de sangre y 20ml de buffer Veronal por tubo Falcon, sumando un total de 80ml de sangre diluida con buffer Veronal 1X. Se homogeneizó cada tubo con movimientos leves.

Es importante resaltar que 2 ml de sangre son separados previo a la dilución con buffer Veronal, pues serán utilizados para evaluaciones de referencia.

El buffer de aislamiento fue usado en todos los restantes procedimientos de aislamiento de células CD34<sup>+</sup>. Fue preparado según las recomendaciones del manual del kit *Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System* (ver sección *Additional Materials Required*), con PBS 1X (sin iones Ca<sup>2+</sup> y Mg) y suplementado con 0,1%

suero fetal bovino (ver sección *Note* del mismo manual). El buffer PBS fue preparado usando un kit comercial diluido en 1 litro final de agua destilada y homogeneizado utilizando un agitador magnético típico.

El buffer de lisis a base de cloruro de amonio, fue usado exclusivamente para poder eliminar la formación de grumos por aglutinación de eritrocitos en las muestras procesadas por Buffy Coat. Fue preparado a una concentración 10X, y usado a una concentración de 1X, mediante dilución en agua destilada antes de cada procedimiento.

Las soluciones buffer fueron preparados y ajustados con peachimetro rutinariamente los días lunes, para estar disponibles los restantes días de la semana. En el apéndice 7.2 se detallan las composiciones de las diferentes soluciones buffer.

#### **2.2.4 Métodos de Separación**

En la naturaleza, la inmensa mayoría de las particularidades biológicas se encuentran integradas formando partes de un todo organizado, que son necesarias separar y purificar, para estudiar sus propiedades. Los diferentes métodos de separación de particularidades microscópicas se basan en diferencias entre las propiedades de los componentes de una mezcla. Los procesos de separación pueden ser clasificados en mecánicos o químicos. La elección del tipo de método de separación depende de una evaluación de las ventajas y desventajas en relación a la singularidad del espécimen biológico de la infraestructura con la que cuenta el laboratorio para cumplir el propósito, y de los recursos disponibles.

Para la separación de células se han desarrollado una enorme cantidad de protocolos, cada uno destinado a identificar y separar selectivamente la categoría deseada para las finalidades en cuestión. Sin embargo, algunos de estos métodos han tenido una adecuación particularmente exitosa en ciertas áreas tanto de estudio como de uso clínico, estableciéndose como métodos obligatorios de rutina, como es el uso de centrifugas para separación de células o la adición de sustancias que discriminan en base a la densidad relativa de los componentes.

En este trabajo se hizo uso básicamente de dos técnicas de aislamientos de células mononucleares que precedieron a una técnica de separación específica de las células CD34<sup>+</sup>, que de forma secuencial permitieron cumplir con los objetivos del proyecto. Las técnicas de separación de células mononucleares fueron gradiente de

densidad con Ficoll-Paque y Buffy Coat; la técnica de separación específica de células CD34<sup>+</sup> fue el método positivo de separación inmunomagnética con perlas *Dynal*® (Dynabeads). A continuación se describen el principio y las cualidades que fundamentan ambos métodos. Es importante destacar también que la elección de los métodos utilizados en este trabajo se realizó en base al análisis previo que contempló criterios de accesibilidad, eficiencia, eficacia y ventajas operacionales.

#### **2.2.4.1 Gradientes de Densidad con Ficoll-Paque**

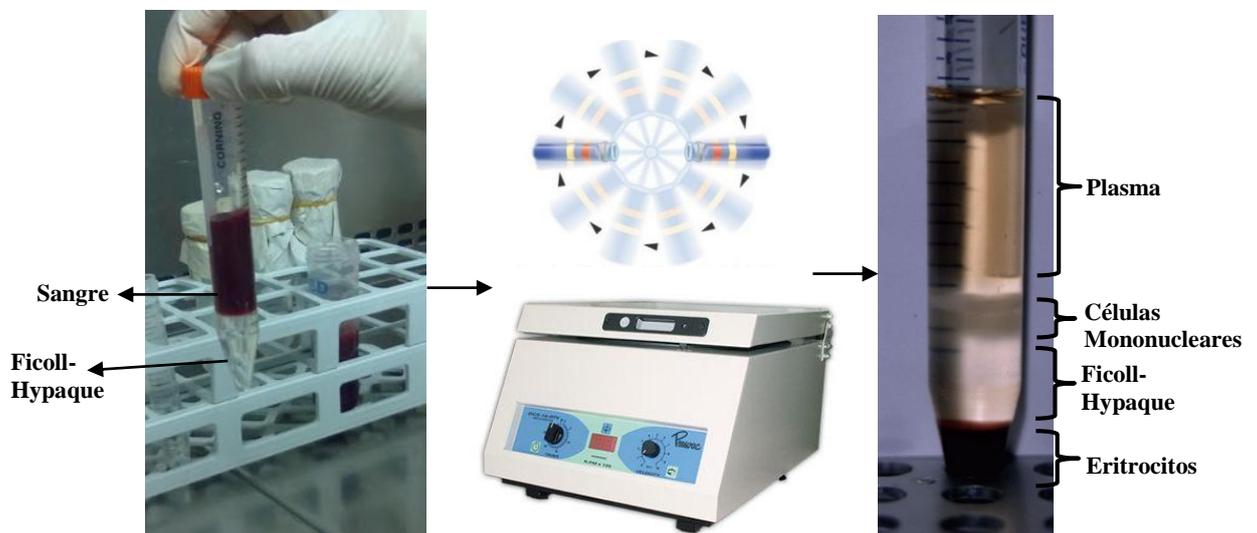
En este trabajo se hizo uso de [Ficoll-Paque Plus](#) del fabricante GE (General Electric) que permite el aislamiento de células mononucleares a partir de volúmenes variables de sangre periférica humana, usando un simple y rápido procedimiento de centrifugación basado en el método de Bøyum (Bøyum, 1968).

Este sistema consiste en la separación de las células en función de su densidad de flotación. Las soluciones de Ficoll-Hypaque constituyen un medio de polisucrosa y diatrizoato de sodio (denominado Histopaque), ajustado a una densidad de 1,077. Cuando la sangre se extiende sobre el Ficoll y se expone a fuerzas centrífugas, las diferentes poblaciones de células sedimentarán en diferentes posiciones a lo largo del tubo en función de su densidad. Como consecuencia se generarán una serie de bandas discretas a lo largo del tubo donde las células mononucleares se depositarán entre el plasma y la solución Histopaque, mientras que los eritrocitos y los granulocitos gravitan hacia el fondo. La fracción de células mononucleares es colectada con pipeta Pasteur.

En este trabajo se siguieron las instrucciones del protocolo optimizado previamente en el Laboratorio de Inmunogenética e Histocompatibilidad del INDT y detallado en el apéndice 3. Para lograr la concentración pretendida, el volumen total de 80ml de sangre diluida en buffer Veronal al 1X fue fraccionado uniformemente en 16 tubos conteniendo 3ml de Ficoll-Hypaque y 5 ml de sangre. Dos grupos de 8 tubos repartidos en grupos de 4 (para aprovechar todas las cubetas en la centrifuga) fueron enfrentados y balanceados en la tara para equilibrar las fuerzas de la misma. Finalizada la primera etapa de centrifugación se recogieron las fracciones mononucleares de los 16 tubos y se las resuspendió en 8 tubos cónicos para realizar el primer lavado. Las fracciones mononucleares de dos tubos se juntaron en un tubo que se completó con 6ml de buffer de aislamiento. Luego de la segunda etapa de

centrifugación, se descartó la mayoría del sobrenadante de cada tubo, se resuspendió el pellet de cada uno con 2ml de buffer de aislamiento y se transfirió cada resuspensión a un tubo cónico que se completó con buffer de aislamiento y se centrifugó. Por último, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1,2 ml de buffer de aislamiento.

Otro aspecto importante fue el hecho de que una vez finalizada cada técnica de aislamiento, fueron medidas y calculadas las concentraciones de las suspensiones en cámara [Neubauer](#). Estos valores luego se usaron como referencia para la citometría y en las pruebas estadísticas comparativas.



**Figura 31: Técnica de Separación de Células Mononucleares por Gradiente Ficoll-Hypaque:** En esta secuencia de imágenes se recapitula la técnica (de izquierda a derecha), donde se observa: paso1- un tubo cónico con una cantidad de Ficoll-Hypaque y una muestra de sangre suspendida sobre el producto; paso2- una etapa de centrifugación, y paso3- la formación de bandas discretas separando diferentes constituyentes de la sangre: banda amarilla –plasma; banda blanca turbida- células mononucleares; banda transparente- Ficoll-Hypaque y banda roja- eritrocitos.

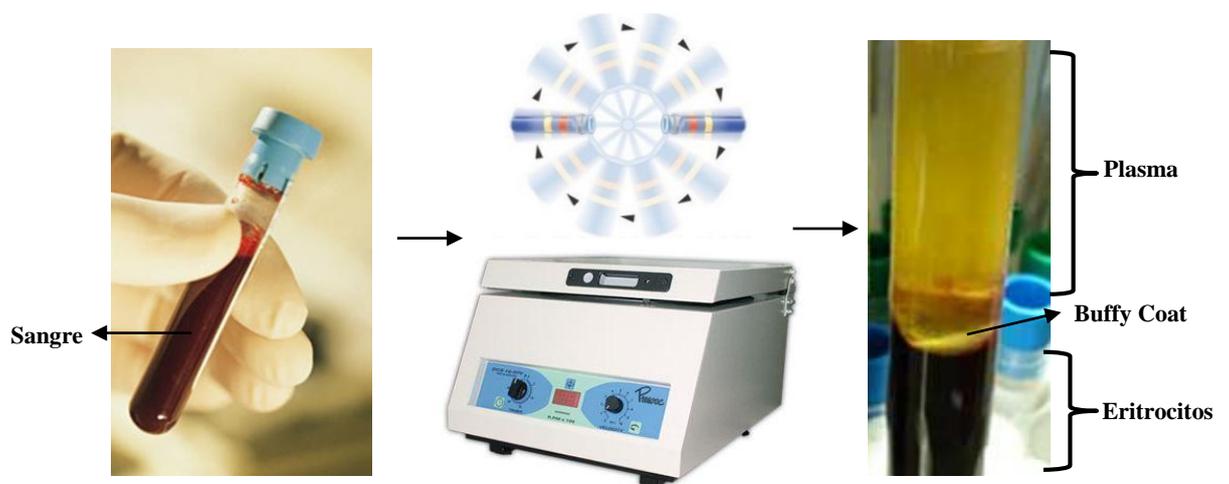
#### 2.2.4.2 Buffy Coat

Este método de separación de células de la sangre consiste básicamente en una etapa de centrifugación de la sangre contenida en un tubo con anticoagulante. Una vez concluida la centrifugación es posible distinguir tres capas, cada una de las cuales contiene el producto de la sedimentación de distintas fracciones de la sangre: una capa basal que contiene principalmente células rojas (eritrocitos), una capa intermedia muy delgada que contiene la mayoría de las células blancas de la sangre

(alrededor del 1% del volumen de la muestra), y una capa superior que contiene el plasma.

Por ser la capa intermedia la que contiene las células blancas, esta incluye la fracción de células mononucleares que representan la población sustrato del método de separación de inmunomagnético de células CD34<sup>+</sup>, y por tanto la porción recuperada es la estudiada posteriormente (ver apéndice 2).

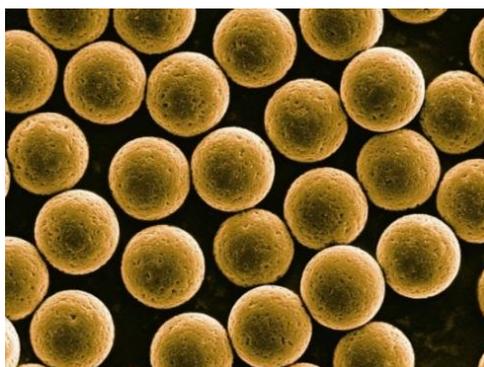
Sin embargo, debido a que durante los primeros experimentos con este método se enfrentaron algunos problemas en relación al contenido de células rojas (su aglutinación causaba la obstrucción de los conductos del citómetro durante los ensayos de conteos), fue necesario incluir un buffer de lisis eritrocitario, en sustitución del buffer de lavado (buffer de aislamiento) para eliminar la mayor cantidad de contaminación por células rojas y poder así realizar los procedimientos de conteos sin inconvenientes.



**Figura 32: Técnica de Buffy Coat:** La secuencia de imágenes (de izquierda a derecha) recapitula esta técnica de separación de diferentes fracciones de la sangre, que consiste básicamente en una etapa de centrifugación de la sangre (con anticoagulante y diluida con buffer veronal). Luego de esta etapa es posible distinguir diferentes capas, donde con pipeta Pasteur se recoge la capa intermedia fina (Buffy Coat)

### 2.2.4.3 Perlas Inmunomagnéticas Dynal

Las perlas Dynal o [Dynabeads®](#) son esferas microscópicas uniformes con propiedades magnéticas, que tienen moléculas de interés técnico, como anticuerpos monoclonales específicos en su superficie.



**Figura 32: Perlas Inmunomagnéticas Dynal (Dynabeads®):** Microfotografía electrónica de barrido donde se observan las perlas Dynal de tamaño uniforme.

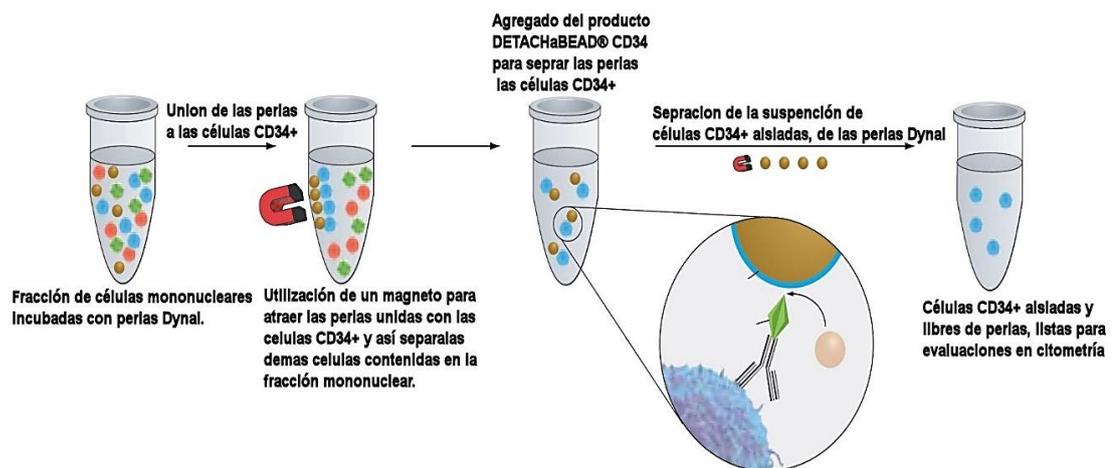
Como ya se mencionó, en este trabajo se hizo uso del producto comercial, [Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System](#), que está destinado al aislamiento positivo de células CD34<sup>+</sup> a partir de la fracción de células mononucleares, tanto de médula ósea, como de sangre periférica y de sangre de cordón umbilical. Particularmente este producto contiene perlas Dynal de 4.5 µm de diámetro, recubiertas con un anticuerpo monoclonal primario específico para reconocer el antígeno de membrana CD34<sup>+</sup> humano.

En la primera etapa las células CD34<sup>+</sup> son “capturadas” por las perlas Dynal específicas, en base a las propiedades inmunológicas del anticuerpo monoclonal anti-CD34. En la segunda etapa, las perlas unidas a las células CD34<sup>+</sup> son atraídas hacia la pared del tubo mediante la utilización de una magneto, de acuerdo a sus propiedades magnéticas, separándolas así de la fracción de células no deseadas, que se descarta o se transfiere a otro tubo. Y tercero, las perlas son separadas de las células CD34<sup>+</sup> mediante la utilización del producto DETACHaBEAD® CD34 contenido en el kit de aislamiento. Nuevamente mediante la utilización del magneto es posible secuestrar las perlas en las paredes del tubo y recoger la suspensión de células CD34<sup>+</sup> purificadas<sup>28</sup>.

<sup>28</sup> Video explicativo del procedimiento [Magnetic Separation using Dynabeads®](#)

A partir de la suspensión de células mononucleares obtenida de las técnicas comparadas, y que por conteo en cámara Neubauer presentaba una concentración dentro del rango indicado por el fabricante del kit de peral Dynal ( $4 \times 10^7 - 1 \times 10^8$  células/ml), se utilizó 1 µl del producto, siguiendo las recomendaciones del protocolo original del fabricante<sup>29</sup>. Como se comentó en la sección 2.1.1, en la etapa de protocolo piloto se enfrentaron algunos problemas con el procedimiento de separación de las perlas que fueron corregidos posteriormente.

Un aspecto importante del diseño metodológico fue el hecho de que la fracción de células mononucleares y las perlas del sobrante luego del aislamiento (y resuspendidas en un volúmenes fijo) no se descartaron, y fueron usadas para los análisis comparativos de concentración y control positivo del proceso de separación de las células CD34<sup>+</sup> respectivamente.



**Figura 33: Procedimiento de la Utilización de Perlas Dynal:** En la ilustración se esquematizan las diferentes etapas de la técnica de aislamiento de células CD34<sup>+</sup> utilizando el producto Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System, descritos en el texto. Imagen modificada y disponible en <http://www.b2b.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Newsletters-and-Journals/ProbesOnline/Probes-Online-January-2009-Volume-12-Number-1.html>

## 2.2.5 Citometría de Flujo

La citometría de flujo es una tecnología que combina principios y sistemas hidráulicos, ópticos y electroinformáticos que posibilita el análisis multiparamétricos de células o partículas en suspensión. En lo específico a las células eucariotas, dentro de estos parámetros podemos reconocer aquellos relacionados con características

<sup>29</sup> Protocolo original del fabricante [Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System](http://www.b2b.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Newsletters-and-Journals/ProbesOnline/Probes-Online-January-2009-Volume-12-Number-1.html).

intrínsecas de la célula tales como el tamaño y la complejidad del citoplasma y/o del núcleo, y los relacionados con características fenotípicas de cada célula como es la expresión de proteínas específicas de membrana.

Así, el (aparato) citómetro de flujo reúne los soportes físicos y electrónicos que articulan los principios antes mencionados de manera integrada y simultánea, y permite el acceso a la información de diversos parámetros mediante su acoplamiento al sistema informático. En este trabajo se usó el Citómetro de Flujo V Coulter Epics XL, con el software System 2 instalado en el Laboratorio de Inmunogenética e Histocompatibilidad del INDT.

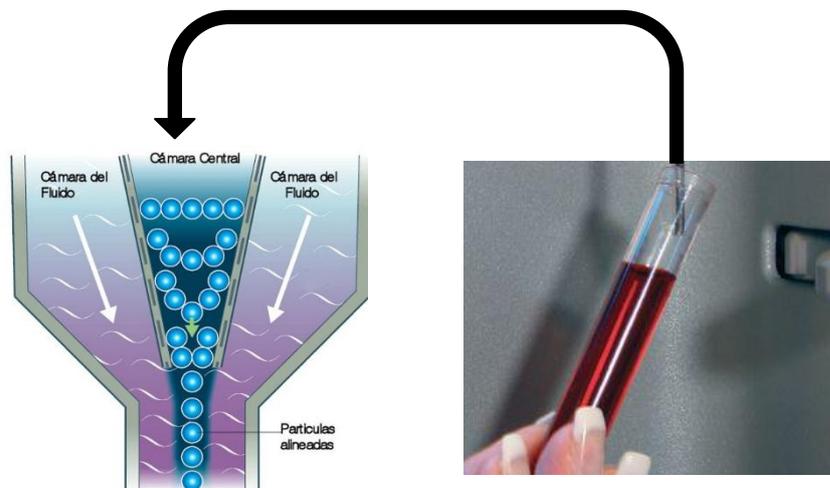


---

**Figura 34: Citómetro de Flujo:** Fotografía de un citómetro de Flujo V Coulter Epics XL y su sistema informático acoplado a través del cual es comandado el aparato.

### 2.2.5.1 Principios de Funcionamiento

Como primer módulo de funcionamiento se tiene al sistema hidráulico el cual está compuesto, de manera muy general, por una *boquilla aspiradora*, que a partir de un sistema de presión ejercida en el interior del tubo, recoge y lleva la suspensión a ser analizada hasta una *cámara central*, la cual está en el interior de otro compartimento denominado *cámara del fluido*, con el cual se comunica a través de un orificio de salida. Debido a ciertos principios hidráulicos, en donde se da la confluencia de los fluidos de ambas cámaras se genera el efecto denominado de arrastre masivo que crea un alineamiento, al modo de fila india, de las partículas en suspensión y que se conoce como enfoque hidrodinámico.



**Figura 35: Sistema de Aspiración y Cámaras de un Citómetro:** La fotografía y las ilustraciones resumen el proceso de aspiración de una muestra desde el momento en que se coloca en la boquilla del citómetro y es llevado al compartimento de cámaras por el sistema hidráulico. En la ilustración izquierda se esquematiza el sistema de cámaras y en la ilustración superior derecha se esquematiza el sistema de presión y recorrido de la muestra hasta el compartimento de cámaras.

En segundo lugar, está el sistema óptico que está compuesto por dos tipos de ópticas:

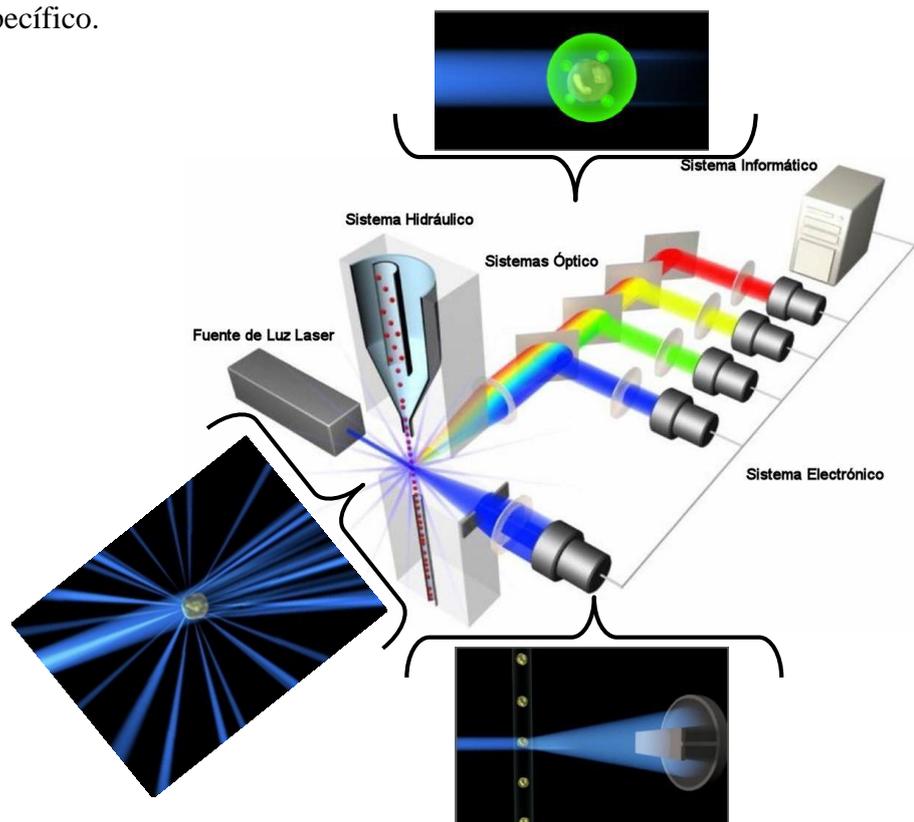
- La óptica de excitación, compuesta por la fuente de láser y lentes que enfocan y dirigen el haz de luz.
- La óptica de lectura, compuesta por lentes de recolección de la luz emitida luego de la interacción entre el haz del láser y las partículas, y el sistema de espejos y filtros para direccionar longitudes de onda específicas hacia los detectores correspondientes. Estos filtros ópticos son los que seleccionan las longitudes de onda que deja pasar hacia el detector. Es importante resaltar que este sistema óptico de lectura está acoplado al sistema informático.

