

**ARTÍCULO DE REVISIÓN**

# Células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical

*Hematopoietic stem cells from umbilical cord blood*

Efreem Horacio Montaño-Figueroa,<sup>1</sup> Julieta Rojo-Medina<sup>2</sup>

**Resumen**

La sangre de cordón umbilical (SCU) se consideró por mucho tiempo un producto de desecho; sin embargo, esto cambió después de descubrirse que contenía células progenitoras hematopoyéticas (CPH) que podían usarse en trasplante de médula ósea. El primer trasplante con SCU fue realizado con éxito en 1988 en Francia por la Dra. Gluckman. La inmadurez inmunológica presente en la SCU representa una ventaja, ya que la incidencia de enfermedad injerto contra hospedero (EICH) es baja comparada con otras fuentes de CPH y además permite cierta incompatibilidad en el sistema de antígenos de leucocitos humanos (HLA). La baja celularidad contenida en una unidad de CPH de SCU es sin embargo, para el trasplante en adultos, un problema debido a que en ocasiones no es suficiente según el peso corporal del paciente. Para contrarrestar este obstáculo se utilizan actualmente procedimientos como expansión celular en el laboratorio y uso de doble cordón umbilical entre otros.

**Palabras clave:** Sangre de cordón umbilical; Células progenitoras hematopoyéticas; Trasplante de médula ósea; Células CD34+.

**Abstract**

*Umbilical cord-blood (UCB) was considered a waste material after delivery for long time. Shortly thereafter of the finding that it contained abundant haematopoietic stem cells the scientific community was interested on it. The first successful UCB transplant was performed in 1988 in France by the Dr. Gluckman. The characteristic immune plasticity of the UCB represents an advantage due to its low incidence of graft versus host disease and it allows some HLA disparity. Cell dose represents the main limiting factor for using UCB in adults since the low cell amount is almost in all cases insufficient for the patient weight. Some strategies have been developed in order to overcome this obstacle like ex vivo expansion, as well as transplantation with double cord blood units among others.*

**Keywords:** Umbilical cord blood; Hematopoietic stem cells; Bone marrow transplantation; CD34+ cells.

<sup>1</sup> Banco de Sangre de Cordón Umbilical.

<sup>2</sup> Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea.

Correspondencia: Efreem Horacio Montaño Figueroa. Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea. Avenida Othón de Mendizábal 195, Col. Zácatenco, Del Gustavo A. Madero. México, D. F. Teléfono: 5119 4620, Extensión: 1313. Correo electrónico: herrefreen@hotmail.com

## » Introducción

La placenta humana (PH) representa la unión entre la madre y el producto de la fecundación. Su integridad durante el embarazo, es de vital importancia para la salud fetal y se conecta al feto a través del cordón umbilical (CU), estructura anatómica con ausencia de capilares y vasos linfáticos, pero que contiene una vena y dos arterias umbilicales imprescindibles para el intercambio gaseoso y paso de nutrientes de la madre al producto intrauterino.<sup>1</sup> El CU en un embarazo de término, pesa en promedio 40 g, tiene una longitud de 60 a 65 centímetros y un diámetro de 1.5 cm.<sup>2,3</sup> En el CU se encuentra la gelatina de Wharton o tejido conectivo embrionario que también participa en la circulación sanguínea y es abundante en células inmaduras con capacidad de diferenciación multipotente.<sup>4,5</sup>

Tanto a la PH como al CU se les consideró por muchos años un material de desecho posparto; sin embargo, a partir de las investigaciones realizadas en los años sesenta han adquirido importancia en la medicina regenerativa principalmente en trasplantes y actualmente en la terapia celular, debido a que se descubrió su potencial celular para regenerar la médula ósea dañada y otros tejidos.<sup>6-8</sup>