Una vez que la suspensión de células ha sido acomodado bajo el régimen del sistema hidráulico, las células recorrerán un trayecto en la tubulación del aparato hasta que llegan a una región denominada *punto de interrogación*. En esta región se encuentra el haz del láser<sup>30</sup>. Cuando las células individuales atraviesan el plano del haz de láser ocurre la dispersión de la luz de láser como resultado de la interacción de esta luz con la partícula. Esto a su vez produce un cambio de dirección de la luz

<sup>30</sup> Conjunto de videos explicativos sobre el modo de operación y la forma de obtención de datos: [Citometría](#)

del láser (no de la longitud de onda) en todas las direcciones del espacio. La luz dispersada en ángulo cónico pequeño ( $0-10^\circ$ ) que casi coincide con la dirección de la luz incidente, es llamada FSC (del inglés; Forward Scatter), y ofrece el acceso a la medida del tamaño de la partícula en relación a la proporción de la dispersión producida; y la luz dispersada en ángulo recto llamada SSC (del inglés; Side Scatter) se relaciona con la complejidad de la estructura interna de la partícula. Estos efectos ópticos son entonces capturados por la óptica de lectura, que transforman estas señales físicas (de naturaleza óptica) en señales electrónicas (digitales).

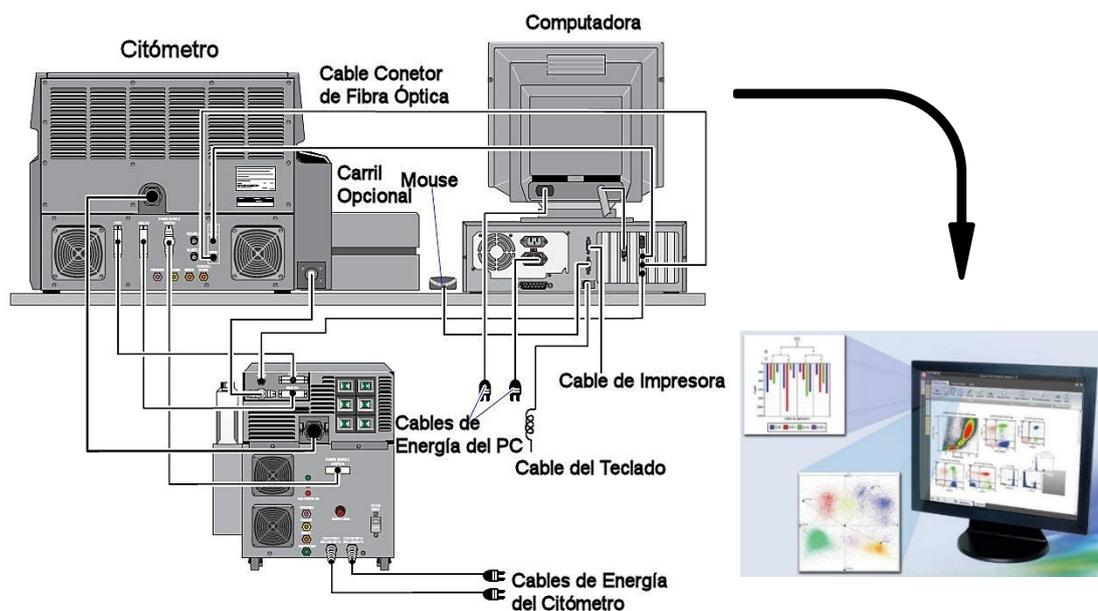
Además de los parámetros físicos de las células, los citómetros son capaces de detectar y analizar la luz fluorescente emitida por las células cuando estas son “teñidas” con anticuerpos específicos conjugados con moléculas fluorescentes. Por tanto, las células que expresen un marcador en mayor cantidad generaran una señal de mayor intensidad que permite, a través del sistema informático, el reconocimiento selectivo de cada tipo de células de acuerdo al patrón de expresión de cierto marcador específico.



**Figura 36: Componentes Internos de un Citómetro y Mecanismo de Funcionamiento:** La ilustración central esquematiza los principales componentes de cada sistema (hidráulico, óptico e informático) haciendo referencia al modo de operación integrado entre ellos. Las ilustraciones periféricas hacen referencia a los acontecimientos que toman lugar en la región denominada punto de interrogación y los componentes que captan los efectos físicos y los transforman en pulsos eléctricos para el sistema informático. Conjunto de imágenes disponibles en <http://regmed.musc.edu/flowcytometry/flowcytometry.html>

Por último, se encuentra el sistema informatizado que está compuesto por módulos electroinformáticos internos del citómetro que transcodifican los pulsos eléctricos enviados por la interface del sistema electro-óptico y los envía, ya en formato digital, a una computadora central de operación. Toda esta información es accesible, y editable a través de un software específico, que además permite controlar y calibrar las variables de cada sistema del citómetro.

Es importante resaltar, que el entendimiento y manejo del software resultan relevantes para el investigador, en relación al potencial discriminatorio de esta tecnología. Por eso las diferentes combinaciones selectivas y secuenciales de los parámetros de evaluación en el software de operación, denominados *histograms* y *gating*, constituyen el pilar que fundamenta la validación los resultados obtenidos en citometría<sup>31</sup>.



**Figura 37: Sistema Electroinformático de un Citómetro:** Las imágenes, de carácter general, muestran un citómetro y sus componentes electrónicos auxiliares para su acoplamiento con el sistema informático. En la imagen inferior derecha es posible observar el formato mediante el cual son representados, en la pantalla del monitor, los resultados procesados por el citómetro a través del software específico. Modificado a partir del manual del usuario de COULTER® EPICS® XL™ Flow Cytomete. Disponible en:

<https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=4237298CA.pdf>

<sup>31</sup> Como más de una vez se resaltó, en este trabajo se siguieron las recomendación de los protocolos ISHAGE estandarizados por Sutherland *et al.*, 1996, que hacen justamente referencia en la construcción de los *gates* e histogramas para contabilizar células CD34<sup>+</sup> en citometría (apéndice 7.5)

### 2.2.5.2 Tinción para Citometría

En este trabajo se utilizó el producto [CD34Count Kit](#) (del fabricante Dako), que permite teñir las células contenidas en las diferentes suspensiones mediante el uso de dos anticuerpos monoclonales específicos (anti-CD34 y anti-CD45). Además de estos anticuerpos, el kit contiene una suspensión de perlas, denominadas perlas de conteo (CytoCoun, nombre comercial del producto), con concentración conocida. Por tanto, este kit, además de cuantificar la cantidad absoluta y calcular la concentración de estas células específicamente, utilizando la adaptación de los protocolos estandarizado por el método ISHAGE (Sutherland *et al.*, 1996), complementado cuando fuera necesario, por el manual original del propio kit, permitió identificar y seleccionar las células CD34<sup>+</sup>.

La sangre separada al inicio del tratamiento, la suspensión de células mononucleares, y la suspensión de las células CD34<sup>+</sup> aislada con las perlas Dynal, fueron teñidas utilizando el protocolo establecido por el kit de tinción según las recomendaciones de fabricante, por duplicado, y finalmente analizadas por citometría (ver apéndice 2). Para acceder al valor absoluto de células CD34<sup>+</sup> en las diferentes suspensiones (sangre periférica, células CD34<sup>+</sup> aisladas y fracción de células mononucleares) se siguieron las recomendaciones ISHAGE y del fabricantes del kit de tinción, en las que el número de eventos contabilizados en la región 4 (D) del panel de *gates*<sup>32</sup> se multiplica por la relación que guardan con las perlas de conteo CytoCoun (1154 para el kit que se adquirió) y se divide por el valor absoluto de perlas de conteo adquirida por la región 7 (H) de nuestra adaptación<sup>33</sup> (región D x 1154)/región H, y el valor resultante es expresado en números de células CD34<sup>+</sup>/μl.

Fue posible acceder a la discriminación entre las células viables y no viables utilizando el reactivo 7 actinomisina D (7-AAD) también incluido en el kit de tinción, mediante la selección en un *gate* específico (en la región 8(J)) de nuestro panel de *gates*).

Por último es importante agregar que se utilizó un tiempo de 300s en el conteo de cada muestra, para garantizar un número mínimo de eventos registrados por el citómetro y validar los conteos.

---

<sup>32</sup> Es un término del inglés utilizado en citometría de flujo para designar una región o ventana de análisis.

<sup>33</sup> Esta región equivale a la región R6 del manual del fabricante del kit de conteo.

### 2.3 Métodos de Análisis y Registro

Los registros<sup>34</sup> de procedencia, de conteos y los cálculos de concentración, factor de concentración, cantidad absoluta y rendimiento fueron realizados con Microsoft Excel ver. 2013 de acuerdo a la licencia del fabricante. Los análisis estadísticos juntos con las gráficas y tablas fueron realizados con la plataforma estadística [SPSS](#) ver.21 de IBM de acuerdo a la licencia del fabricante.

Se compararon los diferentes conteos absolutos y las concentraciones relativas antes y después de cada método de separación de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy). Además, se contrastaron los experimentos del protocolo final con los experimentos del protocolo piloto y con los experimentos del método de Buffy Coat, tanto en su arreglo de grupo como en sus arreglos de parejas.

También fueron comparados los experimentos en función de las diferentes procedencias de muestra de sangre (donantes Normales vs Muerte Encefálica). Este diseño experimental ofreció por tanto la oportunidad de contrastar los diferentes métodos de procesamiento de sangre, los diferentes protocolos experimentales y las diferentes procedencias de muestras de sangre.

Los datos de tendencia y de dispersión son colocados en las tablas de Datos Descriptivos seguidas de gráfico comparativo en formato de barra con código de colores. Los análisis estadísticos de comparación entre los grupos fueron realizados sobre los valores de las tablas de datos descriptivos (que se indica en el texto asociado) y son colocados en cuadros donde se indica con el título la variable que fue analizada, y en cada fila se especifican los grupos de contraste que son analizados resaltados en gris.

Por otro lado, dado que en los diferentes análisis comparativos el N fue siempre menor que 10 para alguna de las muestras, y que por tal motivo no se puede asumir la condición de normalidad, la comparación entre los grupos se realizó mediante el uso de test no paramétricos asumiendo la condición de significación para un  $p < 0.05$  (será resaltado en amarillo), y para los  $p > 0.05$  se asumirá la condición no significativa y el valor de  $p$  será acompañado por la sigla NS.

---

<sup>34</sup> El archivo en formato \*.xls (excel) (Datos Experimentales) adjunto al documento en la versión electrónica contiene la información de todas las variables analizadas para cada una de las muestras. Además, en la sección 7.3 del apéndice se diseñó un esquema para visualizar el número y la procedencia de la muestra que fueron procesada en cada método de concentración/separación de células mononucleares.

### **3 RESULTADOS**

En esta sección se muestran los resultados de todas las evaluaciones para cada uno de los diferentes métodos de procesamiento de la sangre. También se presentan las mismas evaluaciones en las muestras de sangre periférica de distinta procedencia (donantes normales y donantes en muerte encefálica). Los valores de conteo celulares y rendimiento de las técnicas son expresados como la media seguido y entre paréntesis del desvío estándar correspondiente (media (D.E.)).

#### **3.1 Valores Basales Previos al Procesamiento de la Sangre**

En esta subsección se muestran los resultados de las evaluaciones con las muestras de sangre antes de ser procesadas.

##### **3.1.1 Concentración de Células Mononucleares en Sangre**

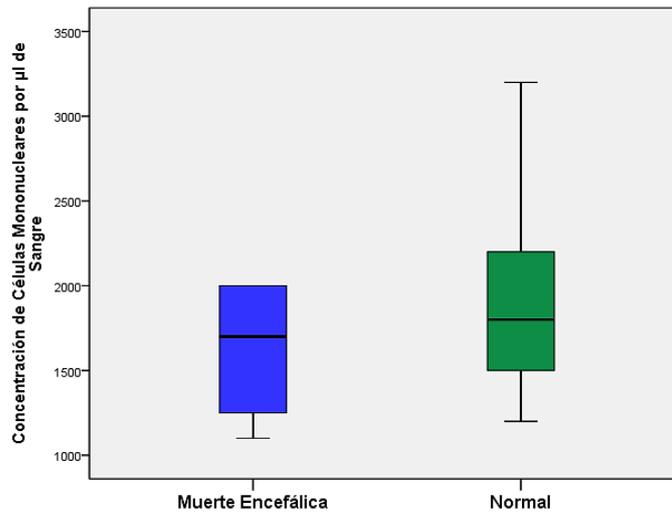
Esta variable informa la cantidad de células mononucleares que hay por  $\mu\text{l}$  de sangre, medida en cámara Neubauer, en función de la procedencia de las muestras de sangre periférica.

**Datos Descriptivos**

**Concentración de Células Mononucleares**

<b>Procedencia de la Muestra de Sangre</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Error típ. de la media</b>	<b>Desv. típ.</b>	<b>Mediana</b>	<b>Varianza</b>
<b>Muerte Encefálica</b>	4	1625,00	225,000	450,000	1700,00	202500,00
<b>Normal</b>	12	1925,83	168,057	582,166	1800,00	338917,42

**Tabla 1:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Concentración de Células Mononucleares por  $\mu\text{l}$  de Sangre en función la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal).



**Gráfico 1:** Diagrama de cajas, en base a los valores de la tabla 1, para la variable Concentración de Células por µl de sangre en función la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica (azul) vs Normal (verde)).

### Análisis Comparativo para la Variable Concentración de Células Mononucleares por µl de Sangre

Grupos de Contraste	Prueba de Contraste	Valor de p
Procedencia de la Muestras de Sangre: Muerte Encefálica vs Normal	Test U de Mann-Whitney	<b>0,599 NS</b>

**Tabla 2:** Análisis comparativo, en base a los valores de la tabla 1, para la variable Concentración de Células Mononucleares en sangre en función la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal).

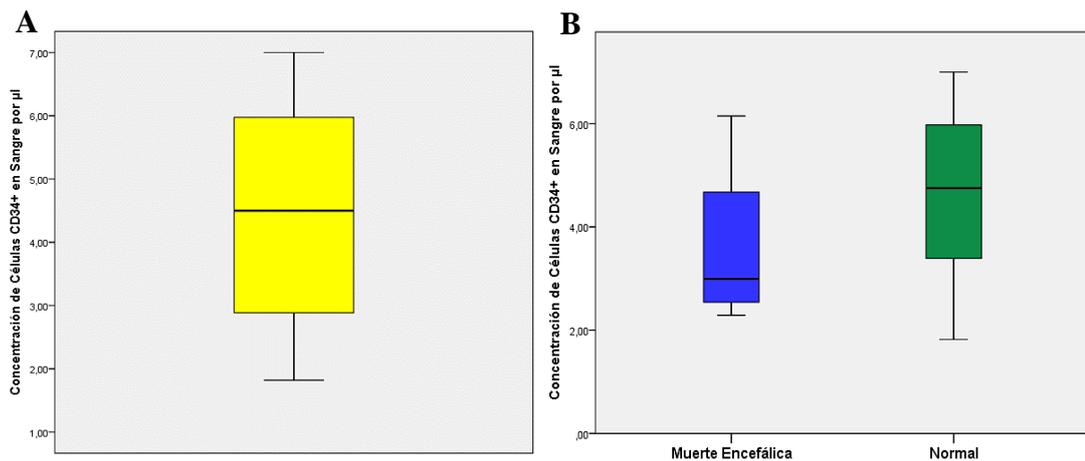
En la evaluación de esta variable en función de la procedencia de las muestras de sangre se observa que con sangre en condición de muerte encefálica la concentración es de 1650 (D.E.: 450) células mononucleares por µl de sangre, y para la sangre de donantes normales la concentración es 1925,83 (D.E.: 582,16) células mononucleares por µl de sangre (tabla y gráfico 1), sin diferencias significativas estadísticamente (cuadro 1).

### 3.1.2 Concentración de Células CD34<sup>+</sup> en Sangre

Esta variable informa la cantidad de células CD34<sup>+</sup> que hay por  $\mu\text{l}$  de sangre sin dilución, medida en citometría de flujo, en función de la procedencia de la muestra de sangre.

Datos Descriptivos						
Concentración de Células CD34 <sup>+</sup> en Sangre por $\mu\text{l}$						
Procedencia de la Muestra de Sangre	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Muerte Encefálica	4	3,6075	,86768	1,73536	2,9950	3,011
Normal	12	4,6600	,47374	1,64109	4,7500	2,693
<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>4,3969</b>	<b>,41824</b>	<b>1,67298</b>	<b>4,5000</b>	<b>2,799</b>

**Tabla 2:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Concentración de Células CD34<sup>+</sup> en función la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal).



**Gráfico 2:** Diagrama de cajas, en base a los valores de la tabla 2, para las variables Concentración de Células CD34<sup>+</sup> en Sangre **A)** para todo el conjunto de muestras analizadas, y **B)** en función la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica (azul) vs Normal (verde)).

#### Análisis Comparativos para la Variable Concentración de Células CD34<sup>+</sup> en Sangre

Grupos de Contraste	Prueba de Contraste	Valor de p
Muerte Encefálica vs Normal	Test U de Mann-Whitney	<b>0,379 NS</b>

**Cuadro 2:** Análisis comparativos, en base a los valores de la tabla 2, para la variable Concentración de Células CD34<sup>+</sup> en función la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal).

Cuando se evalúa esta variable en función del método de procesamiento, se observa que la concentración de células CD34<sup>+</sup> en sangre periférica de individuos normales fue mayor que en las muestras de sangre en condición de muerte encefálica (4,6 (D.E.: 1,64) vs 3,6 (D.E.: 1,73) células por  $\mu$ l de sangre respectivamente) (tabla y gráfico 2), pero sin diferencia significativa en la variación (cuadro 2).

Al combinar los resultados para ambos grupos, se observa que la concentración media es 4,39 (D.E.: 1,67) células CD34<sup>+</sup> por  $\mu$ l de sangre (tabla 2).

### 3.2 Métodos de Procesamiento de la Sangre

En esta subsección se muestran los resultados que se obtuvieron luego de cada experimento concentración/separación de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat) y aislamiento inmunomagnético.

Para el método de Ficoll-Paque fueron procesadas un total de 12 muestras de sangre, de las cuales 10 de DN (4 muestras procesadas por el protocolo final) y 2 muestras de DME (1 muestra procesada por el protocolo final), y para el método Buffy Coat fueron procesadas un total de 4 muestras de sangre, de las cuales 2 de DN y 2 de DME.

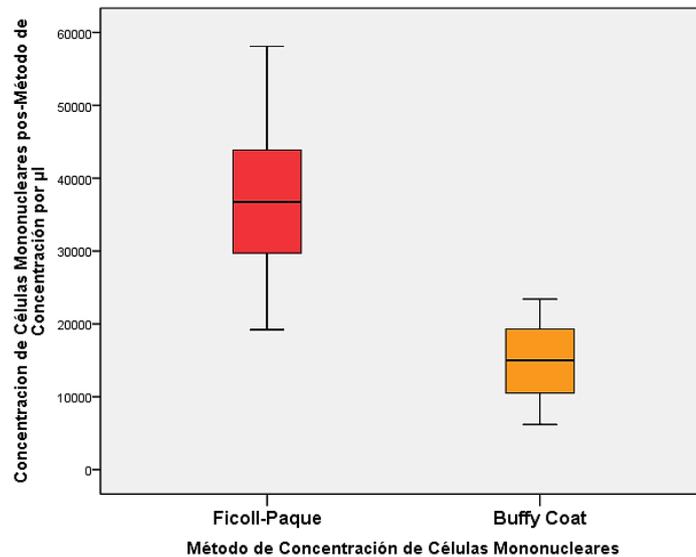
#### 3.2.1 Concentración de Células Mononucleares post-Métodos de Concentración/Separación de Células Mononucleares

Esta variable informa la cantidad de células mononucleares por  $\mu$ l de suspensión que se obtiene luego de aplicar las técnicas de concentración/separación de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat) sobre el volumen total de sangre no estimulada y diluida en solución buffer sobre un factor 1:1

Datos Descriptivos

Concentración de Células Mononucleares						
Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Ficoll-Paque	12	37566,67	3388,043	11736,527	36750,00	1,377E+8
Buffy Coat	4	14900,00	3512,359	7024,718	15000,00	49346667

**Tabla 3:** Datos de tendencia y dispersión para las variables Concentración de Células Mononucleares pos-Método de Concentración/Separación en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat). Procedencia de las muestras de sangre según el método de procesamiento: Ficoll-Paque (10 DN y 2 DME); Buffy Coat (2 DN y 2 DME).

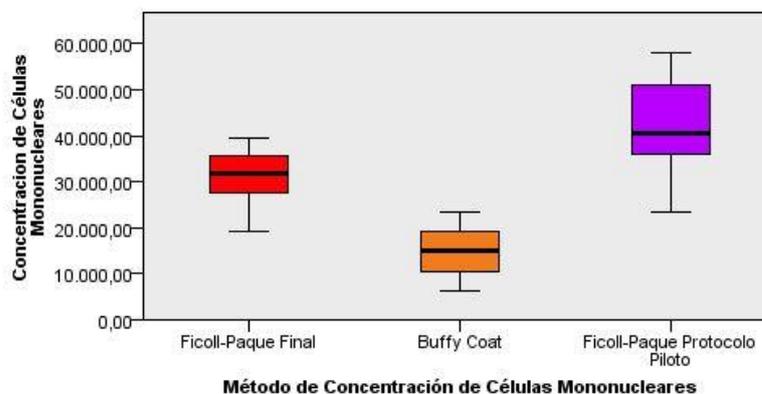


**Gráfico 3:** Diagrama de cajas, en base a los valores de la tabla 3, para la variable Concentración de Células Mononucleares post-Método de Concentración/Separación en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat),

Datos Descriptivos

Concentracion de Células Mononucleares						
Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Ficoll-Paque Final	5	30780,00	3510,185	7849,013	31700,00	61607000
Buffy Coat	4	14900,00	3512,359	7024,718	15000,00	49346667
Ficoll-Paque Protocolo Piloto	7	42414,29	4561,716	12069,166	40500,00	1,457E+8

**Tabla 4:** Datos de tendencia y dispersión para la variables Concentración de Células Mononucleares pos-Método de Concentración/Separación en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque Final - Buffy Coat - Ficoll-Paque Protocolo Piloto). Procedencia de las muestras sangre según el método de procesamiento: Ficoll-Paque (10 DN y 2 DME); Buffy Coat (2 DN y 2 DME).



**Gráfico 4:** Diagrama de cajas, en base a los valores de la tabla 4, para la variable Concentración de Células Mononucleares post-Método de Concentración/Separación en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque Final - Buffy Coat - Ficoll-Paque Protocolo Piloto).

**Análisis Comparativos para la Variable Concentración de Células Mononucleares post-Métodos de Concentración/Separación de Células Mononucleares**

<b>Grupos de Contraste</b>	<b>Prueba de Contraste</b>	<b>Valor de p</b>
Ficoll-Paque vs Buffy Coat	Test U de Mann-Whitney	<b>0,002</b>
Ficoll-Paque Final - Buffy Coat - Ficoll-Paque Protocolo Piloto	Test de Kruskal-Wallis	<b>0,008</b>
Ficoll-Paque Final vs Ficoll-Paque Protocolo Piloto	Test U de Mann-Whitney	<b>0,106 NS</b>
Ficoll-Paque Final vs Buffy Coat	Test U de Mann-Whitney	<b>0,032</b>

**Cuadro 3:** Análisis comparativos, en base a los valores de la tabla 3 y 4 respectivamente, para la variable Concentración de Células Mononucleares post-Método de Concentración/Separación en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque Final - Buffy Coat - Ficoll-Paque Protocolo Piloto).

Cuando se evalúa esta variable en función del método de procesamiento de la sangre, se observa que cuando las muestras de sangre son procesadas con la técnica de Ficoll-Paque se logra una mayor concentración de células mononucleares en comparación con los experimentos con la técnica de Buffy Coat (tabla y gráfico 3), con diferencias significativas (cuadro 3, primera fila).

Cuando son comparados todos los procesamientos, discriminando el protocolo piloto del protocolo final (tabla y gráfico 4), también se encuentran diferencias significativas (cuadro 3, segunda fila). También, se encontraron diferencias significativas cuando son comparados los procesamientos entre el protocolo Ficoll-Paque Final y Buffy Coat para ambas procedencias de las muestra de sangre (cuadro 3, tercer fila). Sin embargo no se encontraron diferencias significativas cuando fueron comparados los procesamientos con el método Ficoll-Paque del protocolo final con el protocolo piloto (cuadro 3, cuarta fila).

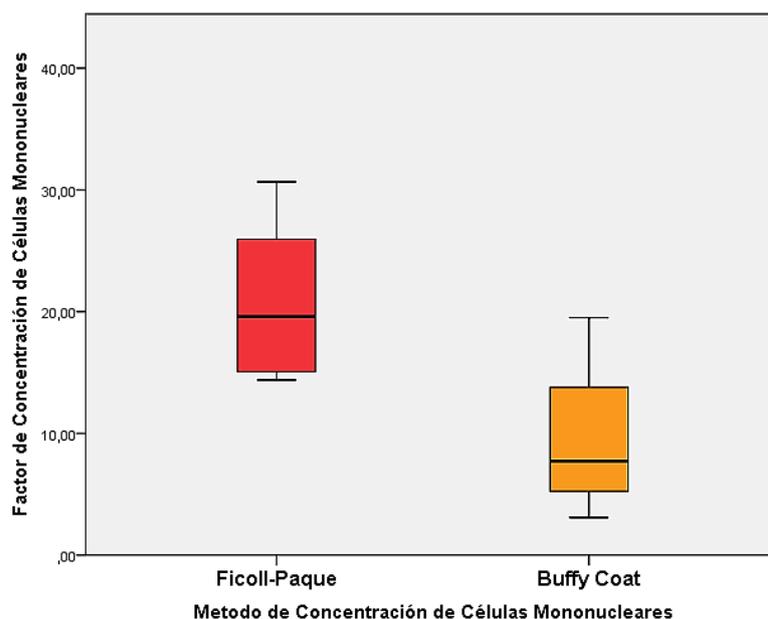
### 3.2.2 Factor de Concentración de Células Mononucleares post-Métodos de Concentración/Separación de Células Mononucleares

Esta variable relaciona la concentración de células mononucleares que se obtiene como resultado de las técnicas de concentración/separación de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat), con la concentración inicial de células mononucleares en sangre, contados en cámara Neubauer, Por tanto nos ofrece la información de cuantas veces han sido concentradas las células de la fracción mononuclear luego de cada procedimiento de concentración/separación de células mononucleares.

Datos Descriptivos

Factor de Concentración de Células Mononucleares						
Método de Concentración de Células Mononucleares	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Ficoll-Paque	12	20,7621	1,76422	6,11142	19,5893	37,349
Buffy Coat	4	9,5106	3,50588	7,01176	7,7212	49,165

**Tabla 5:** Datos de tendencia y dispersión para las variable Factor de Concentración de Células Mononucleares en función método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat). Procedencia de las muestras sangre según el método de procesamiento: Ficoll-Paque (10 DN y 2 DME); Buffy Coat (2 DN y 2 DME).



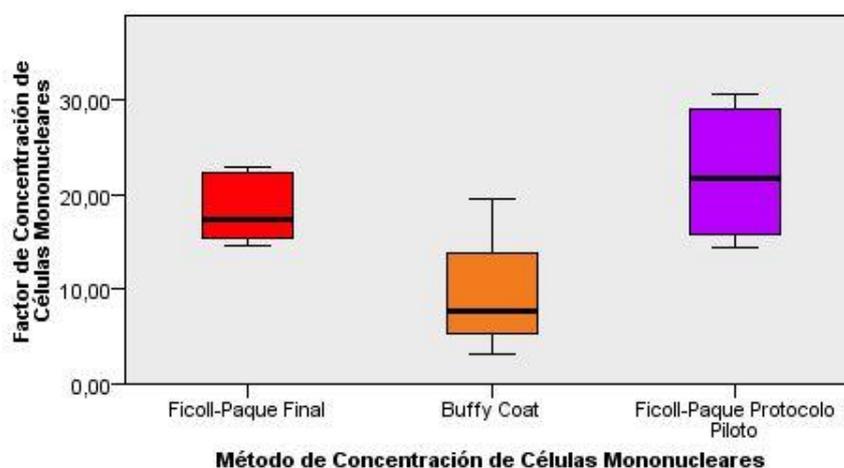
**Gráfico 5:** Diagrama de cajas, en base a los valores de la tabla 5, para la variables Factor de Concentración de Células Mononucleares en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat),

Datos Descriptivos

**Factor de Concentración de Células Mononucleares post-Métodos de Concentración/Aislamiento de Células Monor**

Método de Concentración de Células Mononucleares	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Ficoll-Paque Final	5	18,5587	1,73168	3,87215	17,4545	14,994
Buffy Coat	4	9,5106	3,50588	7,01176	7,7212	49,165
Ficoll-Paque Protocolo Piloto	7	22,3359	2,71353	7,17933	21,7241	51,543

**Tabla 6:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Factor de Concentración de Células Mononucleares pos-Método de Concentración/Separación en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque Final vs Buffy Coat vs Ficoll-Paque Protocolo Piloto). Procedencia de las muestras sangre según el método de procesamiento: Ficoll-Paque (10 DN y 2 DME); Buffy Coat (2 DN y 2 DME).



**Gráfico 6:** Diagrama de cajas, en base a los valores de la tabla 6, para la variable Factor de Concentración de Células Mononucleares en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque - Buffy Coat - Ficoll-Paque Protocolo Piloto).

**Análisis Comparativos para la Variable Factor de Concentración de Células Mononucleares**

Grupos de Contraste	Prueba de Contraste	Valor de p
Ficoll-Paque vs Buffy Coat	Test U de Mann-Whitney	<b>0,030</b>
Ficoll-Paque Final vs Buffy Coat vs Ficoll-Paque Protocolo Piloto	Test de Kruskal-Wallis	<b>0,082 NS</b>
Ficoll-Paque Final vs Ficoll-Paque Protocolo Piloto	Test U de Mann-Whitney	<b>0,639 NS</b>

Ficoll-Paque Final vs Buffy Coat	Test U de Mann-Whitney	0.111 NS
----------------------------------	------------------------	----------

**Cuadro 4:** Análisis comparativos, en base a los valores de las tablas 5 y 6 respectivamente, para la variable Factor de Concentración de Células Mononucleares en función del método de concentración de Células Mononucleares (Ficoll-Paque Final - Buffy Coat - Ficoll-Paque Protocolo Piloto).

En la evaluación de esta variable en función del método del procesamiento de la sangre, se observa que las células de la fracción mononuclear son concentradas 20,76 (D.E.: 6,11) veces usando método con Ficoll-Paque, y 9,51 (D.E.: 7,01) veces con la técnica de Buffy Coat (tabla 5). Se encontraron diferencia estadísticamente significativa en el análisis de contraste (cuadro 4, primera fila).

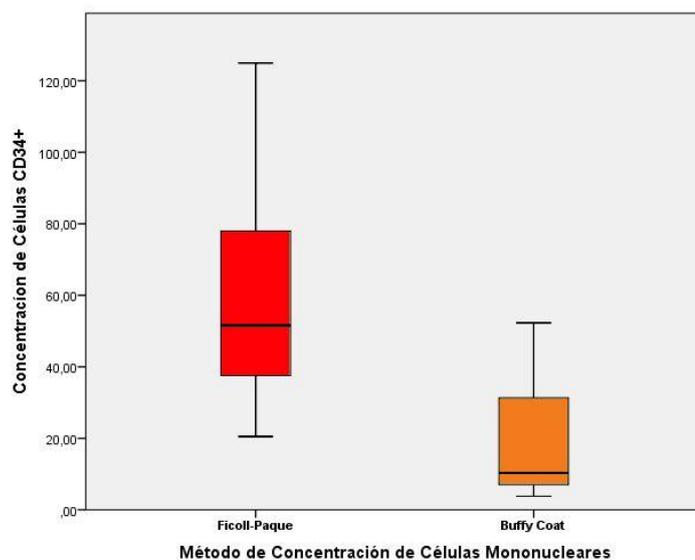
Cuando son comparados todos los procesamientos, discriminando los del protocolo piloto con los del protocolo final (gráfico 6), no se observan diferencias significativas tanto para el conjunto de los tres protocolos (cuadro 4, segunda fila), así como las comparaciones entre parejas (cuadro 4, tercera y cuarta fila).

### 3.2.3 Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares

Esta variable indica la cantidad de células de células CD34+ por  $\mu\text{l}$  de la suspensión de células mononucleares que se obtiene como resultado de las técnicas de concentración/separación de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat).

Datos Descriptivos						
Concentración de Células CD34+						
Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Ficoll-Paque	12	35,2817	8,75506	30,32841	29,8850	919,813
Buffy Coat	3	12,7633	3,09766	5,36531	14,9500	28,787

**Tabla 7:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat). Procedencia de las muestras sangre según el método de procesamiento: Ficoll-Paque (10 DN y 2 DME); Buffy Coat [2 DN y 1 DME (otra muestra no se pudo leer ya que se entupieron los conductos del citómetro por aglutinación de células rojas)].



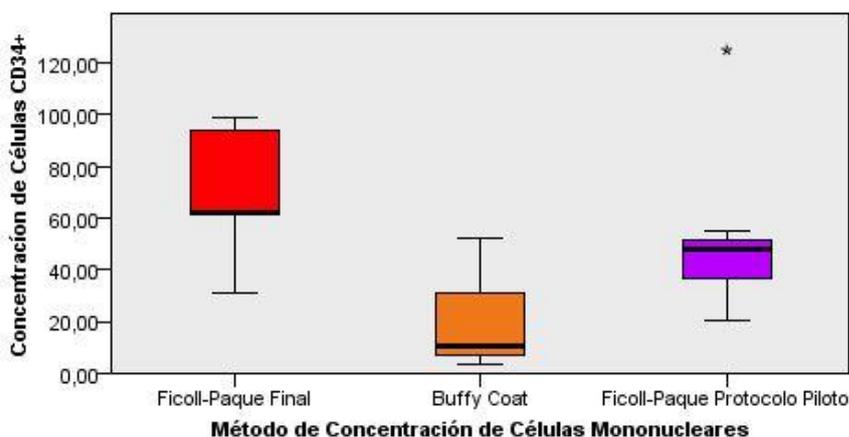
**Gráfico 7:** Diagrama de cajas, en base a los valores de la tabla 7, para la variable Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat),

Datos Descriptivos

Concentración de Células CD34+

Método de Concentración de Células Mononucleares	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Ficoll-Paque Final	5	69,5180	12,38159	27,68608	62,0000	766,519
Buffy Coat	3	22,1367	15,19973	26,32671	10,3300	693,096
Ficoll-Paque Protocolo Piloto	7	52,8657	12,84126	33,97478	48,0000	1154,286

**Tabla 8:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque Final vs Buffy Coat vs Ficoll-Paque Protocolo Piloto). Procedencia de las muestras sangre según el método de procesamiento: Ficoll-Paque (10 DN y 2 DME); Buffy Coat [2 DN y 1 DME (otra muestra no se pudo leer ya que se entupieron los conductos del citómetro por aglutinación de células rojas)].



**Gráfico 8:** Diagrama de cajas, en base a los valores de la tabla 8, para la variable Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque - Buffy Coat - Ficoll-Paque Protocolo Piloto). La estrella representa un outliner.

**Análisis Comparativos para la Variable Concentración de Células CD34<sup>+</sup> post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares**

<b>Grupos de Contraste</b>	<b>Prueba de Contraste</b>	<b>Valor de p</b>
Ficoll-Paque vs Buffy Coat	Test U de Mann-Whitney	<b>0,101 NS</b>
Ficoll-Paque Final - Buffy Coat - Ficoll-Paque Protocolo Piloto	Test de Kruskal-Wallis	<b>0,095 NS</b>
Ficoll-Paque Final vs Ficoll-Paque Protocolo Piloto	Test U de Mann-Whitney	<b>0,202 NS</b>
: Ficoll-Paque Final vs Buffy Coat	Test U de Mann-Whitney	<b>0,071 NS</b>

**Cuadro 5:** Análisis comparativos, en base a los valores de las tablas 7 y 8 respectivamente, para la variable Concentración de Células CD34<sup>+</sup> post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque Final - Buffy Coat - Ficoll-Paque Protocolo Piloto).

Cuando se evalúa esta variable en función del método de procesamiento, se observa que cuando las muestras son procesadas por el método de Ficoll-Paque resultaban más concentradas (35,28 (DE.: 30,32) células CD34<sup>+</sup> por  $\mu$ l) que cuando son procesados por el método de Buffy Coat (12,76 (DE.: 5,36) células CD34<sup>+</sup> por  $\mu$ l) (ver tabla y gráfico 7), pero sin diferencias estadísticamente significativas (cuadro 5, primera fila). Además en el análisis comparativo entre todos los procesamientos, discriminando entre los experimentos del protocolo piloto 52,86 (DE.: 33,97) células CD34<sup>+</sup> por  $\mu$ l con los del protocolo final (69,51 (DE.: 27,68) células CD34<sup>+</sup> por  $\mu$ l (tabla y gráfico 8), no se observan diferencias significativas tanto para el conjunto de los tres protocolos (cuadro 5, segunda fila), así como las comparaciones entre parejas (cuadro 5, tercera y cuarta fila).

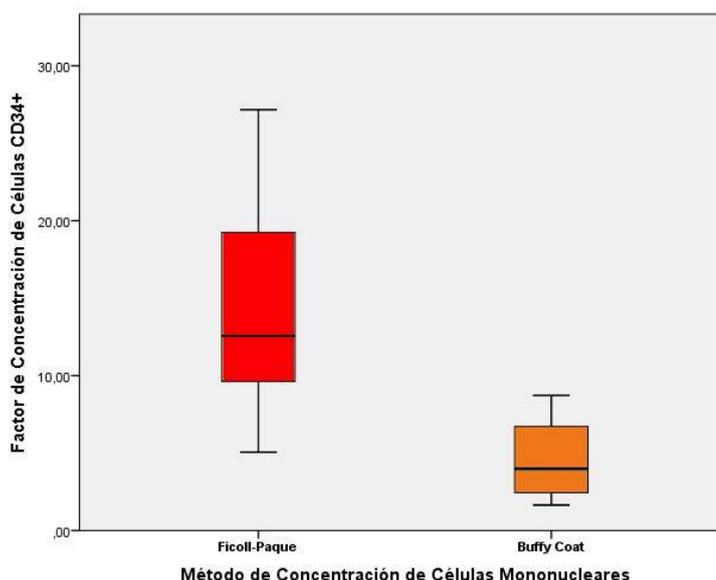
### 3.2.4 Factor de Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares

Esta variable relaciona la concentración de células CD34<sup>+</sup> en la suspensión de células mononucleares que se obtiene como resultado de las técnicas de concentración/separación de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat), con la concentración inicial de células CD34<sup>+</sup> en sangre contados por citometría de flujo. Por tanto esta variable nos ofrece la información de cuantas veces han sido concentradas las células CD34<sup>+</sup> en la fracción de células mononucleares en los diferentes procedimientos de concentración/separación de células mononucleares.

Datos Descriptivos

Factor de Concentración de Células CD34+						
Método de Concentración de Células Mononucleares	N	Media	Error tip. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Ficoll-Paque	12	14,3506	1,95362	6,76755	12,5544	45,800
Buffy Coat	4	4,5837	1,51509	3,03018	3,9838	9,182

**Tabla 9:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Factor de Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat). Procedencia de las muestras sangre según el método de procesamiento: Ficoll-Paque (10 DN y 2 DME); Buffy Coat (2 DN y 2 DME).



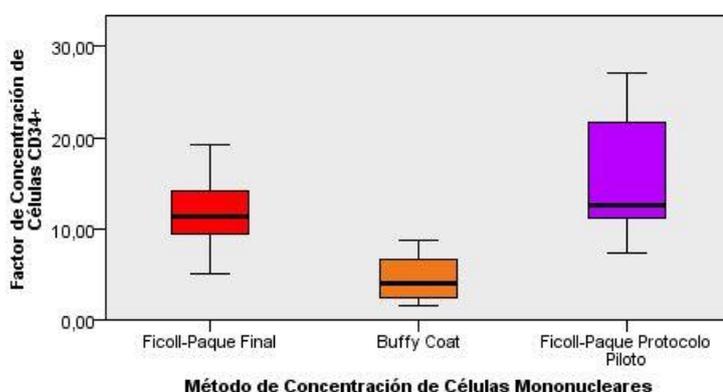
**Gráfico 9:** Diagrama de cajas, en base a los valores de la tabla 9, para la variable Factor de Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque

Datos Descriptivos

**Factor de Concentración de Células CD34+**

Método de Concentración de Células Mononucleares	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Ficoll-Paque Final	5	11,8457	2,36007	5,27727	11,4525	27,850
Buffy Coat	4	4,5837	1,51509	3,03018	3,9838	9,182
Ficoll-Paque Protocolo Piloto	7	16,1399	2,83941	7,51238	12,6316	56,436

**Tabla 10:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Factor de Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque Final vs Buffy Coat vs Ficoll-Paque Protocolo Piloto). Procedencia de las muestras sangre según el método de procesamiento: Ficoll-Paque (10 DN y 2 DME); Buffy Coat (2 DN y 2 DME).



**Gráfico 10:** Diagrama de cajas, en base a los valores de la tabla 10, para la variable Factor de Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat vs Ficoll-Paque Protocolo Piloto). La estrella representa un outlier.

**Análisis Comparativos para la Variable Factor de Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares**

Grupos de Contraste	Prueba de Contraste	Valor de p
Ficoll-Paque vs Buffy Coat	Test U de Mann-Whitney	<b>0,040</b>
Ficoll-Paque Final - Buffy Coat - Ficoll-Paque Protocolo Piloto	Test de Kruskal-Wallis	<b>0,020</b>
Ficoll-Paque Final vs Ficoll-Paque Protocolo Piloto	Test U de Mann-Whitney	<b>0,343 NS</b>
: Ficoll-Paque Final vs Buffy Coat	Test U de Mann-Whitney	<b>0.032</b>

**Cuadro 6:** Análisis comparativos, en base a los valores de las tablas 9 y 10 respectivamente, para la Variable Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque - Buffy Coat - Ficoll-Paque Protocolo Piloto).

En la evaluación de esta variable en función de método de concentración/separación de células mononucleares, se observa que en aquellas muestras tratadas por el método con Ficoll-Paque, las células CD34<sup>+</sup> son concentradas en un factor de 14,35 (DE.:6,76) veces, mientras que aquellas muestras procesadas por el método de Buffy Coat son apenas concentradas en un factor de 4,58 (DE 3,03) veces (ver tabla y gráfico 9), con diferencia significativa en los análisis de contraste (cuadro 6, primera fila).

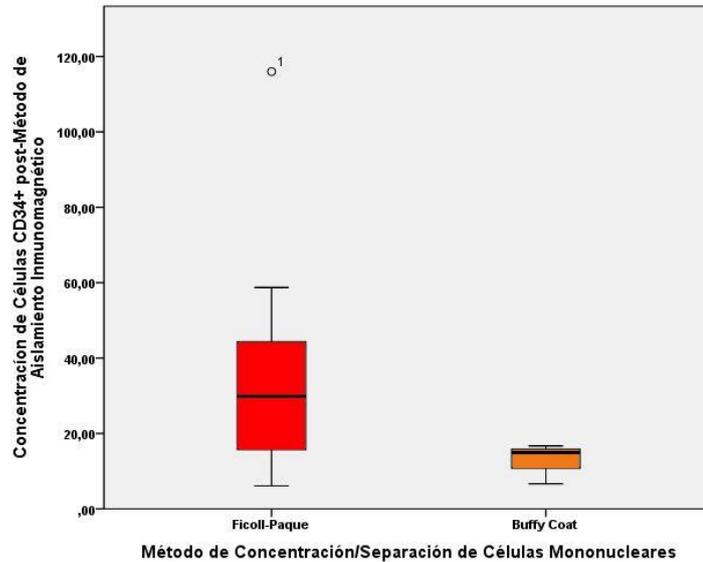
Cuando son comparados todos los procesamientos, discriminando entre los tratamientos del protocolo piloto, del protocolo final y Buffy Coat también se observan diferencias significativas (tabla y gráfico 10, cuadro 6, segunda fila). Sin embargo cuando son comparados apenas los experimentos por el método de Ficoll-Paque del protocolo piloto y final no se observan diferencias estadísticas, sin embargo cuando son contrastados los experimentos de métodos con Ficoll-Paque del protocolo final con los del método de Buffy Coat se observa diferencia estadísticamente significativa (cuadro 6, tercera y cuarta fila respectivamente).

### 3.2.5 Concentración de Células CD34<sup>+</sup> post-Método de Aislamiento Inmunomagnético

Esta variable informa la cantidad de células CD34<sup>+</sup> por µl de suspensión, que se obtiene luego de la aplicación del método de selección positiva inmunomagnético sobre la suspensión de células mononucleares concentradas y aisladas

Datos Descriptivos						
Concentración de Células CD34 <sup>+</sup> post-Método de Aislamiento Inmunomagnético						
Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares	N	Media	Error típ. de la media	Mediana	Desv. típ.	Varianza
Ficoll-Paque	12	35,2817	8,75506	29,8850	30,32841	919,813
Buffy Coat	3	12,7633	3,09766	14,9500	5,36531	28,787

**Tabla 11:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Concentración Células CD34<sup>+</sup> post-Método de Aislamiento Inmunomagnético por µl en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat). Procedencia de las muestras sangre según el método de procesamiento: Ficoll-Paque (10 DN y 2 DME); Buffy Coat [2 DN y 1 DME (una de las muestras no se pudo leer ya que se entupieron los conductos del citómetro por aglutinación de células rojas)].



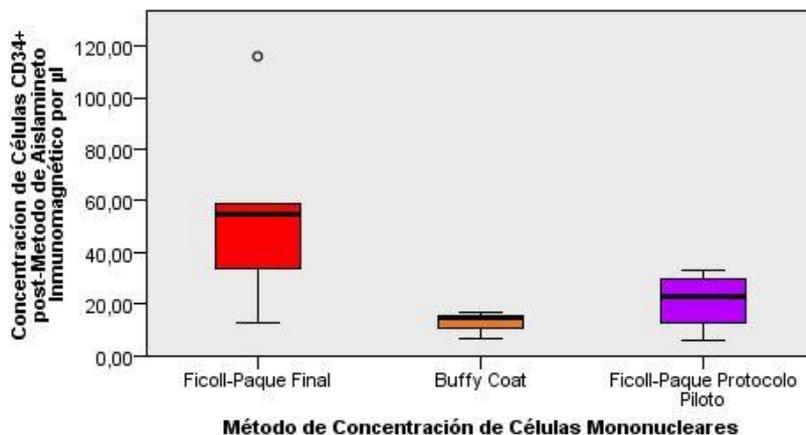
**Gráfico 11:** Diagrama de cajas, en base a los valores de la tabla 11, para la variable Concentración Células CD34+ post-Método de Aislamiento Inmunomagnético por  $\mu\text{l}$  en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat). El círculo representa un valor atípico.