## » Antecedentes históricos

Los primeros informes sobre el uso de células de CU en trasplante de médula ósea, datan de 1972 cuando Ende y Ende infundieron en un paciente de 16 años con leucemia aguda linfoide, sangre de CU obtenida de ocho donadores, y aunque no reportan que se haya presentado una reconstitución inmunológica prolongada, si refieren que hubo cambios en los antígenos de los eritrocitos probablemente debido a quimerismo celular. Sin embargo, dicho concepto no se conocía entonces.<sup>9</sup> Secundario a este reporte se iniciaron trabajos de investigación para determinar las cualidades biológicas de la SCU. En 1974 Knudtzon publicó en la revista Blood la existencia de “colonias celulares hematopoyéticas” aisladas de cordón umbilical con comportamiento en cultivos celulares diferente a lo conocido en esa época y predice se trate de células progenitoras.<sup>10</sup> Siguieron algunas investigaciones en el campo pero fue hasta 1982 cuando Nakahata y colaboradores corroboraron esta hipótesis al aislar células progenitoras capaces de originar las tres líneas celulares hematológicas.<sup>11</sup>

Koike y Besalduch-Vidal demostraron que las células aisladas de SCU son capaces de mantener

su viabilidad y capacidad hematopoyética después de ser mantenidas a muy bajas temperaturas, por lo que podrían ser utilizadas en trasplantes de médula ósea.<sup>12,13</sup> Boyse y colaboradores realizaron los primeros estudios en modelos animales y consideraban que una cantidad pequeña de SCU, sería suficiente para trasplante.<sup>14</sup> Hasta esa fecha no se conocía cuánto tiempo podrían permanecer las células congeladas, ni tampoco un método de congelamiento confiable. Broxmeyer y su equipo establecieron a finales de los años ochenta el procedimiento para recolectar y almacenar SCU para uso en humanos.<sup>15</sup>

En octubre de 1988 Matthew Farrow, un hombre con anemia de Fanconi, fue trasplantado con SCU por el equipo de la Dra. Eliane Gluckman en el Hospital St. Louis en París. Las células trasplantadas fueron capaces de reconstituir la función hematopoyética de la médula ósea que previamente fue sometida a quimio-ablación con ciclofosfamida e irradiación.<sup>16</sup>

Posterior a estos resultados, se originaron los Bancos de Sangre de Cordón Umbilical. En 1990 iniciaron operaciones los primeros bancos de SCU en Milán, Italia; Dusseldorf, Alemania; y Nueva York, EUA, en este último se instituyeron los primeros lineamientos para su función, tales como la recolección, procesamiento y congelamiento de unidades de SCU, además se establecieron los aspectos éticos relacionados al procedimiento.<sup>17-19</sup>

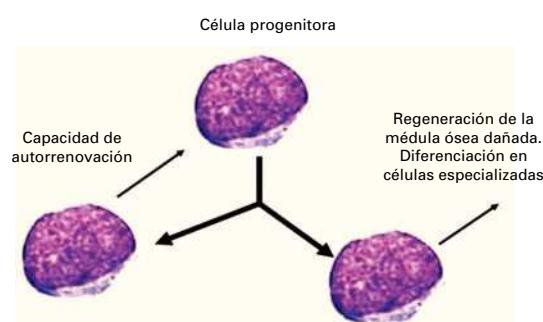
## » Propiedades biológicas de las células progenitoras de CU

En la sangre de cordón umbilical, además de encontrarse una cantidad considerable de CPH, pueden detectarse otras células con potencial para su uso terapéutico, como son las células endoteliales<sup>20</sup> y mesenquimales<sup>21,22</sup> que juegan un papel importante en la reconstitución hematopoyética<sup>23,24</sup> y las células progenitoras somáticas irrestrictas,<sup>25</sup> que tienen capacidad de diferenciarse en células de las tres capas embrionarias.<sup>26,27</sup> En la **Tabla 1** se muestran las características específicas de cada tipo celular.

La célula tallo o progenitora, es de tipo indiferenciado y en el proceso de división, da origen a dos células: una célula hija progenitora capaz de diferenciarse en células especializadas para formar tejidos del organismo humano, y una célula progenitora que se auto-renueva manteniendo así el número adecuado de células troncales de reserva. Esto es la denominada división asimétrica de la célula progenitora (**Figura 1**).<sup>28,29</sup>

» **Tabla 1.** Células contenidas en la SCU.