**Datos Descriptivos**

**Concentración de Células CD34+ post-Método de Aislamiento Inmunomagnético**

Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares	N	Media	Error típ. de la media	Mediana	Desv. típ.	Varianza
Ficoll-Paque Final	5	55,2620	17,24902	54,7300	38,56999	1487,644
Buffy Coat	3	12,7633	3,09766	14,9500	5,36531	28,787
Ficoll-Paque Protocolo Piloto	7	21,0100	4,21316	22,8600	11,14698	124,255

**Tabla 12:** Datos de tendencia y dispersión para las variables Concentración Células CD34+ post-Método de Aislamiento Inmunomagnético por  $\mu\text{l}$  en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat vs Ficoll-Paque Protocolo Piloto). Procedencia de las muestras sangre según el método de procesamiento: Ficoll-Paque (10 DN y 2 DME); Buffy Coat [2 DN y 1 DME (una de las muestra no se pudo leer ya que se entupieron los conductos del citómetro por aglutinación de células rojas)].



**Gráfico 12:** Diagrama de cajas, en base a los valores de la tabla 12, para la variable Concentración Células CD34+ post-Método de Aislamiento Inmunomagnético por  $\mu$ l en función de la categoría método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat vs Ficoll-Paque Protocolo Piloto). El círculo representa el valor de un outlier.

### **Análisis Comparativos para la Variable Concentración Células CD34+ post-Método de Aislamiento Inmunomagnético**

<b>Grupos de Contraste</b>	<b>Prueba de Contraste</b>	<b>Valor de p</b>
Ficoll-Paque vs Buffy Coat	Test U de Mann-Whitney	<b>0,136 NS</b>
Ficoll-Paque Final - Buffy Coat - Ficoll-Paque Protocolo Piloto	Test de Kruskal-Wallis	<b>0.061 NS</b>
Ficoll-Paque Final vs Ficoll-Paque Protocolo Piloto	Test U de Mann-Whitney	<b>0,202 NS</b>
Ficoll-Paque Final vs Buffy Coat	Test U de Mann-Whitney	<b>0,143 NS</b>

**Cuadro 7:** Análisis comparativos, en base a los valores de las tablas 11 y 12 respectivamente, para la variable Concentración Células CD34+ post-Método de Aislamiento Inmunomagnético en función método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque Final vs Buffy Coat vs Ficoll-Paque Protocolo Piloto)

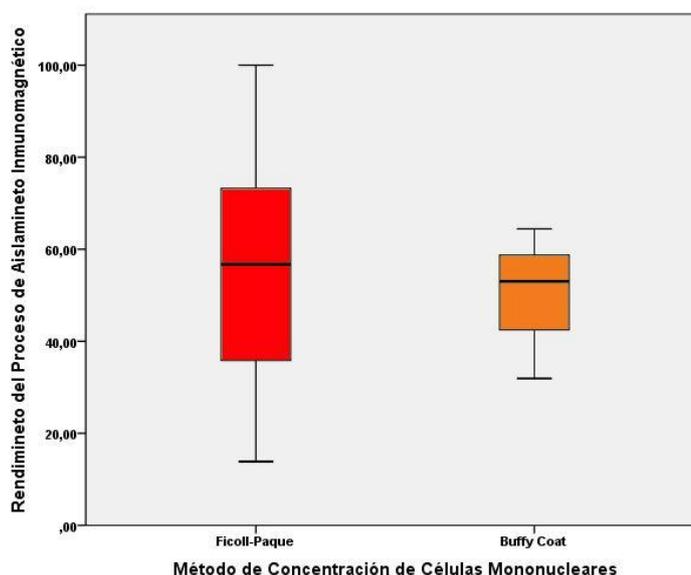
Cuando se evalúa esta variable en función del método de procesamiento, se observa que la media de la concentración resultante de células CD34<sup>+</sup> por  $\mu$ l de suspensión utilizando el método con Ficoll-Paque fue mayor que con el método Buffy Coat [35,28 (DE.: 30,32) vs 12,76 (DE.: 5,36) respectivamente] pero sin diferencias significativas (tabla y gráfico 11, cuadro 7, primera fila). Además, no se encuentran diferencias significativas tanto en los análisis comparativo entre los todos los grupos (tabla y gráfico 12; cuadro 7, segunda fila), así como entre los análisis entre las parejas de los experimentos del protocolo piloto vs final y final vs Buffy Coat (cuadro 7, tercera y cuarta fila respectivamente).

### 3.2.6 Rendimiento del Proceso de Aislamiento Inmunomagnético de Células CD34<sup>+</sup>

Estas variables relacionan la cantidad absoluta de células CD34<sup>+</sup> antes (en la suspensión de células mononucleares) y después del proceso de aislamiento inmunomagnético (en la suspensión purificada). Ofrece por tanto la información del rendimiento porcentual del proceso de purificación de células CD34<sup>+</sup> con las perlas Dynal contadas por citometría de flujo.

Datos Descriptivos						
Rendimiento del Proceso de Aislamiento Inmunomagnético						
Método de Concentración de Células Mononucleares	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Ficoll-Paque	12	55,1891	7,80612	27,04119	56,7188	731,226
Buffy Coat	3	49,7834	9,52340	16,49501	53,0142	272,085

**Tabla 13:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Rendimiento del Proceso de Aislamiento Inmunomagnético de Células CD34<sup>+</sup> en función del método de concentración de células mononucleares Ficoll-Paque vs Buffy Coat). Procedencia de las muestras sangre según el método de procesamiento: Ficoll-Paque (10 DN y 2 DME); Buffy Coat [2 DN y 1 DME (una de las muestras no se pudo leer ya que se entupieron los conductos del citómetro por aglutinación de células rojas)].



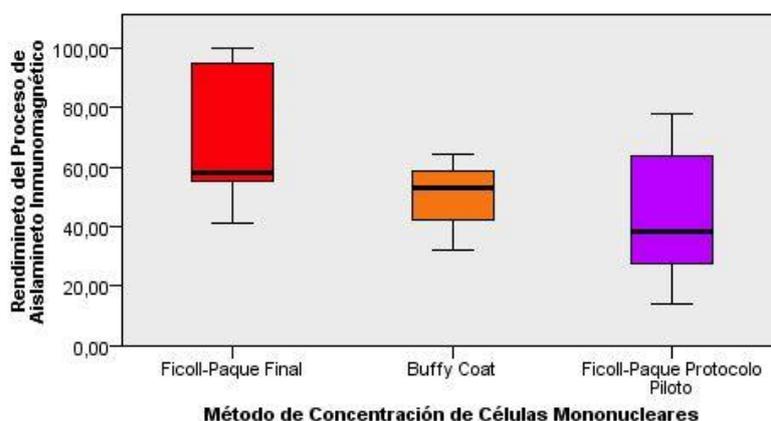
**Gráfico 13:** Diagrama de cajas, en base a los valores de la tabla 13, para la variable Rendimiento del Proceso de Aislamiento Inmunomagnético de Células CD34<sup>+</sup> en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat).

Datos Descriptivos

**Rendimiento del Proceso de Aislamiento Inmunomagnético**

Método de Concentración de Células Mononucleares	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Ficoll-Paque Final	5	69,9215	11,58457	25,90389	58,2181	671,011
Buffy Coat	3	49,7834	9,52340	16,49501	53,0142	272,085
Ficoll-Paque Protocolo Piloto	7	44,6660	9,12748	24,14905	38,3882	583,177

**Tabla 14:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Rendimiento del Proceso de Aislamiento Inmunomagnético de Células CD34+ en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat vs Ficoll-Paque Protocolo Piloto). Procedencia de las muestras sangre según el método de procesamiento: Ficoll-Paque (10 DN y 2 DME); Buffy Coat [2 DN y 1 DME (otra muestra no se pudo leer ya que se entupieron los conductos del citómetro por aglutinación de células rojas)].



**Gráfico 14:** Diagrama de cajas, en base a los valores de la tabla 14, para la variable Rendimiento del Proceso de Aislamiento Inmunomagnético de Células CD34+ en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat vs Ficoll-Paque Protocolo Piloto).

**Análisis Comparativos para la Variable Rendimiento del Proceso de Aislamiento Inmunomagnético de Células CD34+**

Grupos de Contraste	Prueba de Contraste	Valor de p
Ficoll-Paque vs Buffy Coat	Test U de Mann-Whitney	<b>0,734 NS</b>
Ficoll-Paque Final - Buffy Coat - Ficoll-Paque Protocolo Piloto	Test de Kruskal-Wallis	<b>0.338 NS</b>
Ficoll-Paque Final vs Ficoll-Paque Protocolo Piloto	Test U de Mann-Whitney	<b>0,393 NS</b>
Ficoll-Paque Final vs Buffy Coat	Test U de Mann-Whitney	<b>0,202 NS</b>

**Cuadro 8:** Análisis comparativos, en base a los valores de las tablas 13 y 14 respectivamente, para la variable Rendimiento del Proceso de Aislamiento Inmunomagnético de Células CD34<sup>+</sup> en función método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque Final vs Buffy Coat vs Ficoll-Paque Protocolo Piloto).

En las evaluaciones de esta variable no se observaron diferencias significativas entre los método con Ficoll-Paque y Buffy Coat (55,18% (D.E.: 27,04) vs 49,78% (D.E.: 16,49) respectivamente) (tabla y gráfico 13, cuadro 8; primera fila). Del mismo modo, cuando son analizados los procesamientos discriminando entre los todos los grupo y entre las parejas de los experimentos del protocolo piloto, final y Buffy Coat (tabla y grafico 14, cuadro 8; segundas, tercera y cuarta fila respectivamente), no se observaron diferencia significativas.

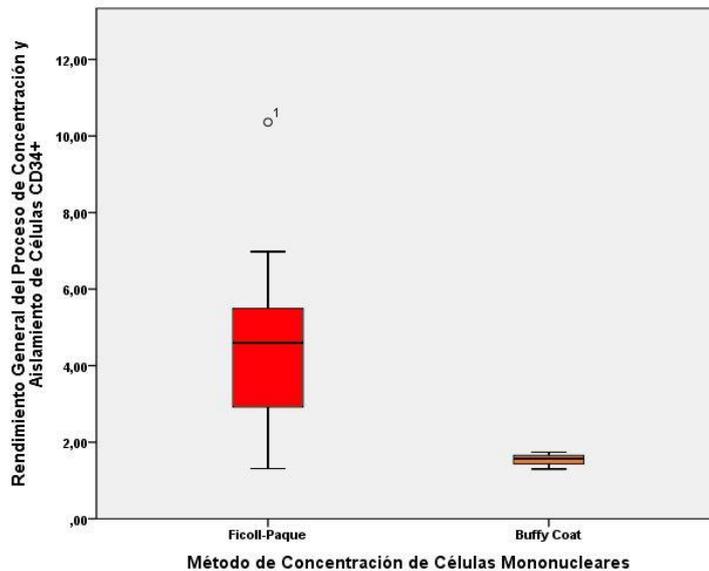
### 3.2.7 Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34<sup>+</sup>

Estas variables relacionan la cantidad absoluta de células CD34<sup>+</sup> resultantes luego de los procesos de concentración/separación de células mononucleares y aislamiento inmunomagnético, con la cantidad absoluta de células CD34<sup>+</sup> en los 40ml de sangre, calculadas a partir de la concentración inicial<sup>35</sup>. Por tanto nos ofrece la información sobre el porcentaje de recuperación de células CD34<sup>+</sup>, en base a las las cantidades absolutas relativas de estas células, para cada método de concentración/separación de células mononucleares.

Datos Descriptivos						
Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34 <sup>+</sup>						
Método de Concentración de Células Mononucleares	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Ficoll-Paque	12	4,5792	,71869	2,48960	4,6000	6,198
Buffy Coat	3	1,5367	,12811	,22189	1,5700	,049

**Tabla 15:** Datos de tendencia y dispersión para la variables Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34<sup>+</sup> en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat). ). Procedencia de las muestras sangre según el método de procesamiento: Ficoll-Paque (10 DN y 2 DME); Buffy Coat [2 DN y 1 DME (otra muestra no se pudo leer ya que se entupieron los conductos del citómetro por aglutinación de células rojas)].

<sup>35</sup> Por el hecho que los cálculos del Factor de Concentración de Células CD34<sup>+</sup> y del Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34<sup>+</sup> son realizados a partir de las concentraciones iniciales y resultantes luego de todo el procesado de aislamiento, estas variables son proporcionales, y debidos a esto solamente se exhibirán los resultados correspondientes a la variable Rendimiento



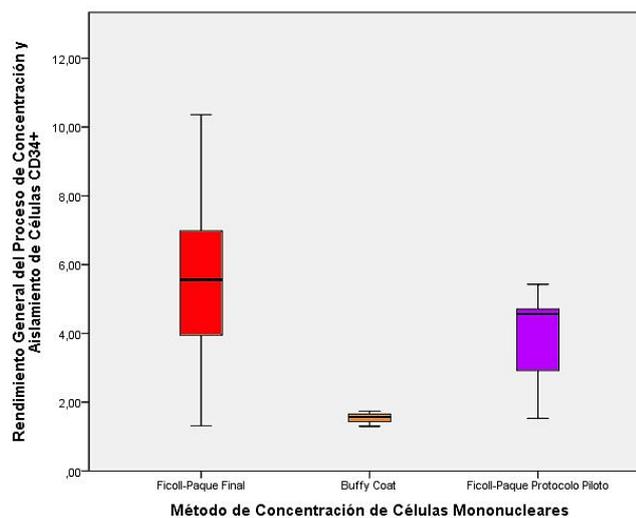
**Gráfico 15:** Diagrama de cajas, en base a los valores de la tabla 15, para la variables Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34+ en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat). El círculo representa el valor de un outlier.

**Datos Descriptivos**

**Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34+**

Método de Concentración de Células Mononucleares	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Ficoll-Paque Final	5	5,6320	1,51137	3,37954	5,5600	11,421
Buffy Coat	3	1,5367	,12811	,22189	1,5700	,049
Ficoll-Paque Protocolo Piloto	7	3,8271	,55620	1,47157	4,5700	2,166

**Tabla 16:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34+ en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque Final vs Buffy Coat vs Ficoll-Paque Protocolo Piloto). Procedencia de las muestras sangre según el método de procesamiento: Ficoll-Paque (10 DN y 2 DME); Buffy Coat [2 DN y 1 DME (otra muestra no se pudo leer ya que se entupieron los conductos del citómetro por aglutinación de células rojas)].



**Gráfico 16:** Diagrama de cajas, en base a los valores de la tabla 16, para la variables Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34+ en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat vs Ficoll-Paque Protocolo Piloto)

### **Análisis Comparativos para la Variable Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34+**

<b>Grupos de Contraste</b>	<b>Prueba de Contraste</b>	<b>Valor de p</b>
Ficoll-Paque vs Buffy Coat	Test U de Mann-Whitney	<b>0,048</b>
Ficoll-Paque Final - Buffy Coat - Ficoll-Paque Protocolo Piloto	Test de Kruskal–Wallis	<b>0,094 NS</b>
Ficoll-Paque Final vs Ficoll-Paque Protocolo Piloto	Test U de Mann-Whitney	<b>0,343 NS</b>
Ficoll-Paque Final vs Buffy Coat	Test U de Mann-Whitney	<b>0,143 NS</b>

**Cuadro 9:** Análisis comparativos, en base a los valores de las tablas 15 y 16 respectivamente, para la variable Factor de Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34+ en función la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal), y del Método de Concentración de Células Mononucleares (Ficoll-Paque Final - Buffy Coat - Ficoll-Paque Protocolo Piloto).

En las evaluaciones de esta variable en función del método de procesamiento de la sangre, se observaron diferencias significativas (tabla y grafico 15, cuadro 9; primera fila), donde con el método con Ficoll-Paque los rendimientos fueron mejores que con el método Buffy Coat (4,57% (DE.: 2,48) vs 1,53% (DE.: 0,22) respectivamente). Por otro lado, cuando son comparados los procesamientos de todos los grupos de experimentos no se observan diferencias significativas (tabla y gráfico 16, cuadro 9: segunda fila). De la misma manera, cuando son comparados los experimentos discriminando los del protocolo piloto vs final y final vs Buffy Coat, también no se observan diferencias significativas (tabla y gráfico 16, cuadro 9: tercera y cuarta fila respectivamente)

### 3.3 Procedencia de las Muestras de Sangre

En esta subsección se muestran los resultados que se obtuvieron luego de cada experimento<sup>36</sup> de concentración/separación y aislamiento en función de la procedencia de las muestras de sangre periférica (donantes normales y donantes en muerte encefálica).

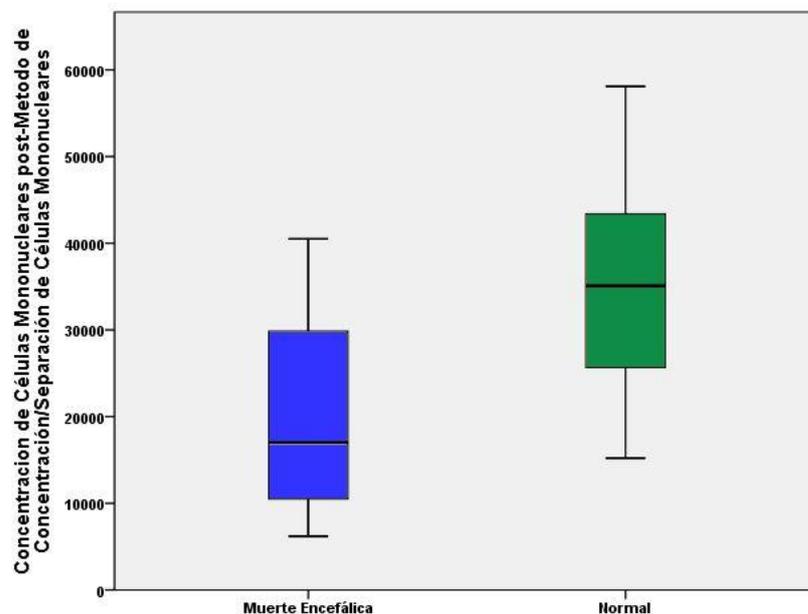
#### 3.3.1 Concentración de Células Mononucleares post-Métodos de Concentración/Separación de Células Mononucleares

Datos Descriptivos

**Concentracion de Células Mononucleares**

Procedencia de la Muestra de Sangre	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Muerte Encefálica	4	20175,00	7292,962	14585,924	17000,00	2,127E+8
Normal	12	35808,33	3726,572	12909,226	35100,00	1,666E+8

**Tabla 17:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Concentración de Células Mononucleares post-Método de Concentración/Separación en función la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal). Método de procesamiento de las muestras de sangre según la procedencia: DN (10 Ficoll-Paque y 2 Buffy Coat); DME (2 Ficoll-Paque y 2 Buffy Coat).



**Gráfico 17:** Diagrama de cajas, en base a los valores de la tabla 17, para la variable Concentración de Células Mononucleares post-Método de Concentración/Separación por  $\mu\text{l}$  en función la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica (azul) vs Normal (verde)).

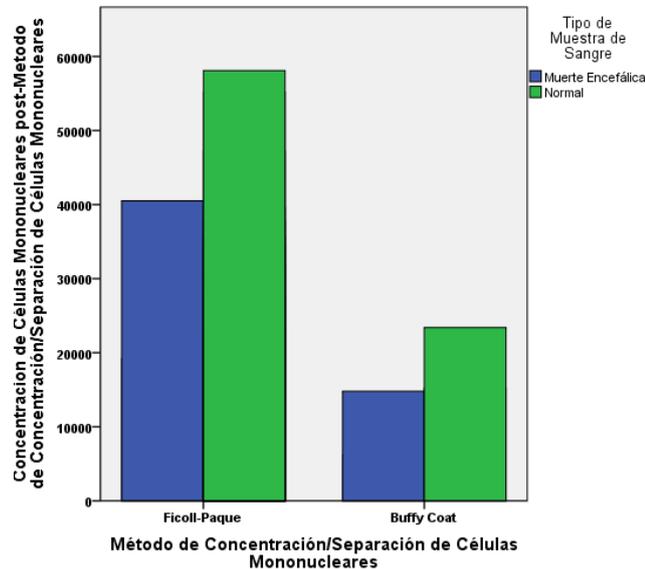
<sup>36</sup> Las variables de cada subsección corresponden a las mismas que en la sección anterior, únicamente cambia en que son analizadas en función de la procedencia de las muestras de sangre.

Datos Descriptivos

Concentración de Células Mononucleares

Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares	Procedencia de la Muestra de Sangre	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Ficoll-Paque	Muerte Encefálica	2	29850	10650,000	15061,4	29850	2,268E+8
	Normal	10	39110	3567,522	11281,5	36750	1,273E+8
Buffy Coat	Muerte Encefálica	2	10500	4300,000	6081,12	10500	36980000
	Normal	2	19300	4100,000	5798,28	19300	33620000

**Tabla 18:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Concentración de Células Mononucleares post-Método de Concentración/Separación en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat) y discriminado según la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal).



**Gráfico 18:** Gráfico en formato de barras, en base a los valores de la tabla 18, para la Media de la variable Concentración de Células Mononucleares post-Método de Concentración/Separación en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat) y discriminado según la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica (azul) vs Normal (verde)).

**Análisis Comparativo para la Variable Concentración de Células Mononucleares post-Métodos de Concentración/Separación**

Grupos de Contraste	Prueba de Contraste	Valor de p
Procedencia de las Muestras de Sangre: Muerte Encefálica vs Normal	Test U de Mann-Whitney	0,103 NS

**Cuadro 10:** Análisis comparativo, en base a los valores de la tabla 17, para la variable Concentración de Células Mononucleares post-Método de Concentración/Separación en función de la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal).

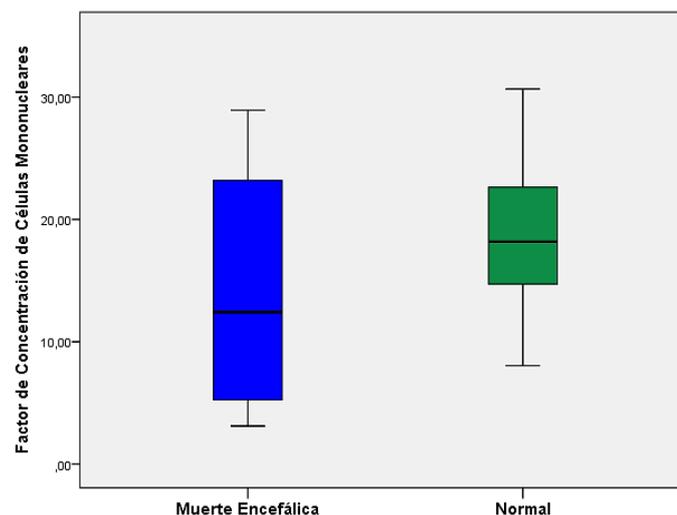
En la evaluación de esta variable en función de la procedencia de las muestras de sangre, se observa que en los procesamientos con sangre de donantes en condición de muerte encefálica las células mononucleares son menos concentradas que las muestras de donantes normales con 20175 (D.E.: 14885) y 35808 (D.E.: 12909) células mononucleares por  $\mu\text{l}$  de suspensión respectivamente, pero sin diferencias significativa (tablas y gráficos 17, cuadro 10).

Dentro de cada de método de procesamiento también se observó esta tendencia (tabla y gráfico 18).

### 3.3.2 Factor de Concentración de Células Mononucleares post-Métodos de Concentración/Separación de Células Mononucleares

Datos Descriptivos						
Factor de Concentración de Células Mononucleares						
Procedencia de la Muestra de Sangre	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Muerte Encefálica	4	14,2208	5,75160	11,50320	12,4273	132,324
Normal	12	19,1920	1,88096	6,51583	18,1786	42,456

**Tabla 19:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Factor de Concentración de Células Mononucleares en función de la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal). Método de procesamiento de la muestras de sangre según la procedencia: DN (10 Ficoll-Paque y 2 Buffy Coat); DME (2 Ficoll-Paque y 2 Buffy Coat).



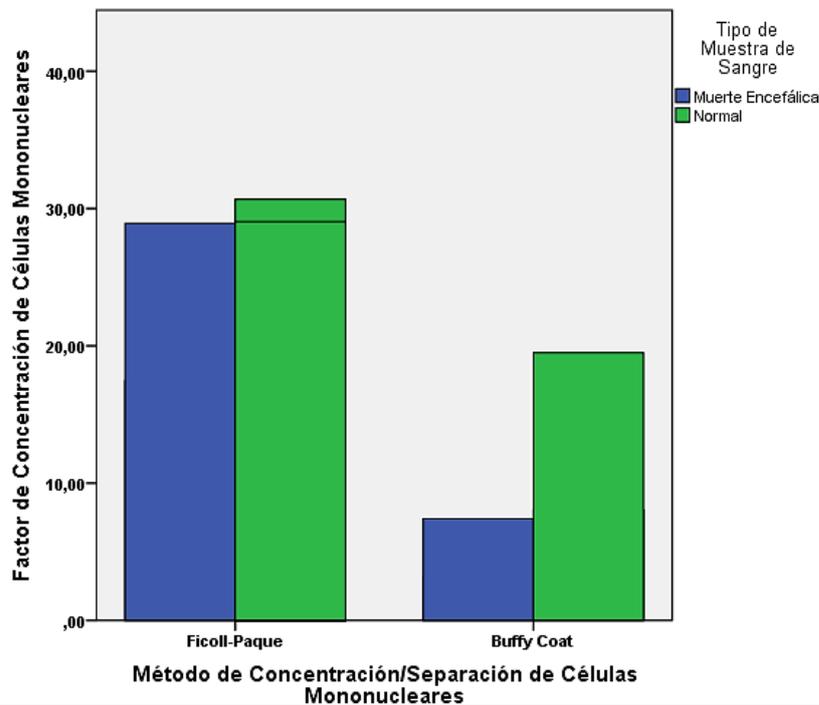
**Gráfico 19:** Diagrama de cajas, en base a los valores de la tabla 19, para la variable Factor de Concentración de Células Mononucleares en función de la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica (azul) vs Normal (verde)).

Datos Descriptivos

Factor de Concentración de Células Mononucleares

Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares	Procedencia de la Muestra de Sangre	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Ficoll-Paque	Muerte Encefálica	2	23,19	5,73701	8,1134	23,19	65,83
	Normal	10	20,28	1,91732	6,0631	19,29	36,76
Buffy Coat	Muerte Encefálica	2	5,250	2,15000	3,0406	5,250	9,245
	Normal	2	13,77	5,72884	8,1018	13,77	65,64

**Tabla 20:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Factor de Concentración de Células Mononucleares en función del Método de Concentración de Células Mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat) y discriminado según la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal).



**Gráfico 20:** Gráfico en formato de barras, en base a los valores de la tabla 20, para la media de la variable Factor de Concentración de Células Mononucleares en función del Método de Concentración de Células Mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat) y discriminado según la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica (azul) vs Normal (verde)).

### Análisis Comparativo para la Variable Factor de Concentración de Células Mononucleares

Grupos de Contraste	Prueba de Contraste	Valor de p
Procedencia de las Muestras de Sangre: Muerte Encefálica vs Normal	Test U de Mann-Whitney	0,379 NS

**Cuadro 11:** Análisis comparativo, en base a los valores de la tabla 21, para la variable Concentración de Células Mononucleares post-Método de Concentración/Separación en función la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal).

En la evaluación de esta variable en función de la procedencia de las muestras de sangre, se observa que las células de la fracción mononuclear, luego de cada procedimiento concentración/separación, son concentradas con 14,22 (D.E.: 11,5) veces en los procedimientos con sangre en condición de muerte encefálica, y 19,19 (D.E.: 6,51) veces con sangre de donantes normales con, pero sin diferencia significativa (tabla y gráfico 19 y 20, cuadro 11).

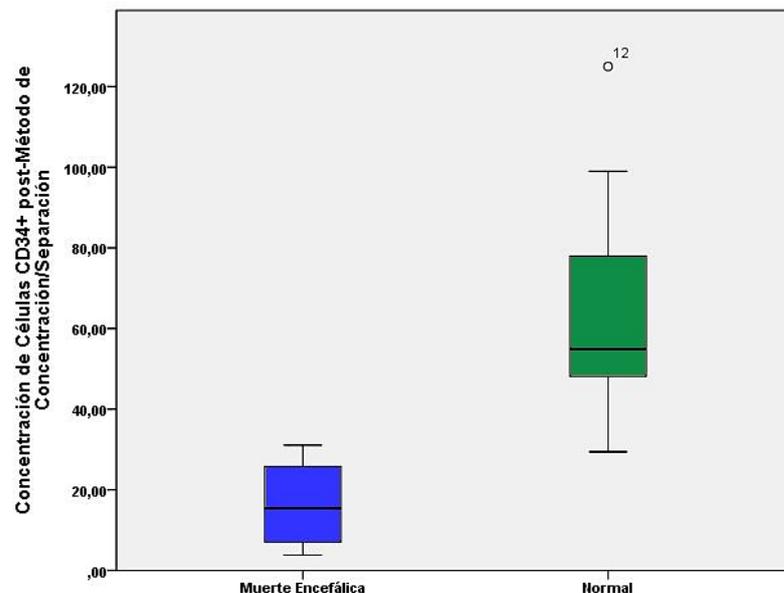
Dentro de cada de método de procesamiento también se observó esta tendencia (tabla y gráfico 20).

### 3.3.3 Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares

Datos Descriptivos

Concentración de Células CD34+						
Procedencia de la Muestra de Sangre	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Muerte Encefálica	4	16,4250	5,97713	11,95426	15,4150	142,904
Normal	11	65,3055	8,61007	28,55637	54,9000	815,467

**Tabla 21:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares, en función de la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal). Método de procesamiento de la muestras de sangre según la procedencia: DN (10 Ficoll-Paque y 2 Buffy Coat); DME (2 Ficoll-Paque y 1 Buffy Coat). Una muestra no se pudo leer por que los conductos del citómetro de obstruyeron.



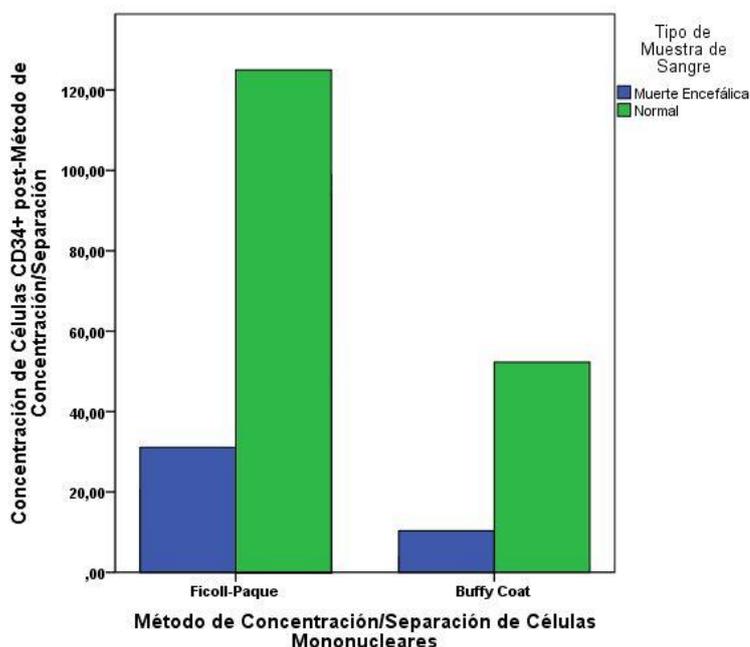
**Gráfico 21:** Diagrama de cajas para la variable Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares en función de la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica (azul) vs Normal (verde)).

Datos Descriptivos

Concentración de Células CD34+

Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares	Procedencia de la Muestra de Sangre	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Ficoll-Paque	Muerte Encefálica	2	25,80	5,29500	7,4883	25,80	56,07
	Normal	10	66,61	9,40957	29,756	58,20	885,4
Buffy Coat	Muerte Encefálica	2	7,055	3,27500	4,6315	7,055	21,45
	Normal	1	52,30	,00		52,30	,00

**Tabla 22:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat) y discriminado según la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal). Una muestra no se pudo leer por que los conductos del citómetro de obstruyeron.



**Gráfico 22:** Gráfico en formato de barras para la Media de la variable Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares en función del Método de Concentración de Células Mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat) y discriminado según la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica (azul) vs Normal (verde)).

**Análisis Comparativo para la Variable Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares**

Grupos de Contraste	Prueba de Contraste	Valor de p
Procedencia de las Muestras de Sangre: Muerte Encefálica vs Normal	Test U de Mann-Whitney	<b>0,003</b>

**Cuadro 12:** Análisis comparativo, en base a los valores de la tabla 23, para la variable Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares en función de la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal).

En la evaluación de esta variable en función de la procedencia de las muestras de sangre, se observa que la concentración resultante de células CD34<sup>+</sup> en los experimentos con sangre de donantes normales fue superior (65,3 (DE.: 28,55) células CD34<sup>+</sup>/μl) que en los experimentos con sangre en condición de muerte encefálica (16,42 (DE.: 11,95) células CD34<sup>+</sup>/μl) (tabla y gráfico 21, cuadro 12).

Dentro de cada de método de procesamiento también se observó esta tendencia (tabla y gráfico 22).

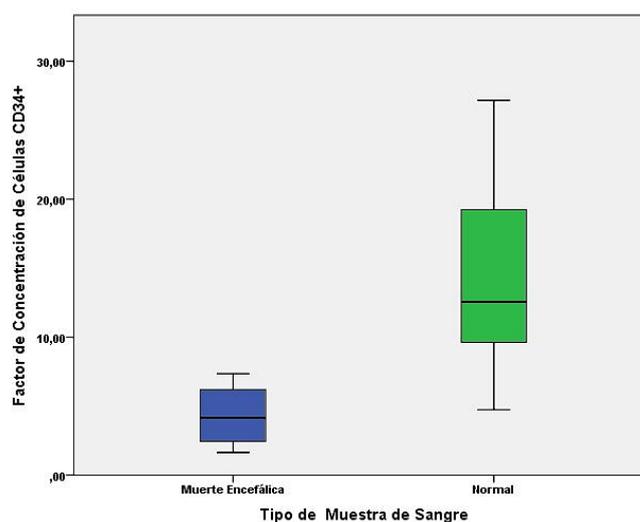
### 3.3.4 Factor de Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares

**Datos Descriptivos**

**Factor de Concentración de Células CD34+**

Procedencia de la Muestra de Sangre	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Muerte Encefálica	4	4,3204	1,22560	2,45119	4,1417	6,008
Normal	12	14,4384	1,93135	6,69040	12,5544	44,761

**Tabla 23:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares, en función de la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal). Método de procesamiento de la muestras de sangre según la procedencia: DN (10 Ficoll-Paque y 2 Buffy Coat); DME (2 Ficoll-Paque y 2 Buffy Coat).



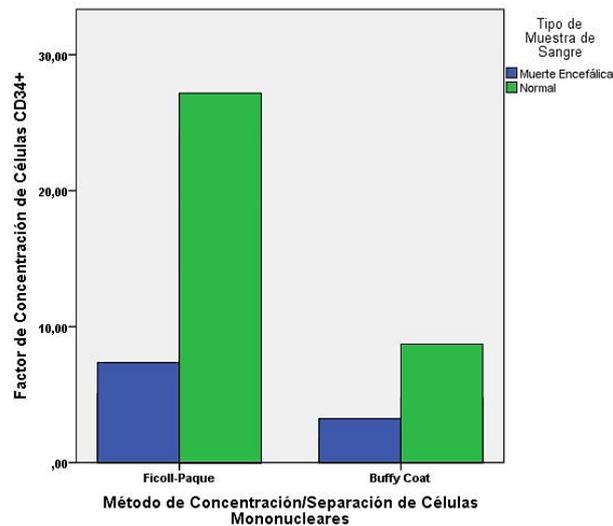
**Gráfico 23:** Diagrama de cajas para la variable Factor de Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares en función de la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica (azul) vs Normal (verde)).

Datos Descriptivos

Factor de Concentración de Células CD34+

Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares	Procedencia de la Muestra de Sangre	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Ficoll-Paque	Muerte Encefálica	2	6,2015	1,14619	1,62096	6,2015	2,628
	Normal	10	15,9804	1,94876	6,16252	13,3872	37,977
Buffy Coat	Muerte Encefálica	2	2,4394	,78873	1,11544	2,4394	1,244
	Normal	2	6,7281	1,98859	2,81228	6,7281	7,909

**Tabla 24:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Factor de Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat) y discriminado según de la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal).



**Gráfico 24:** Gráfico en formato de barras para la Media de la variable Factor de Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares en función del Método de Concentración de Células Mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat) y discriminado según la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica (azul) vs Normal (verde)).

**Análisis Comparativo para la Variable Factor de Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares**

Grupos de Contraste	Prueba de Contraste	Valor de p
Procedencia de las Muestras de Sangre: Muerte Encefálica vs Normal	Test U de Mann-Whitney	<b>0,004</b>

**Cuadro 11:** Análisis comparativo, en base a los valores de la tabla 25, para la variable Factor de Concentración de Células Mononucleares post-Método de Concentración/Separación en función de la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal).

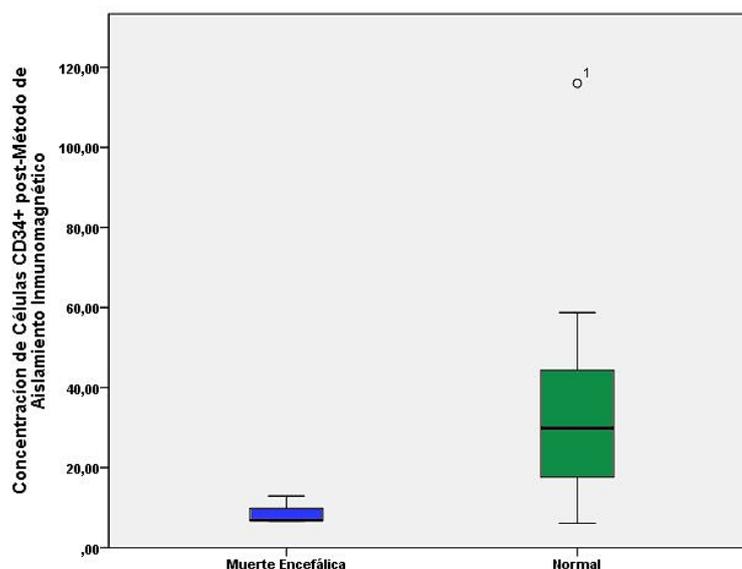
En la evaluación de esta variable en función de la procedencia de las muestras de sangre, se observa que en los experimentos con sangre de donantes normales el factor de concentración de células CD34<sup>+</sup> fue mayor que en los tratamientos con sangre en condición de muerte encefálica (14,43 (D.E.: 6,69) y 4,32 (D.E.: 2,45) veces respectivamente) (tabla y gráfico 23), con diferencia estadísticamente significativa (cuadro 11).

Dentro de cada método de procesamiento también se observó esta tendencia (tabla y gráfico 22).

### 3.3.5 Concentración de Células CD34<sup>+</sup> post-Método de Aislamiento Inmunomagnético

Datos Descriptivos						
Concentración de Células CD34 <sup>+</sup> post-Método de Aislamiento Inmunomagnético						
Procedencia de la Muestra de Sangre	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Muerte Encefálica	3	8,7833	2,05385	3,55738	6,8100	12,655
Normal	12	36,2767	8,50716	29,46965	29,8850	868,460

**Tabla 25:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Concentración Células CD34<sup>+</sup> post-Método de Aislamiento Inmunomagnético en función de la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal). Método de procesamiento de la muestras de sangre según la procedencia: DN (10 Ficoll-Paque y 2 Buffy Coat); DME (2 Ficoll-Paque y 1 Buffy Coat). Una muestra no se pudo leer por que los conductos del citómetro se obstruyeron.



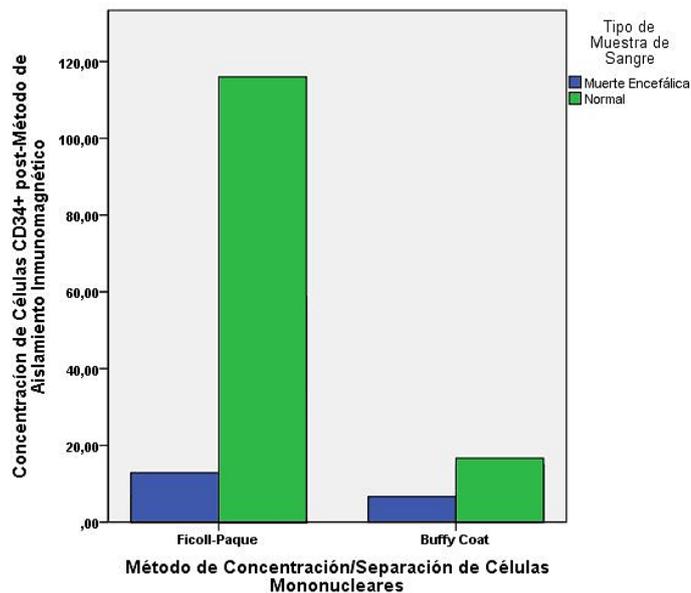
**Gráfico 25:** Diagrama de cajas para la variable Concentración de Células CD34<sup>+</sup> post-Método de Aislamiento Inmunomagnético en función de la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica (azul) vs Normal (verde)).

Datos Descriptivos

Concentración de Células CD34+ post-Método de Aislamiento Inmunomagnético

Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares	Procedencia de la Muestra de Sangre	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Ficoll-Paque	Muerte Encefálica	2	9,850	3,04000	4,2992	9,850	18,48
	Normal	10	40,37	9,74520	30,817	32,60	949,7
Buffy Coat	Muerte Encefálica	1	6,650	,00	.	6,650	,00
	Normal	2	15,82	,87000	1,2304	15,82	1,514

**Tabla 26:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Concentración Células CD34+ post-Método de Aislamiento Inmunomagnético por  $\mu\text{l}$  en Función del Método de Concentración de Células Mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat) y discriminado según la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal). Una muestra no se pudo leer por que los conductos del citómetro se obstruyeron.



**Gráfico 26:** Gráfico en formato de barras para la Media de la variable Concentración Células CD34+ post-Método de Aislamiento Inmunomagnético en función del Método de Concentración de Células Mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat) y discriminado según la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica (azul) vs Normal (verde)).

**Análisis Comparativo para la Variable Concentración Células CD34+ post-Método de Aislamiento Inmunomagnético**

Grupos de Contraste	Prueba de Contraste	Valor de p
Procedencia de las Muestras de Sangre: Muerte Encefálica vs Normal	Test U de Mann-Whitney	<b>0,031</b>

**Cuadro 12:** Análisis comparativo, en base a los valores de la tabla 27, para la variable Concentración Células CD34+ post-Método de Aislamiento Inmunomagnético en función de la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal).

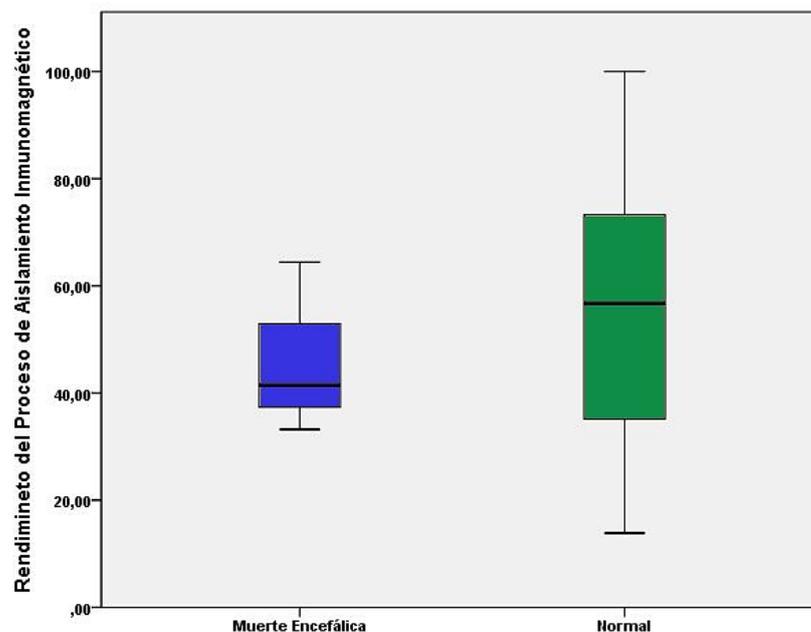
En la evaluación de esta variable en función de la procedencia de las muestras de sangre se observó que la concentración de células CD34<sup>+</sup> tras el tratamiento inmunomagnético de las muestras procesadas con sangre de donantes normales fue mayor (36,27 (DE.:29,46) células CD34<sup>+</sup>/μl) que en los tratamientos con sangre de donantes en condición de muerte encefálica (8,78 (DE.: 3,55) células CD34<sup>+</sup>/μl) (tabla gráfico 26) con diferencia significativa (cuadro 12).

Dentro de cada de método de procesamiento también se observó esta tendencia (tabla y gráfico 22).

### 3.3.6 Rendimiento del Proceso de Aislamiento Inmunomagnético de Células CD34<sup>+</sup>

Datos Descriptivos						
Rendimiento del Proceso de Aislamiento Inmunomagnético						
Procedencia de la Muestra de Sangre	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Muerte Encefálica	3	46,3626	9,33761	16,17322	41,4442	261,573
Normal	12	56,0443	7,74091	26,81531	56,7188	719,061

**Tabla 27:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Rendimiento del Proceso de Aislamiento Inmunomagnético de Células CD34<sup>+</sup> en función de la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal). Método de procesamiento de la muestras de sangre según la procedencia: DN (10 Ficoll-Paque y 2 Buffy Coat); DME (2 Ficoll-Paque y 1 Buffy Coat). Una muestra no se pudo leer por que los conductos del citómetro se obstruyeron.



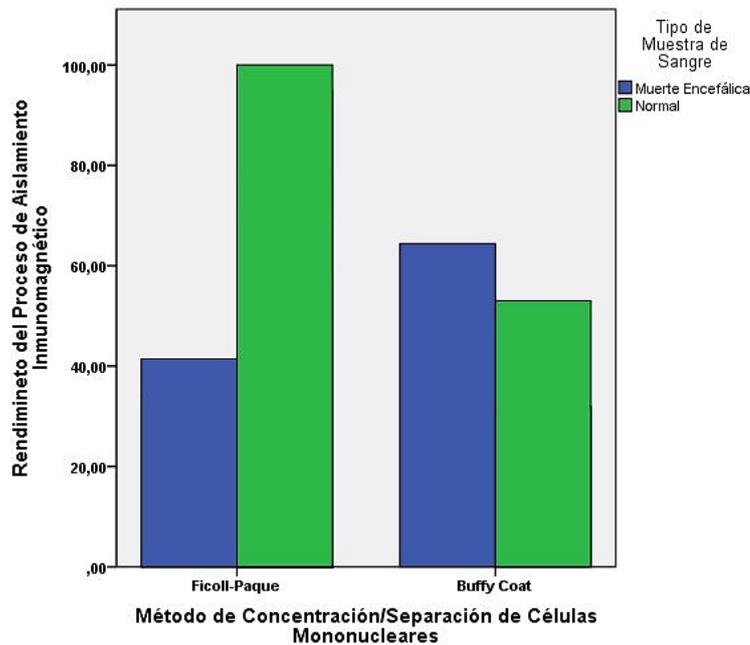
**Gráfico 27:** Diagrama de cajas para la variable Rendimiento del Proceso de Aislamiento Inmunomagnético de Células CD34<sup>+</sup> en función la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica (azul) vs Normal (verde)).

Datos Descriptivos

Rendimiento del Proceso de Aislamiento Inmunomagnético

Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares	Procedencia de la Muestra de Sangre	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Ficoll-Paque	Muerte Encefálica	2	37,33	4,11234	5,8157	37,33	33,82
	Normal	10	58,76	8,97177	28,371	58,44	804,9
Buffy Coat	Muerte Encefálica	1	64,42	,00	.	64,42	,00
	Normal	2	42,46	10,55107	14,921	42,46	222,7

**Tabla 28:** Datos de tendencia y dispersión para la variable Rendimiento del Proceso de Aislamiento Inmunomagnético de Células CD34+ en función del método de concentración de células mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat) y discriminado según la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal). Una muestra no se pudo leer por que los conductos del citómetro de obstruyeron.



**Gráfico 28:** Gráfico en formato de barras para la Media de la variable Rendimiento del Proceso de Aislamiento Inmunomagnético de Células CD34+ en Función del Método de Concentración de Células Mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat) y discriminado según la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica (azul) vs Normal (verde)).

**Análisis Comparativo para la Variable Rendimiento del Proceso de Aislamiento Inmunomagnético de Células CD34+**

Grupos de Contraste	Prueba de Contraste	Valor de p
Procedencia de las Muestras de Sangre: Muerte Encefálica vs Normal	Test U de Mann-Whitney	0,734 NS

**Cuadro 13:** Análisis comparativo, en base a los valores de la tabla 29, para la variable Rendimiento del Proceso de Aislamiento Inmunomagnético de Células CD34+ en función de la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal).

En la evaluación de esta variable en función de la procedencia de las muestras de sangre, no se observó diferencia significativa (cuadro 13) entre la sangre de donantes normales (56,04 (DE.: 26,81)) y la sangre de donantes en muerte encefálica (46,36 (DE.: 16,17)). En cuanto al de método de procesamiento se observó que en los tratamientos con Ficoll-Paque los procesamientos con sangre de donantes normales presentan mejor rendimiento en relación a los procesamientos con sangre de donantes en muerte encefálica.

Sin embargo en los tratamientos realizados por el método Buffy Coat se observó un rendimiento sutilmente mejor con sangre de donantes en muerte encefálica en relación a los procesamientos con sangre de donantes normales (tabal y grafico 28).

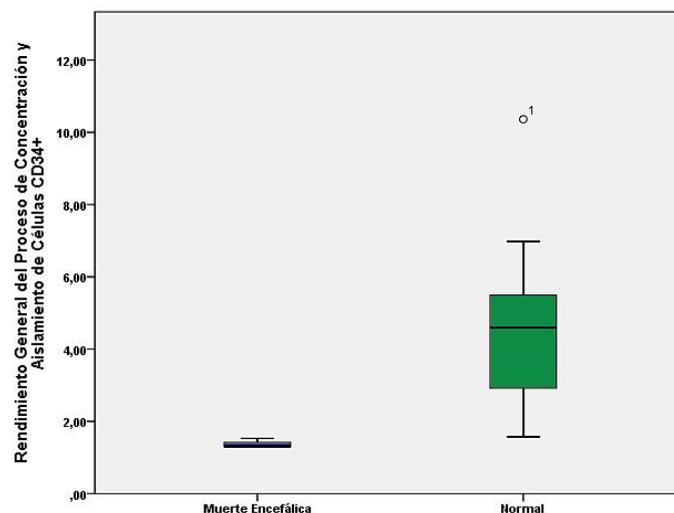
### 3.3.7 Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34+

**Datos Descriptivos**

**Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34+**

Procedencia de la Muestra de Sangre	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Muerte Encefálica	3	1,3800	,07506	,13000	1,3100	,017
Normal	12	4,6183	,70330	2,43632	4,6000	5,936

**Tabla 29:** Datos de tendencia y dispersión para la variables Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34+ en función de la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal). Método de procesamiento de la muestras de sangre según la procedencia: DN (10 Ficoll-Paque y 2 Buffy Coat); DME (2 Ficoll-Paque y 1 Buffy Coat). Una muestra no se pudo leer por que los conductos del citómetro de obstruyeron.



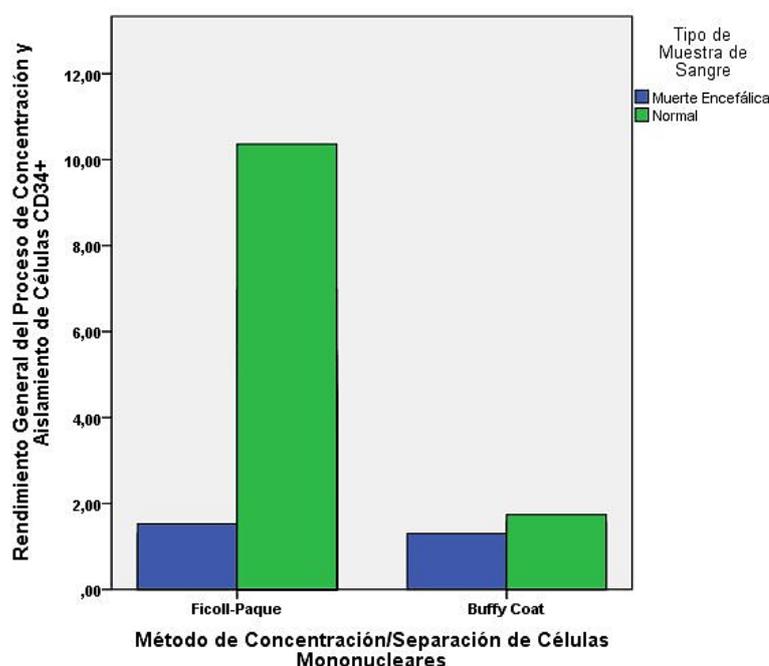
**Gráfico 29:** Diagrama de cajas para la variables Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34+ en función de la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal). El círculo representa un outlier.

Datos Descriptivos

Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34+

Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares	Procedencia de la Muestra de Sangre	N	Media	Error típ. de la media	Desv. típ.	Mediana	Varianza
Ficoll-Paque	Muerte Encefálica	2	1,420	,11000	,15556	1,420	,024
	Normal	10	5,211	,70081	2,2162	4,710	4,911
Buffy Coat	Muerte Encefálica	1	1,300	,00	.	1,300	,00
	Normal	2	1,655	,08500	,12021	1,655	,014

**Tabla 30:** Datos de tendencia y dispersión para la variables Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34+ en función del Método de Concentración de Células Mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat) y discriminado según la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal). Una muestra no se pudo leer por que los conductos del citómetro de obstruyeron.



**Gráfico 30:** Gráfico en formato de barras para la Media de la variables Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34+ en función del Método de Concentración de Células Mononucleares (Ficoll-Paque vs Buffy Coat) y discriminado según la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica (azul) vs Normal (verde)).

### Análisis Comparativo para la Variable Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34+

Grupos de Contraste	Prueba de Contraste	Valor de p
Procedencia de las Muestras de Sangre: Muerte Encefálica vs Normal	Test U de Mann-Whitney	<b>0,004</b>

**Cuadro 13:** Análisis comparativo, en base a los valores de la tabla 31, para la variable Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34+ en función de la procedencia de las muestras de sangre (Muerte Encefálica vs Normal).

En la evaluación de esta variable en función de la procedencia de las muestras de sangre, se observó que las células CD34<sup>+</sup> han sido aisladas con mayor eficiencia en los procesamientos con muestras de sangre de donantes normales 4,61 (DE.: 2,43) en comparación con sangre en condición de muerte encefálica 1,38 (DE.: 0,13) (tabla y gráfico 29). Esta diferencia resulto ser estadísticamente significativa (cuadro 13).

Dentro de cada de método de procesamiento también se observó esta tendencia, con mayor rendimientos en los procesamiento realizados con Ficoll-Paque (tabla y gráfico 30).

## **4 DISCUSION**

En la esfera de la investigación en laboratorio, cada día aumenta la demanda por estudios sobre diferentes aspectos de la biología de las de células tronco hematopoyéticas.

El volumen inicial de sangre y los métodos de concentración/separación de la fracción mononuclear condicionan en parte, la concentración final, el número absoluto, la pureza y la viabilidad de células CD34<sup>+</sup> obtenida en laboratorio. Por tanto la evaluación primaria de la concentración inicial y de la concentración final de las células mononucleares obtenida luego de los diferentes tratamientos de concentración/separación de células mononucleares y según la procedencias de las muestras de sangre, ofrecen una información comparativa de referencia para el establecimiento de protocolos de aislamiento de estas células.

Por tanto la variación entre la concentración y el número absoluto (inicial y final) de células CD34<sup>+</sup> que se obtiene como resultados de los diferentes métodos de procesamientos de la sangre, permite seleccionar el conjunto de técnicas de mayor rendimiento que resultan en la elaboración de un protocolo optimizado de aislamiento y conteo celular.

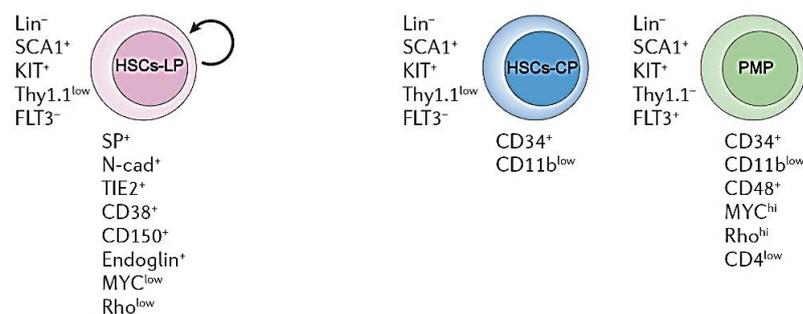
### **4.1 Identificación y Aislamiento de las Células Tronco Hematopoyéticas**

Como se comentó en la sección 1.8.2 de la Introducción, la estandarización de protocolos de aislamiento de células tronco hematopoyéticas está basada en la detección, mediante la utilización de anticuerpos monoclonales, de marcadores que permiten identificar subpoblaciones de células que funcionalmente exhiben características típicas de células tronco. Si bien aún no se ha encontrado un marcador exclusivo de HSCs, el uso del antígeno CD34 y de algunas otras combinaciones particulares de marcadores ha permitido el aislamiento y la cuantificación absoluta de estas células en los diferentes compartimentos y órganos hematopoyéticos. Muchos trabajos han buscado caracterizar las propiedades bioquímicas, genéticas y moleculares de estos marcadores ofreciendo importante información sobre la función/es de cada uno.

Sin embargo, otros estudios realizados con el fin de identificar las propiedades funcionales de las HSCs aisladas, han permitido reconocer que la población de células que es accesible mediante la utilización del antígeno CD34, aún

es muy heterogénea (Morita *et al.*, 2010, y Schroeder, 2010). Esta distinción entre la población de HSCs, células progenitoras y células más maduras, es posible gracias al patrón de expresión de otros marcadores como el antígeno CD38, que se expresa entre niveles intermedio y alto en la mayoría (>90%) de las células CD34<sup>+</sup>. Así, las células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> son más abundantes que las CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>, a pesar de que estas últimas también son capaces de reconstituir y mantener la hematopoyesis en experimentos de trasplantes seriados. Otros antígenos también se expresan en la de las células CD34<sup>+</sup> como es el caso de los antígenos c-Kit<sup>+</sup> (CD117), Sca-1<sup>+</sup>, CD133, CD45<sup>lo</sup>, Thy1.1<sup>lo</sup> y normalmente no expresan marcadores de linaje comprometido (Lin<sup>-</sup>) (Morrison *et al.*, 1995).

A pesar de toda esta colección y combinación de inmonofenotipos para la identificación y aislamiento de posibles candidatos de células tronco hematopoyéticas, aún coexisten importantes discordancias respecto a la identidad única de estas células. Un buen ejemplo de lo anterior es señalado a partir de experimentos que han observado que células CD34<sup>-</sup> del cordón umbilical humano tienen potencial linfopoyético y de fuentes hematopoyéticas adultas de ratones, con capacidad de reconstituir el sistema hematopoyetico multilinjaje, incluyendo células CD34<sup>+</sup> tanto *in vitro* como *in vivo* (Guo *et al.*, 2003). Estas células con fenotipo CD34<sup>-</sup> se caracterizan además por la ausencia de CD38, de marcadores específicos de linaje y de CD133.



**Figura 19: Inmunofenotipo de las Diferentes Subpoblaciones de Células Tronco Hematopoyéticas y Progenitores:** De izquierda a derecha se representan las células tronco hematopoyética a largo (HSCs-LP) y corto plazo (HSCs-CP) y el progenitor multipotencial (MPM) destacando los principales marcadores estandarizados para la identificación y aislamiento. Es importante destacar que las frecuencias de cada categoría en relación a la población en la médula ósea que constituye menos del 1% son: LSKThy1.1low (18%), SP+Rho<sup>low</sup>Lin<sup>-</sup> (40%), LSKCD150+CD48-CD41- (47%), LSKSP+CD34- (35%) y (96%). Modificado de Wilson & Trumpp, 2006.

Por otro lado, estudios de carácter cuantitativo, han evidenciado que la frecuencia de células que expresan el antígeno CD34<sup>+</sup> está entre el 5,37%±4,5 del total de células mononucleares presentes en la médula ósea humana de individuos sanos, y alrededor del 1% en el cordón umbilical (Fritsch *et al.*, 1996). Sin embargo pocos estudios se han cuantificado las células CD34<sup>+</sup> de sangre periférica de individuos normales (sin estimulación medular previa), siendo que la sangre periférica constituye una de las principales fuente de células mononucleares tanto para análisis, así como para tratamiento clínicos de células tronco hematopoyéticas (Watanabe, 1997). En tales estudios previos los valores obteniendo de células CD34<sup>+</sup> en sangre periférica es de 0,18±0,052% en relación a los leucocitos totales (Bender *et al.*, 1991; Kato & Radbruch, 1993).

#### **4.2 Concentración de Células Mononucleares**

A partir de las evaluaciones realizadas en este trabajo, se observó que la concentración de células mononucleares en sangre periféricas sin estimulación de donantes en muerte encefálica no presenta variación significativa en relación a la sangre de donantes normales (cuadro 1). Los valores obtenidos en este trabajo para la concentración de células mononucleares de individuos normales se encuentran dentro de los registros de estudios previos (Kanof *et al.*, 2001).

#### **4.3 Concentración de Células CD34<sup>+</sup> en Sangre**

En lo que respeta a la concentración de células CD34<sup>+</sup> en sangre periférica de donantes normales, los datos obtenidos en este trabajo (tabla2) responden dentro de los valores encontrados en estudios previos (Bender *et al.*, 1991; Kato & Radbruch, 1993).

Por otro lado, la variación en la cuantificación de células CD34<sup>+</sup> en sangre de donantes normales y en condición de muerte encefálica no se encontraron diferencias significativas estadísticamente (cuadro 2), lo que permite asumir que en términos cuantitativos, la concentración de células CD34<sup>+</sup> en sangre sigue la misma distribución.

#### **4. 4 Concentración de Células Mononucleares post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares**

Luego del segundo y último lavado de cada procedimiento de concentración/separación de células mononucleares, estas células (el pellet) son resuspendidas en un volumen determinado (1,2ml en este caso) que determina la concentración final de la suspensión. Esta concentración, responde a su vez a las condiciones recomendadas para con el método de separación inmunomagnético de células CD34<sup>+</sup>.

A partir de las evaluaciones registradas en este trabajo, se visualiza que las concentraciones resultantes de células mononucleares son significativamente mayores en los procesamientos con Ficoll-Paque en comparación a las concentraciones resultantes en los procesamientos por el método Buffy Coat (cuadro 3).

En lo que se refiere a los resultados en función de la procedencia de las muestras de sangre, no se registraron diferencias (cuadro 10).

Esto permite visualizar que el método Ficoll-Paque presenta mayor eficiencia de concentración de células mononucleares respecto al método Buffy Coat, independientemente de la procedencia de las muestras de sangre.

#### **4. 5 Factor de Concentración de Células Mononucleares post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares**

A raíz de las evaluaciones realizadas en este trabajo sobre esta variable, se constató que el método Ficoll-Paque, responde con mejores rendimientos sobre el aumento relativo de la concentración de células mononucleares, en comparación al método Buffy Coat (tabla 5 y cuadro 4) .

Por otro lado, la procedencia de las muestras de sangre no constituye un factor de variación significativa entre las técnicas, a pesar que los procesamientos con muestras de donantes normales superaron en promedio a los procesamientos con sangre de donantes en muerte encefálica (cuadro 11).

#### **4. 6 Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares**

A partir de los análisis de las evaluaciones de esta variable realizadas en este trabajo, se visualiza que el método de concentración/separación de células mononucleares no causa variaciones significativas en la concentración de células CD34<sup>+</sup> (cuadro 5).

Sin embargo, la procedencia de las muestras de sangre representó el factor de variación, donde los procesamientos con las muestras de donantes normales rindieron mayores concentraciones en comparación con los procesamientos con sangre de donantes en muerte encefálica (cuadro 12).

#### **4. 7 Factor de Concentración de Células CD34+ post-Método de Concentración/Separación de Células Mononucleares**

En las evaluaciones de esta variable se verificó que, tanto el método de concentración/separación de células mononucleares cuanto la procedencia de las muestras de sangre constituyen son factores que influyen significativamente en los experimentos de concentración de células CD34<sup>+</sup> (cuadros 6 y 13 respectivamente), donde los procesamientos con Ficoll-Paque y con muestras de sangre de donantes normales concentraron más eficiente me las células CD34<sup>+</sup> en comparación a los procesamientos por el método Buffy Coat y que con muestras de donantes en muerte encefálica (tablas 9 y 23respectivamente).

#### **4. 8 Concentración de Células CD34+ post-Método de Aislamiento Inmunomagnético**

Una vez que cada suspensión de células mononucleares es procesada con la metodología de aislamiento con perlas inmunomagnéticas, se obtiene como producto una suspensión de 250µl (según el protocolo elaborado en este trabajo) de células CD34<sup>+</sup> purificadas. Tal suspensión representa el producto último de todo el conjunto de procesamientos, por tanto la concentración final resultante de estas células, determina el número absoluto de células CD34<sup>+</sup> obtenidas.

A partir de los registros obtenidos en este trabajo se puede identificar que el método de concentración/separación de células mononucleares no constituye un factor de variación significativa en los resultados de los experimentos de separación inmonomagnética (cuadro 7).

Por otro lado la procedencia de las muestras de sangre sí influyó significativamente en las concentraciones finales (cuadro 12), donde los resultados fueron de mayor eficiencia en los procesamientos con sangre de donantes normales en relación a los procesamientos con sangre de donantes en muerte encefálica (tabla 25).

#### **4. 9 Rendimiento del Proceso de Aislamiento Inmunomagnético de Células CD34<sup>+</sup>**

A partir de los resultados evaluados en este trabajo se visualiza que el método particular de concentración/separación de células mononucleares no constituye un factor que influye en los rendimientos del valor absoluto de células CD34<sup>+</sup> en el proceso de aislamiento con las perlas Dynal.

Esto permite reconocer por tanto que con el sistema de aislamiento inmunomagnético de células CD34<sup>+</sup> con perlas Dynal se obtiene rendimientos similares independientemente del método de concentración/separación de células mononucleares (cuadro 8).

Lo mismo se puede decir a partir del análisis de esta variable según de la procedencia de las muestras de sangre cuadro utilizados en este trabajo (cuadro 13).

#### **4. 10 Rendimiento General del Proceso de Concentración y Aislamiento de Células CD34<sup>+</sup>**

La variable aquí analizada engloba la evaluación de la secuencia completa de los proceso de concentración/separación de células mononucleares y de aislamiento inmunomagnético, lo que constituyen el factor de mayor importancia comparativa entre los métodos empleados en función de optimizar de un protocolo de aislamiento y conteo de células CD34<sup>+</sup> de sangre periférica.

A partir de los análisis de las evaluaciones registradas en este trabajo se puede constatar que mediante el procesamiento por el método con Ficoll-Paque los

rendimientos generales son significativamente mayores en comparación con los del método Buffy Coat (tabla 15 y cuadro 9), y por otro lado que con la sangre de donantes normales se obtiene mayor número absoluto y concentración final de células CD 34<sup>+</sup> (cuadro 13).

#### **4. 11 Sangre de Cordón Umbilical y Usos Clínicos de las HSCs**

La sangre de cordón umbilical ha significado desde hace algunos años una fuente privilegiada en términos de capacidad regenerativa y fuente de HSCs, si bien las primeras evidencias sobre la existencia de células hematopoyéticas primitivas en este nicho anatómico datan de comienzo de la década del 80. A partir del primer ejercicio de trasplante con células provenientes de esta fuente en 1988, que resultó con éxito en la cura de un paciente con anemia de Fanconi (Gluckman *et al.*, 1989), su uso terapéutico ha venido consolidándose.

Los primeros estudios de laboratorio sugirieron que la frecuencia y la capacidad proliferativa de la población de células tronco/progenitoras del cordón umbilical eran mayores al de las células de la médula ósea. Sin embargo otros estudios han contrariado estas afirmaciones. Varios parámetros, incluyendo el conteo de células progenitoras hematopoyéticas a partir de las colectas de sangre de cordón, han sido usados para predecir la capacidad de trasplante de tales células. Este conjunto de resultados sugiere al menos que la incidencia de células tronco hematopoyéticas en el cordón umbilical es comparables al de la médula ósea, con valores en torno al 1% del total de las células nucleadas (Mayani & Lansdorp, 1998). Más allá de la esfera cuantitativa, varias otras diferencias funcionales han sido observadas entre las células de cordón y de la médula ósea, donde particularmente se resalta el menor riesgo para el desarrollo de la enfermedad del injerto-vs-huésped luego en los trasplantes con células de cordón (Rocha *et al.* 2004). Algunos autores han atribuido que esta particularidad podría deberse al grado de maduración inmunológica de las células de cordón (Cohen & Madrigal, 1998).

Si bien los primeros trasplantes fueron realizados con células provenientes del cordón de un hermano como donantes, los mayores avances que han tenido lugar en el uso clínico de estas células ha sido el acceso a la preservación con métodos de congelamiento y el establecimiento de bancos públicos. Por tanto el éxito en los trasplantes de sangre de cordón umbilical ha sido sustentado y posiblemente lo

seguirá siendo, sobre la certificación de que las células tronco/progenitoras hematopoyéticas contenidas en esta fuente pueden ser eficientemente criopreservadas y fácilmente accesibles en términos de cantidad y calidad.

Por otro lado, las capacidades funcionales de estas células han sido constatadas por la sobrevivencia de los pacientes tratados desde hace más de 20 años, y la preservación de tales capacidades luego de grandes períodos de criopreservación (mayor a 15 años) ha sido testada en varios estudios que acceden al potencial proliferativo de estas células.

Es importante resaltar que, así como las poblaciones accesibles de células tronco de la médula ósea son heterogéneas, la sangre de cordón también está constituida por una mezcla de células tronco/progenitoras en diferentes estadios de compromiso de linaje. Se ha observado que el potencial de estas células disminuye en la medida en que aumenta el tiempo de gestación.

Como gran mérito adicional atribuible a las células de cordón, está su habilidad para ser reprogramadas en células iPS. En el año 2010 Takenaka y colaboradores lograron reprogramar células CD34<sup>+</sup> vía transferencia viral.

Mencionaremos las principales aplicaciones clínicas que históricamente se han llevado a cabo con células tronco hematopoyéticas de diversas fuentes, y comentaremos algunas perspectivas en torno a su investigación y aplicaciones clínicas.

La sangre de la médula ósea, que como se sabe contiene células tronco hematopoyéticas, ha sido usada en tratamientos de trasplantes desde hace bastante tiempo. Las bases teóricas que precedieron a las terapias de trasplantes de médula vinieron de los estudios de dos investigadores Nowell y Ford, quienes demostraron que la infusión de sangre de la médula ósea de un ratón normal hacía un ratón irradiado letalmente, recupera su condición. Luego en 1957 Sir Donnal E. Thomas llevó a cabo el primer trasplante alogénico con resultado desfavorable, pero en 1959 realizó otro experimento de trasplante con médula de gemelos idénticos para un paciente con leucemia, obteniendo un resultado favorable. Sus estudios posteriores sobre trasplantes autólogos en modelo canino, técnicas de criopreservación y de sangre periférica como sustituto de médula ósea condujeron al desarrollo de los métodos actualmente usados.

Esta tecnología, en un sentido amplio, representa uno de los métodos más efectivos frente al tratamiento de las principales enfermedades de la sangre (Lad *et*

al., 2012). No obstante otras patologías también han sido exitosamente tratadas mediante el trasplante de progenitores hematopoyéticos incluyendo algunos carcinomas y sarcomas, lo que refuerza las perspectivas de aplicación.

La utilización cada vez más frecuente de sangre de cordón, en conjunto con el establecimiento de bancos, principalmente de origen público, tanto para médula como para cordón, en paralelo con eficientes programas de screening poblacionales, consolidan el acceso a tratamientos de alta calidad. Más adelante se discuten las implicancias éticas y sociales que acarrea el uso de las diferentes fuentes de células tronco.

#### **4.12 Células Tronco: Un Debate Científico en su Contexto Ético y Social**

Existen diversas implicancias de carácter ético, moral y social que acarrea la investigación y el uso o las potenciales aplicaciones de las células tronco.

Robert Merton dice *“Las normas de la ciencia poseen una justificación metodológica, pero son obligatorias, no sólo por su eficiencia en los procedimientos, sino también porque se cree que son correctas y buenas. Son tanto prescripciones morales como técnicas.”*

El establecimiento de la bioética como una semántica social relevante en los últimos años se ha producido principalmente como resultado del entusiasmo y de la preocupación suscitada por los rápidos avances de la biotecnología y de las ciencias de la vida, donde se dan las posibilidades técnicas de actuar sobre los organismos. La proyección de estos nuevos saberes y tecnologías no sólo abarca el campo de la medicina, sino también el ámbito de la seguridad, del derecho, de los modelos de desarrollo socioeconómicos y de los equilibrios medioambientales. (Beauchamp & Childress, 1999).

En el área de la investigación biomédica, y particularmente las circunstancias que rodean a la investigación sobre células tronco se concentran una importante porción de los aspectos que definen el impacto social de la ciencia. Por tanto la necesidad de promover una comunión en base a un debate sereno y con decisiones meditadas se hace obligatorio.

En relación particular a las investigaciones y aplicaciones con células tronco, actualmente varias cosas están claras. En primer lugar, el conocimiento de que el organismo adulto contiene compartimentos de células tronco, que difieren según la

naturaleza y el tejido de origen al que deben, de forma natural, sustituir y mantener. Por ello para plantear racionalmente una terapia regenerativa es necesario conocer la función propia de los diferentes tipos de células tronco adultas, y los factores que inducen su multiplicación y maduración a células especializadas en el organismo *in vivo*. En segundo lugar, que las células tronco embrionarias, como se cultivan y mantienen en el laboratorio, han sido relegadas y tienen menos posibilidades de llegar a la clínica, debido a la superación técnica para reprogramar células, como lo demuestra la disminución relativa de ensayos clínicos en marcha. El debate, con frecuencia cargado de acritud, acerca del sentido biológico de las etapas del embrión humano, y con ello de la naturaleza de la vida incipiente, su dignidad y la exigencia de su respeto, parece superado por el desarrollo y la innovación tecnocientífica. Hoy el empleo de células derivadas de embriones para terapias celulares no representa un atractivo indispensable. El avance logrado por Yamanaka y colaboradores, por el desarrollo de las células iPS, abre notables expectativas en principio para la investigación básica, pero también para su posible uso clínico. El establecimiento de bancos públicos de células de cordón umbilical constituye una importantísima inversión que los Estados deberían considerar, como medio para el acceso eficiente a los tratamientos, en principio de las malignidades de la sangre.

Sin embargo, debemos claramente resaltar que el comportamiento biológico y la función natural de las células troncales adultas y de las células iPSs son bien diferentes. El éxito último pretendido con las células tronco en terapia regenerativa radicará en que más allá de la manipulación para el acceso a las células, estas no pierdan el control de los procesos de proliferación y diferenciación una vez trasplantadas en los pacientes. Las terapias que puedan derivarse del uso de unas u otras no son solamente opcionales desde el punto de vista técnico. En el caso de las células tronco adultas se trata, de inducir y potenciar *in vivo* la función que ya naturalmente poseen. Mucho se está trabajando en la expansión *in vitro*, pero aún no se dispone de un método eficiente. Un aspecto importante a tener siempre en cuenta para la eficacia de los usos de células tronco adultas en terapias regenerativas consiste en conocer y controlar la complejidad del comportamiento y envejecimiento.

Por otro lado, el posible uso terapéutico de las células iPS supondrá siempre una intervención artificial que reconfigura su identidad natural, las expande, madura y transfiere al paciente, teniendo en cuenta que estas células al igual que las células tronco embrionarias son capaces en ciertas condiciones de desarrollar

teratocarcinomas. Esto representa siempre un motivo de preocupación, con posibilidades de ser un método insolvente por desproporción de los riesgos. Hay que continuar investigando a fondo tanto las células tronco adultas, como las iPS para conocer su biología en todos los contextos y transferir de manera progresiva esos conocimientos en su uso terapéutico.

Además del debate ético que trata de las preocupaciones sobre posibles aplicaciones clínicas, existen otros aspectos sociales y políticos que hacen que la “cuestión” de las células tronco tome una especial relevancia.

El aporte social que pueda hacer la bioética parece ser el de reconstruir reflexivamente y en forma constante la unidad de la diferencia que impone la sociedad a la vida humana para organizar sus operaciones. En esta perspectiva, la constitución interdisciplinaria de la bioética resulta esencial.

## **5 CONCLUSIONES**

En vista a establecer un protocolo eficiente, rápido y fácilmente accesible, dentro de los recursos disponibles en el laboratorio de Inmunogenética e Histocompatibilidad del Instituto Nacional de Donación y Trasplantes de Células Tejidos y Órganos (INDT), para el aislamiento y conteo de células CD34<sup>+</sup> de sangre periférica sin estimulación medular, han sido evaluados y comparados algunos experimentos mediante metodologías alternativas de concentración/separación de células mononucleares en busca de garantizar la opción que ofrezca los mejores rendimientos cuali y cuantitativos.

A partir del análisis de los resultados obtenidos en este trabajo, es posible concluir que partiendo de una cantidad mínima de 40ml de sangre periférica no estimulada, de donantes normales, en la primera etapa de concentración/separación de células mononucleares, el procesamiento por el método Ficoll-Paque resultó ser más eficiente comparado al método de Buffy Coat, en relación a la concentración de células mononucleares.

El aislamiento inmunomagnético no resultó influido de manera significativa por el método de concentración/separación de células mononucleares para ambas procedencia de las muestras de sangre.

Como conclusión se selecciona el método de Ficoll-Paque de acuerdo al protocolo establecido en este trabajo, como método de concentración/separación de células mononucleares dado que a partir del mismo se logra una mejor recuperación de células CD34<sup>+</sup> tras el aislamiento inmunomagnéticas con perlas Dynal.

También, se constata que el método ISHAGE estandarizado por Sutherland *et al.*, 1996, con el kit de tinción citométrica *Dako CD34Count Kit*, permite la cuantificación, dentro de los valores previamente constatados (Bender *et al.*, 1991; Kato & Radbruch, 1993), de células CD34<sup>+</sup> en sangre periférica sin estimular.

Es importante resaltar también que el estudio realizado en esta ocasión presenta varias limitaciones, principalmente referidas al bajo número de evaluaciones efectuadas, lo que obliga a utilizar formulas estadísticas de comparación que ofrecen poca potencia estadística y otras referidas al tipo, cantidad y horas de extracción de la muestra o a los equipamientos disponibles.

## **6 BIBLIOGRAFIA**

Andersson E. R. & Lendahl U. 2009. Regenerative medicine: a 2009 overview. *J Intern Med.* 266(4):303-10

[Bach SP, Renehan AG, Potten CS.2000. Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. \*Carcinogenesis\* 21\(3\):469-76.](#)

Beauchamp T. & Childress J.F. 1999. Principios de ética biomédica. Masson, S.A. Barcelona.

[Bender JG, Unverzagt KL, Walker DE, Lee W, Van Epps DE, Smith DH, Stewart CC, To LB. 1991. Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. \*Blood.\* 15;77\(12\):2591-6.](#)

Bernal JD. 1967. Historia de la Ciencia. Ed Peninsula, Barcelona.

[Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E. 2004. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. \*Cell\* 118:635-48.](#)

Blasco MA. 2007. Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol.* 3(10):640-9.

Bongso A & Lee E.H.. 2010. Stem Cells From Bench to Bedside 2 edition. Cap1 Ed. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. London

[Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. \*Cell\* 122:947-956.](#)

[Böyum A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. \*Tissue Antigen\* 4:269-74.](#)

[Brooimans RA, Kraan J, van Putten W, Cornelissen JJ, Loewenberg B, Gratama JW.2009. Flow cytometric differential of leukocyte populations in normal bone marrow: Influence of peripheral blood contamination. \*Cytometry Part B\* 76B: 18-26.](#)

[Burdon T, Smith A, Savatier P. 2002. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. Trends Cell Biol. 12:432–38.](#)

[Cabarcas SM, Mathews LA, Farrar WL. 2011. The cancer stem cell niche—there goes the neighborhood? Int. J. Cancer: 129, 2315–2327.](#)

[Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature 425:841–846.](#)

Cantone I, Fisher AG. 2013. Epigenetic programming and reprogramming during development. Nat Struct Mol Biol. 20(3):282-9.

Cohen SB, Madrigal JA. 1998. Immunological and functional differences between cord and peripheral blood. Bone Marrow Transplant 2(Suppl. 3):S9–S12.

[Court PM. 2002. Bioética y Organización Funcional de la Sociedad. Acta bioética 8:1.](#)

[Cumano A, Godin I. 2007. Ontogeny of the Hematopoietic System. Annu. Rev. Immunol. 25:745.](#)

Damjanov I. 1990. Teratocarcinoma stem cells. Cancer Surv. 9:303-319.

De Boer J., Van Blitterswijk C., Thomsen P., Hubbell J, Cancedda R, de Bruijn J.D. , Lindahl A., Sohier J., Williams D.F. 2008. Tissue Engineering. Academic Press series in biomedical engineering. San Diego, USA

[DeCoppi P., Bartsh G. Jr., Siddiqui M.M. 2007. Isolation of amniotic stem cells with potential for therapy. Nat Biotech 25:100-106.](#)

Dejosez, M., Krumenacker, J.S., Zitur, L.J., Passeri, M., Chu, L.F., Songyang, Z., Thomson, J.A. y T.P. Zwaka. 2008. Ronin is essential for embryogenesis and the pluripotency of mouse embryonic stem cells. Cell 133(7):1162-1174.

[Díaz-Flores L Jr, Madrid JF, Gutiérrez R, Varela H, Valladares F, Alvarez-Argüelles H, Díaz-Flores L. 2006. Adult stem and transit-amplifying cell location. Histol Histopathol 21: 995-1027.](#)

[Doetsch F., Verdugo J.M., Caille I., Alvarez-Buylla A., Chao MV y Casaccia-Bonofil P. 2002. Lack of the cell cycle inhibitor p27Kip1 results in selective increase of transit-amplifying cells for adult neurogenesis. J. Neurosci. 22:2255–64.](#)

[Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. 1985. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J Embryol Exp Morphol. 87:27–45.](#)

[Drummond-Barbosa D. 2008. Stem cells, their niches and the systemic environment: an aging network. Genetics 180\(4\): 1787-1797.](#)

Duan X, Kang E, Liu CY, Ming GL, Song H. 2008. Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol* 18:108-115.

Durcova-Hills G., Ainscough J. & McLaren, A. 2001. Pluripotential stem cells derived from migrating primordial germ cells. *Differentiation* 68(4-5): 220-6.

Evans, M. J. & Kaufman, M. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156.

Flake AW. 2004. The conceptual application of systems theory to stem cell biology: a matter of context. *Blood Cells Mol Dis.* 32(1):58-64.

[Frisén J. 2002. Stem cell plasticity? Neuron. 1;35\(3\):415-8.](#)

Fritsch G, Stimpfl M, Kurz M, Printz D, Buchinger P, Fischmeister G, Hoecker P, Gardner H. 1996. The composition of CD34 subpopulations differs between bone marrow, blood and cord blood. *Bone Marrow Transplant.* 17(2):169-78.

Fuchs E, Tumber T, Guasch G. 2004. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116:769-778.

[Fuchs E. 2008. Skin stem cells: rising to the surface. The Journal of Cell Biology 180\(2\):273–284.](#)

[Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. Stem Cells 22:649–58.](#)

Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD. 1989. Hematopoietic reconstitution of a patient with Fanconi anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 321:1174-1178.

Gönczy P. 2008. Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(5):355-366.

[Goodman JW, Hodgson F. 1962. Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. \*Blood\* 19:702-715.](#)

Graf T, Enver T. 2009. Forcing cells to change lineages. *Nature*. 3;462:587-94.

[Guo Y, Lübbert M, Engelhardt M. 2003. CD34- hematopoietic stem cells: current concepts and controversies. \*Stem Cells\*. 21\(1\):15-20.](#)

[Gurdon JB. 2006. From Nuclear Transfer to Nuclear Reprogramming: The Reversal of Cell Differentiation. \*Annu. Rev. Cell Dev. Biol.\* 22:1–22.](#)

Hackney J.A. & Moore K.A. 2005. A functional genomics approach to hematopoietic stem cell regulation. *Methods Mol Med*. 105:439-52.

He S, Nakada D, Morrison SJ. 2009. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 25:377-406.

Hodgkinson T, Yuan XF, Bayat A. 2009. Adult stem cells in tissue engineering. *Expert Rev Med Devices*. 6(6):621-40.

Horvitz, HR, & Herskowitz I. 1992. Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs that is the question. *Cell* 68, 237–255.

[In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R. 2003. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. \*Blood\* 102:1548–9.](#)

[Kanof ME, Smith PD, Zola H. 2001. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. \*Curr Protoc Immunol. Cap 7: Uni7.1.\*](#)

[Kato K, Radbruch A. 1993. Isolation and characterization of CD34+ hematopoietic stem cells from human peripheral blood by high-gradient magnetic cell sorting. Cytometry. 14\(4\):384-92.](#)

[Kaufman DS, Thomson JA. 2002. Human ES cells: haematopoiesis and transplantation strategies. J Anat. 200:243-2.](#)

[Kay LA, Locke DE. 1985. Separation of lymphocytes from peripheral blood: improvement of yields using buffy coat preparations. J Clin Pathol. 38\(12\): 1405-1408.](#)

[Kitano H. 2007. Towards a theory of biological robustness. Mol Syst Biol. 3:137.](#)

[Knoblich JA. 2008. Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division. Cell 132, 583-597.](#)

Kolios G. & Moodley Y. 2013. Introduction to stem cells and regenerative medicine. Respiration. 85(1):3-10.

Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL. 2003. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. Annual Review of Immunology 21:759-806

Kondo M. 2009. Hematopoietic Stem Cell Biology. Ed Humana Press. Springer Science & Business Media. New York.

Kumar A, Mattiasson B, Galaev IY. 2011. Cell Separation: Fundamentals, Analytical and Preparative Methods (Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology. Springer, Inc. 203p

[Lad DP, Malhotra P., Varma S. 2012. Hematopoietic Stem Cells Applications: Past, Present and Future. J Postgrad Med Edu Res. 46\(2\):69-74.](#)

Lajtha LG. 1979. Stem cell concepts. Nouv Rev. Fr. Hematol 21: 59-65.

Lajtha LG. 1967. Stem cells and their properties. In Canadian Cancer Conference pp 31-39. Toronto: Pergamon Press.

[Lander AD, Gokoffski KK, et al. 2009. Cell lineages and the logic of proliferative control. PLoS Biol. 7 \(1\): e15.](#)

[Lanza F, Healy L, Sutherland DR. 2001. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. J Biol Regul Homeost Agents. 15\(1\):1-13.](#)

Lanza R , Gearhart J, Hogan, Melton D, Pederson R, Thomas ED, Thomson J, Sir Wilmut I. 2009. Essentials of Stem Cell Biology Second Edition. Elsevier.13-19.

[Laszlo A, Krippner S. 1998. Systems Theories: Their Origins, Foundations, and Development. J.S. Jordan \(Ed.\), Systems Theories and A Priori Aspects of Perception. Amsterdam: Elsevier Science 3:47-74.](#)

Lengner CJ. 2010. iPS cell technology in regenerative medicine. Ann N Y Acad Sci. 1192:38-44.

Li l. & Xie, T. 2005. Stem cell niche: structure and function. Annual Review of Cell and Developmental Biology 21:605-31.

[Liu N, Lu M, Tian X, Han Z. 2007. Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. J Cell Physiol 211\(2\):279-286.](#)

[Lo Celso C, Scadden DT. 2011. The haematopoietic stem cell niche at a glance. J Cell Sci. 124\(Pt 21\):3529-35.](#)

Loeffler M & Roede I. 2002. Tissue Stem Cells: Definition, Plasticity, Heterogeneity, Self-Organization and Models – A Conceptual Approach. Cells Tissues Organs 171:8–26

Loh, Y.H., Wu, Q., Chew, J.L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B. y Liu, J. 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. Nat. Genet.38: 431–440.

Magnon C, Frenette PS. 2008 .Hematopoietic stem cell trafficking. StemBook, Ed. The Stem Cell Research Community, StemBook.

[Marikawa Y, Alarcón VB.2009 Establishment of trophectoderm and inner cell mass lineages in the mouse embryo. Mol Reprod Dev. 76\(11\):1019-32.](#)

[Martin, G. R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7634-7638](#)

Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, Ko MS, Niwa H. 2007. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. Nat Cell Biol. 9(6):625-35.

[Mayani H, Lansdorp PM. 1998. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. Stem Cells. 16\(3\):153-65.](#)

[Mazo IB, Massberg S, von Andrian UH. 2011. Hematopoietic stem and progenitor cell trafficking. Trends Immunol. 32\(10\):493-503.](#)

Mazzarello P. 1999. A unifying concept: the history of cell theory. Nature Cell Biology. 1, E13–E15.

[Molineux G, Pojda Z, Hampson IN, Lord BI, Dexter TM. 1990. Transplantation potential of peripheral blood stem cells induced by granulocyte colony-stimulating factor. Blood 76: 2153–2158.](#)

Morgan D. 2007. The Cell Cycle: Principle of Control. Primers in Biology. New Science Press: London. 297p.

[Morita Y, Ema H, Nakauchi H. 2010. Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. J Exp Med. 207\(6\):1173-82.](#)

Morrison SJ, Kimble J. 2006. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. Nature 441: 1068–1074.

Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. 1995. The biology of hematopoietic stem cells. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 11:35–71.

[Nichols J & Smith AG. 2010. The origin and identity of embryonic stem cells. Development 138: 3–8.](#)

[Obokata H, Sasai Y, Niwa H, Kadota M, Andrabi M, Takata N, Tokoro M, Terashita Y, Yonemura S, Vacanti CA, Wakayama T. 2014. Bidirectional developmental](#)

[potential in reprogrammed cells with acquired pluripotency. Nature. 505\(7485\):676-80.](#)

[Obokata H, Wakayama T, Sasai Y, Kojima K, Vacanti MP, Niwa H, Yamato M, Vacanti CA. Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency. 2014. Nature. 505\(7485\):641-7.](#)

[Pepper JW, Sprouffske K, Maley CC. 2007. Animal cell differentiation patterns suppress somatic evolution. PLoS Comput Biol 3:12:e250.](#)

Potten, CS & Loeffler M. 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110: 1001–1020.

Raff M. 2003. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol.* 19:1-22.

Ranalli P. 1999. Media Sugarcoats Fetal Tissue Transplant Failure. *National Right to Life News.*

[Rocha V, Labopin M, Sanz G, Arcese W, Schwerdtfeger R, Bosi A, Jacobsen N, Ruutu T, De Lima M, Finke J, Frassoni F, Gluckman E. 2004. Transplants of umbilicalcord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. N Engl J Med 351: 2276–2285.](#)

Ross MM, Pawlina W. 2010. *Histology: A Text and Atlas En: Lippincott Williams & Wilkins; Sixth, North American Edition, With Correlated Cell and Molecular Biology edition. Cap 10, p: 268- 308.*

[Sahin AO, Buitenhuis M. 2012. Molecular Mechanisms Underlying Bone Marrow Homing of Hematopoietic Stem Cells. Cell Adh Migr. 6\(1\):39-48.](#)

Schofield R. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.* 4(1-2):7-25.

[Schroeder T. 2010. Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity: Subtypes, Not Unpredictable Behavior. Cell Stem Cell 6\(3\): 203-207.](#)

[Seita J & Weissman IL. 2010. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2\(6\):640-53.](#)

Semb H. 2005. Human embryonic stem cells: origin, properties and applications. *Apmis* 113:743–750.

[Sengar DP, Jerome FN, Douglas RJ.1968. A simple method for separation of buffy coat from peripheral blood of chickens. \*Can J Comp Med.\* 32\(4\):593-7.](#)

Smith AG. 2001. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 435–462.

[Song X, Xie TD. 2002. E-cadherin-mediated cell adhesion in the \*Drosophila\* ovary. \*Proc Natl Acad Sci USA\* 99:14813-14018.](#)

Spivakov M, Fisher AG. 2007. Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nat Rev Genet.* 8(4):263-71.

Sprandling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. 2001. Stem cells find their niche. *Nature* 414: 98-104.

Suárez-Álvarez B, López-Vázquez A, López-Larrea C. 2012. Mobilization and homing of hematopoietic stem cells. *Adv Exp Med Biol.* 741:152-70.

Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. 1996. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother.* 5(3):213-26.

[Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. \*Cell\* 126\(4\):663-76.](#)

Temple S. 2001. Stem cell plasticity — building the brain of our dreams. *Nature Reviews-Neuroscience* 2: 513-520.

[Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS and Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. \*Science\* 282:1145–1147.](#)

[Till JE, McCulloch EA. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. \*Radiat Res.\* 14:213-22.](#)

[Travalos GS. 2006. Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow. Toxicologic Pathology. 34:548–565.](#)

[Wang HS, Hung SC, Peng ST. 2004. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cells 22:1330-1337.](#)

Washington R. 1997. Fetal Tissue Transplant Debated. The Gainesville Sun.

Watson AJ. 1992. The cell biology of blastocyst development. Mol Reprod Dev. 33(4):492-504.

Wenyan L, Dong-An W. 2012. Role of Induced Pluripotent Stem Cells in Regenerative Medicine. Stem Cells and Cancer Stem Cells. M.A. Hayat. 7:13-26.

Wilson A, Trumpp A. 2006. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. Nat Rev Immunol. 6(2):93-106.

Xie T, Spradling A. 2001. The Drosophila ovary: an in vivo stem cell system. In Stem Cell Biology, ed. DR Marshak, RL Gardner, D Gottlieb, pp. 129–48. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press.

Ying Q-L, Wray J, Nichols J, Battle-Morera L, Doble B, et al. 2008. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. Nature 453:519–23

[Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature 425: 836–841.](#)

Zhu J, Emerson, SG. 2004. A new bone to pick: osteoblasts and the haematopoietic stem-cell niche. Bioessays 26:595-9.

## **7 APENDICE**

### **7.1 Consentimiento Informado**

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA  
EXTRACCION DE UNA MUESTRA SANGRE PERIFERICA  
INDT – Laboratorio de Inmunogenética e Histocompatibilidad

Hoy en dd/mm/aa, en la sede del Laboratorio de Inmunogenética e Histocompatibilidad del INDT, yo Sr./Sra. ...., de .... años de edad, con C.I. n° ....., manifiesto que he sido informado/a sobre las finalidades de la utilización que supone la extracción de un volumen de aproximadamente 40 ml de sangre para cubrir los objetivos del Proyecto de Pasantía titulado: “Optimización de un sistema de aislamiento de células tronco a partir de sangre periférica sin estimulación previa”

Esta muestra no dará origen a ningún resultado que pudiera incidir en mi atención médica.

Únicamente será utilizado para poner a punto un método de laboratorio.

También he sido informado/a de que no son utilizados datos personales, solo será procesada una muestra sanguínea sin dato alguno adjunto

Tomando ello en consideración, OTORGO mi CONSENTIMIENTO a que esta extracción tenga lugar y sea utilizada para cubrir los objetivos especificados en el proyecto antes mencionado.

Firma del Donante de Sangre

Firma

Firma

Nombre Investigador

Responsable Institucional

## 7.2 Soluciones Buffer

### Buffer Veronal 5X

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 185 mg/L

MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 840 mg/L

NaCl 42,500 mg/L

Sodium Barbital 1,870 mg/L

Barbital 2,870 mg/L

### Buffer de Aislamiento

PBS al 1X: 8 g NaCl

0.2 g KCl

1.44 g Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>

0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

} en 800ml de aguas destilada

Citrato al 0,6%

Suero Fetal al 1%

### Buffer de Lisis 10X a base de Cloruro de Amonio

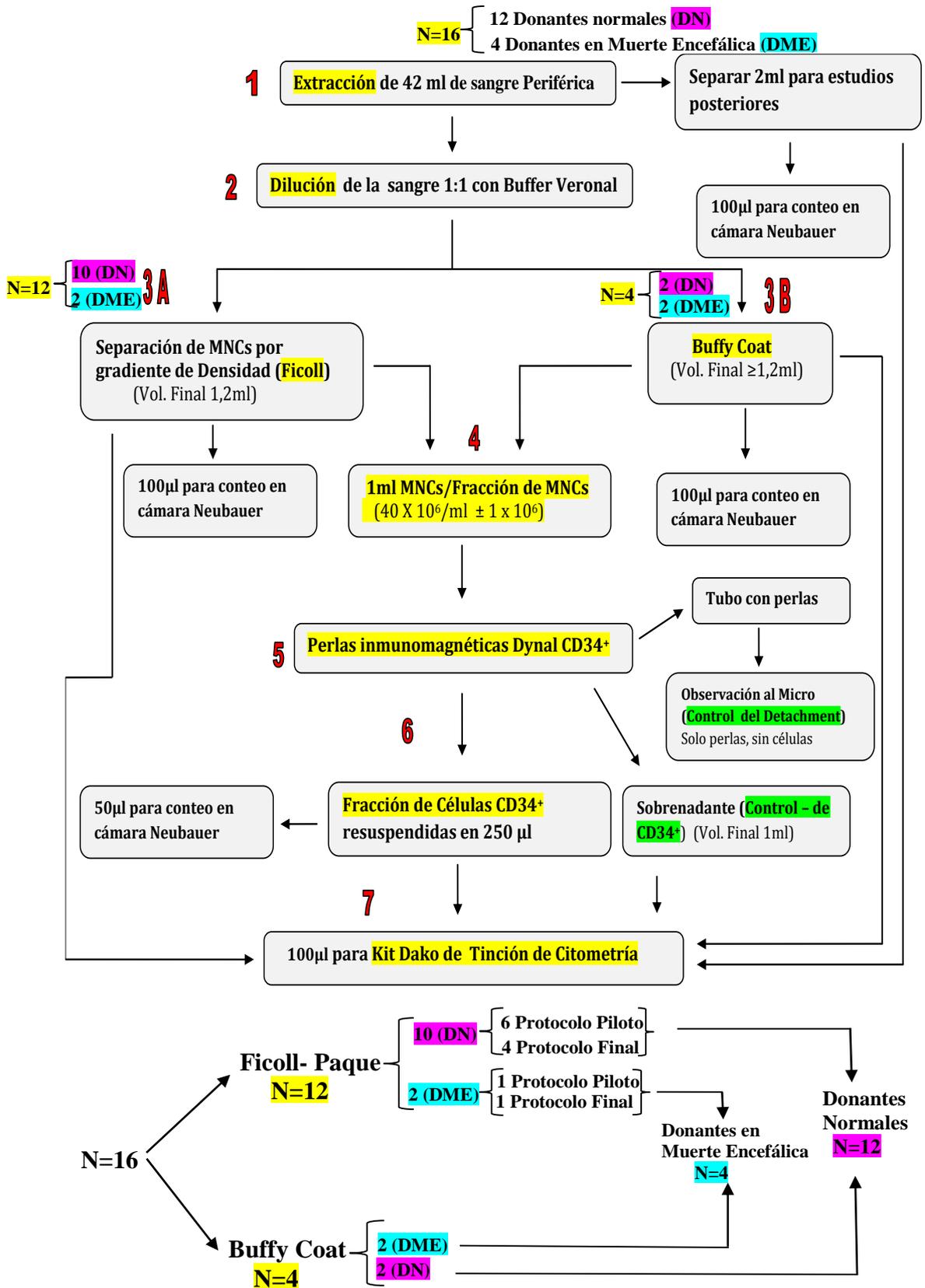
NH<sub>4</sub>Cl 8g (1,5M)

KHCO<sup>3</sup> 1g (100nM)

Na<sub>2</sub>EDTA 0,37g (10nm)

Agua destilada 100ml

### 7.3 Diagrama de los Procedimientos Técnicos



## **7.4 Protocolos Técnicos**

### **7.4.1 Extracción de la Muestra de Sangre de Donantes\* Normales**

Extraer 42 ml de sangre por punción venosa en un tubo Falcon de 50ml, con 5 gotas de anticoagulante heparina

\* Las muestras de sangre de donantes en muerte encefálica fueron obtenidas a partir del volumen remanente de los operativos de asignación bajo el conocimiento de los directores y responsables del INDT. Las muestras (anonimizadas) estaban almacenadas en un tubo Falcon de 50ml ya con anticoagulante heparina.

### **7.4.2 Técnica de Separación/Concentración de Células mononucleares con Ficoll-Paque**

- 1 - Separar 2 ml en un tubo para usos posteriores
- 2 - Diluir la sangre 1:1 en buffer Veronal (40 ml de sangre: 40ml de Buffer Veronal), y homogeneizar con movimientos suaves.
- 3 - Cargar 16 tubos con 3ml de Ficoll Paque Plus y 5 ml de sangre diluida
- 4 - Centrifugar 21 min. a 1400 RPM (+- 400g)
- 5 - Descartar aprox. 80% del Plasma y recoger la capa mononuclear de 2 tubos a un tubo cónico
- 6 - Poner aprox. 6 ml de Buffer de aislamiento
- 7- Resuspender
- 8 - Centrifugar 15 min. a 1500 RPM
- 9 - Descartar el sobrenadante.
- 10 - Colocar aprox. 2 ml en cada tubo cónico y resuspender bien usando vortex (moderadamente).
- 11 - Juntar todo en un solo tubo cónico.
- 12 - Lavar cada tubo con aprox. 500  $\mu$ l y vortear para obtener células residuales y pasar al tubo con todas las células.
- 13 - Completar el borde del tubo con Buffer de Aislamiento.
- 14 - Centrifugar 20 min. a 1600 RPM.
- 15 - Descartar el sobrenadante.
- 16 - Resuspender en 1,2 ml de Buffer de Aislamiento

### **7.4.3 Técnica de Separación/Concentración de Células mononucleares por Buffy Coat**

- 1 - Separar 2 ml en un tubo para usos posteriores
- 2 - Diluir la sangre 1:1 en buffer Veronal (40 ml de sangre: 40ml de Buffer Veronal), y homogeneizar con movimientos suaves.
- 3 - Cargar 10 tubos con 8ml de sangre diluida
- 4 - Centrifugar 10 min. a 1500 RPM
- 5 - Descartar suavemente la mayoría la capa superior (plasma) y recoger la máxima cantidad de la fracción de células mononucleares (buffy coat) evitando la aspiración de células rojas, hacia un tubo cónico. Fraccionar en dos tubos.
- 6 - Agregar aprox. 6 ml de Buffer de Lisis y esperar 10 a 15 min hasta que la suspensión quede más clara
- 7 - Centrifugar 10 min. a 1500 RPM.
- 8 - Descartar el sobrenadante, y resuspender en 0,6ml con buffer de aislamiento. Juntar en un solo tubo.

### **7.4.4 Técnica de Conteo en Cámara Neubauer**

- 1 - Colocar 1,9 ml de Ac. Acético con azul tripan en 2 tubos
- 2 - Colocar 100µl de sangre en uno de los tubos y 100µl de la fracción de células mononucleares en el otro (Factor de dilución 1/20).
- 3 - Vortear 3 seg.
- 4 - Contar con cámara Neubauer (2 cuadrados grandes)
- 5 - El cálculo de la [ ] es simplemente el número de células contadas multiplicado por 100, (según la formula descrita antes)

### **7.4.5 Técnica de Aislamiento Inmunomagnético de Células CD34<sup>+</sup> (Perlas Dynal)**

#### **A - Lavado de las Perlas**

- 1 - Colocar en un tubo Eppendorf la cantidad a utilizar de perlas. (ej. 100µl de perlas para 1 ml de muestra)
- 2 - Agregar aprox. 1,5 ml de Buffer de Aislamiento

- 3 - Colocar en el magneto chico por 1 min.
- 4 - Descartar el sobrenadante (sin sacar del magneto)
- 5 – Sacar del magneto y colocar el mismo volumen de Buffer Aislamiento, que de perlas

## **B - Tratamiento con las Perlas**

Antes de comenzar tener presente ajustar la [ ] de la suspensión de células mononucleares entre  $4 \times 10^7$  a  $10 \times 10^7$  células mononucleares por ml. La técnica anterior ya está optimizada para satisfacer esta condición primaria.

- 1- Homogeneizar con Vortex la suspensión de células mononucleares
- 2- Agregar las perlas (previamente lavadas) al tubo y vortear 3 seg
- 3 - Colocar el tubo en un recipiente (vaso térmico) con hielo para mantener la solución entre 2 y 8 °C y rotar levemente durante 30 min.
- 4 - Una vez concluido el tiempo, retirar el tubo del vaso térmico y colocar Buffer de Aislamiento hasta una altura que tenga como referencia la superficie imantada del magneto, y luego resuspender
- 5 - Colocar en el magneto durante 2 min
- 6 - Sacar el sobrenadante (sin sacar el tubo del magneto) y guardarlo en otro tubo
- 7 - Sacar el tubo del magneto y colocar aprox. 2 ml de Buffer de Aislamiento y vortear
- 8 - Colocar el tubo en el magneto durante 1 min.
- 9 - Repetir los pasos 6 a 8 tres veces con el fin de eliminar las células residuales.
- 10 – Finalmente resuspender en 100µl de Buffer de Aislamiento

## **C - Separación (Detachment) de las Perlas**

- 1 - Agregar 100µl de DETACHaBEAD a la suspensión y homogeneizar con vortex
- 2 – Incubar (con tapón) a temperatura ambiente durante 45 min. con agitación leve
- 3 - Una vez concluido el tiempo, agregar 2ml de Buffer de Aislamiento y vortear 2-3 seg. para garantizar la total liberación de las perlas
- 4 - Colocar en el magneto durante 2 min.
- 5 - Transferir el sobrenadante (sin sacar del magneto) a un nuevo tubo

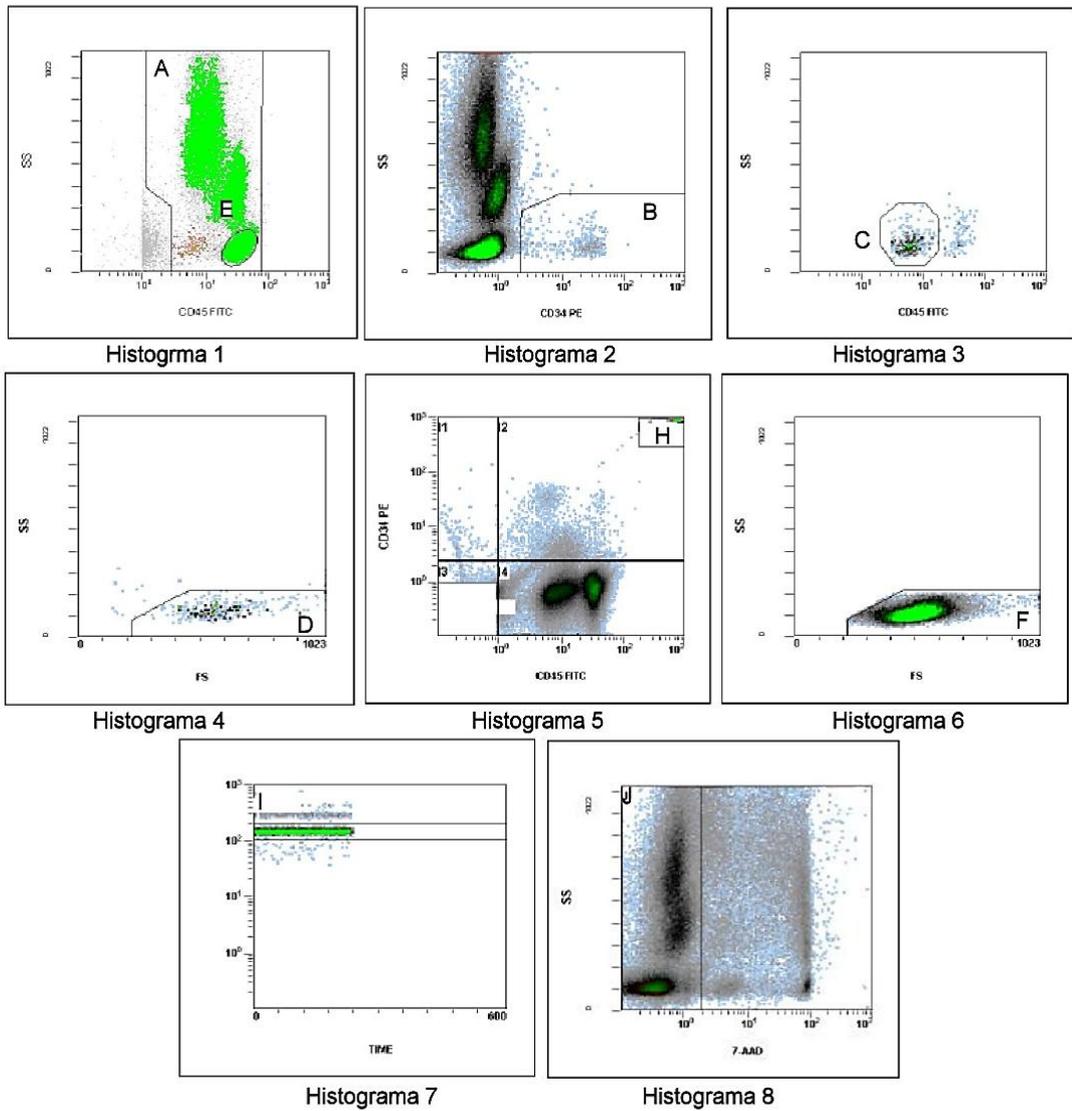
- 6 - Para obtener células residuales, lavar 3 veces con 500µl Buffer de Aislamiento y 2 min. en el magneto por vez, juntando el sobrenadante
- 7 - Colocar el tubo con el sobrenadante 3 min. en el magneto con el fin de eliminar perlas residuales, y transferir la suspensión hacia otro tubo
- 8 - Completar el tubo con Buffer de Aislamiento y resuspender
- 9 - Centrifugar 10 a 1600 RPM.
- 10 - Descartar el sobrenadante y resuspender en 250µl de Buffer de Aislamiento.

#### **7.4.6 Tinción para Citometría**

- 1 - Cargar dos tubos para citometria con 100µl de muestra por tubo
- 2 - Agregar 10µl de los colorantes (CD45FITC/CD34PE) vial 1, vortear bien e incubar durante 35 min. en la oscuridad
- 3 - Preparar el reactivo de Lisis (para cada tubo: 100µl del reactivo de lisis más 1,9 ml de agua destilada y homogeneizar con vortex)
- 4 - Un vez cumplido el tiempo sacar de la oscuridad
- 5 - Agregar 2ml de reactivo de lisis preparado a cada tubo y vortear
- 6 - Incubar en la oscuridad durante 10 min.
- 7 - Cumplido el tiempo, agregar 10µl de 7AAD (vial 3, 7 actinomicina D) para acceder a la viabilidad
- 8 - Incubar por lo menos 5 min. en la oscuridad
- 9 -Durante la espera de la etapa anterior, resuspender bien el frasco 4 de CytoCount (perlas de conteo) con movimientos leves para evitar la formación de burbujas
- 10 - Cumplido el tiempo de incubación, agregar 100µl de CytoCount y homogeneizar.

La adquisición de datos de conteos debe ser realizada preferentemente dentro de los 45 min. de agregado el lisante.

## 7.5 Panel de Histogramas y *Gates* para Conteos de Células CD34<sup>+</sup> en Citometría



<b>Muestra</b>	<b>Genero</b>	<b>TipMu</b>	<b>MCMNC</b>	<b>MCMNC2</b>	<b>SangreGB</b>
1FN	Masculino	Normal	Ficoll-Paque	Ficoll-Paque	4600
2FN	Masculino	Normal	Ficoll-Paque	Ficoll-Paque	3300
3FN	Femenino	Normal	Ficoll-Paque	Ficoll-Paque	4100
4FN	Femenino	Normal	Ficoll-Paque	Ficoll-Paque	5900
5FN	Indeterminado	ME	Ficoll-Paque	Ficoll-Paque	5500
1BC	Masculino	Normal	Buffy Coat	Buffy Coat	6300
2BC	Masculino	Normal	Buffy Coat	Buffy Coat	4600
3BC	Indeterminado	ME	Buffy Coat	Buffy Coat	11400
4BC	Indeterminado	ME	Buffy Coat	Buffy Coat	8600
1FP	Femenino	Normal	Ficoll Antiguo	Ficoll-Paque	7600
2FP	Masculino	Normal	Ficoll Antiguo	Ficoll-Paque	4000
3FP	Masculino	Normal	Ficoll Antiguo	Ficoll-Paque	6000
4FP	Masculino	Normal	Ficoll Antiguo	Ficoll-Paque	7400
5FP	Masculino	Normal	Ficoll Antiguo	Ficoll-Paque	5800
6FP	Masculino	Normal	Ficoll Antiguo	Ficoll-Paque	8300
7FP	Indeterminado	ME	Ficoll Antiguo	Ficoll-Paque	4800

Sangre_TotalGBT	MNC en Camara	% de MNC	Linfocitos_Totales	MNC
184000000	1380	30,00%	55200000	31700000
132000000	1600	48,48%	64000000	35700000
164000000	1800	43,90%	72000000	27700000
236000000	2700	45,00%	108000000	39600000
220000000	1100	20,00%	44000000	19200000
252000000	1890	30,00%	75600000	15200000
184000000	1200	26,08%	48000000	23400000
456000000	2000	17,50%	80000000	6200000
344000000	2000	23,25%	80000000	14800000
304000000	3200	42,00%	128000000	47200000
160000000	1800	45,00%	72000000	55200000
240000000	2400	40,00%	96000000	34500000
296000000	1400	20,00%	56000000	23600000
232000000	1740	30,00%	69600000	37800000
332000000	2000	24,00%	8000000	58100000
192000000	1400	15,00%	56000000	40500000

<b>MNC2</b>	<b>Factor De Concentración</b>	<b>%Rendimiento de Concetración</b>	<b>CD34 Camara</b>
38040000	22,97101449	68,91304348	24
42840000	22,3125	66,9375	19
33240000	15,38888889	46,16666667	24
47520000	14,66666667	44	9
23040000	17,45454545	52,36363636	
18240000	8,042328042	24,12698413	8
28080000	19,5	58,5	
7440000	3,1	9,3	103
17760000	7,4	22,2	
56640000	14,75	44,25	5,5
66240000	30,66666667	92	12
41400000	14,375	43,125	
28320000	16,85714286	50,57142857	9
45360000	21,72413793	65,17241379	7
69720000	29,05	871,5	8
48600000	28,92857143	86,78571429	11

CD34 Camara2	CD34_Total_Camara	CD34Cito_Sangre	CD34Cito_SangreTotal
120	30000	7	280000
95	23750	6,6	264000
120	30000	4,9	196000
45	11250	5,37	214800
		6,15	246000
40	10000	5,95	238000
		6	240000
		2,29	91600
		3,2	128000
27,5	6875	1,82	72800
65	16250	2,98	119200
		4,6	184000
45	11250	2,5	100000
70	17500	4,4	176000
110	27500	3,8	152000
		2,79	111600

ViabilidadCito_CD34	CD34MNCCito	CD34Cit1	CD34Cit2	
95,1		99	119	113
97,6		62	62	55,46
99,4		94	48,63	60,82
98,3		61,5	42,26	25,66
92,5		31,09	12,37	13,4
99,8		28,2	15,3	14,6
99,2		52,3	20,38	13
95,3		3,78	TAPADOCITO	TAPADOCITO
85,6		10,33	5,06	8,25
sin 7-AAD		44	6,6	5,6
sin 7-AAD		29,41	21,4	24,32
sin 7-AAD		124,98	25,65	29,49
sin 7-AAD		48,27	19,66	17,4
sin 7-AAD		54,9	33,2	31,2
sin 7-AAD		48	37	29
sin 7-AAD		20,5	5,8	7,82

PromdioCD34Cito	FactordeConcentraciónCD34	RendimientoAislamientoCD34
116	16,57142857	117,1717172
58,73	8,898484848	94,72580645
54,725	11,16836735	58,21808511
33,96	6,324022346	55,2195122
12,885	2,095121951	41,44419427
14,95	2,512605042	53,0141844
16,69	2,781666667	31,91204589
TAPADOCITO	TAPADOCITO	TAPADOCITO
6,655	2,0796875	64,42400774
6,1	3,351648352	13,86363636
22,86	7,67114094	77,72866372
27,57	5,993478261	22,05952952
18,53	7,412	38,38823286
32,2	7,318181818	58,65209472
33	8,684210526	68,75
6,81	2,440860215	33,2195122

<b>CD34EstimadoTotal</b>	<b>RendimientodelProcesoGeneral</b>
29000	10,36
14683	5,56
13681	6,98
8490	3,95
3221	1,31
<hr style="border: 2px solid blue;"/>	
3738	1,57
4172	1,74
<b>TAPADOCITO</b>	<b>TAPADOCITO</b>
1664	1,3
<hr style="border: 2px solid yellow;"/>	
1525	2,09
5715	4,79
6893	3,75
4633	4,63
8050	4,57
8250	5,43
1703	1,53