Tipo celular	Inmunofenotipo	Capacidad de diferenciación
Progenitoras hematopoyéticas	CD34+, CD71+ CD45RA	Hematopoyesis
Mesenquimales	CD73+, CD90+, CD105, CD34-, CD45-	Células del mesodermo
Progenitoras somáticas irrestritas	CD34-, CD45- HLA-II-	Osteoblastos, cartílago, adipocitos, neuronas

» **Figura 1.** División asimétrica de la CPH.

La célula progenitora mejor estudiada es la hematopoyética (CPH), ésta produce hasta un trillón de células sanguíneas diferenciadas (leucocitos, eritrocitos, plaquetas) por día, durante la vida de un organismo.<sup>30</sup> El antígeno CD34+ es una glucoproteína que se expresa normalmente en la membrana de 1% a 2% de las células mononucleares de la médula ósea. Este antígeno es específico para reconocer a las CPH y disminuye su expresión conforme la célula madura y va perdiendo su capacidad de autorrenovación y proliferación.<sup>31</sup>

Además de la SCU, las células progenitoras hematopoyéticas pueden obtenerse de la médula ósea y de la sangre periférica,<sup>32</sup> en el último caso es necesario aplicarle al donador factor estimulante de colonias de granulocitos (FEC-G), para estimular la producción de elastinas y catepsinas por parte de los neutrófilos y de esta forma movilizar; es decir, romper el sitio de unión, o sea la molécula CXCR4<sup>33</sup> de la célula madre, con el estroma de la medula ósea liberando así las células CD34+ a la circulación sanguínea para posteriormente, por medio de un procedimiento de aféresis, estas células son seleccionadas o cosechadas para ser infundidas al paciente.<sup>34</sup> El FEC-G no sólo provoca la movilización de las células progenitoras a la circulación, sino que además induce su proliferación con un efecto máximo a las 48 horas de aplicado en el donador.<sup>35</sup> La diferencia principal entre las tres fuentes de células progenitoras hematopoyéticas, es la cantidad de células CD34+ que recibe el paciente. El promedio es de  $5 \times 10^6$  por kilo de peso corporal cuando se obtienen de sangre periférica, esta cantidad se reduce a 3 y  $0.3 \times 10^6$  en el caso de médula ósea y de

SCU respectivamente. Esto influye en el retraso de la recuperación inmunológica posterior al trasplante.<sup>32</sup> Otras diferencias se resumen en la **Tabla 2.**<sup>36,37</sup>

### » **SCU en la regeneración de la médula ósea**

Muchas enfermedades son potencialmente tratadas con trasplante de SCU, entre éstas se encuentran principalmente las leucemias agudas, aunque su uso abarca inmunodeficiencias, tumores sólidos, enfermedades metabólicas congénitas y hemoglobinopatías.<sup>38</sup> Además de las diferencias ya mencionadas, la SCU tiene características propias que la hacen una atractiva materia prima en los trasplantes de médula ósea. El tiempo de espera para encontrar unidades de CPH de SCU compatibles es corto (una a dos semanas) ya que éstas se encuentran congeladas y validadas para el trasplante.<sup>39</sup> Los linfocitos contenidos en la SCU presentan inmadurez inmunológica, es decir aún no han estado en contacto con antígenos, por lo que son menos reactivos, con lo cual la incidencia de enfermedad injerto contra hospedero es menor;<sup>40</sup> esta cualidad permite además incompatibilidad hasta en dos antígenos del complejo principal de histocompatibilidad.<sup>41</sup> La posibilidad de infección por Citomegalovirus y el virus de Epstein Barr es mínima o ausente en la mayoría de los casos. Todos estos factores contribuyen de forma positiva en los resultados del trasplante de médula ósea con SCU.<sup>42</sup> Sin embargo, hay una limitante: la baja cantidad de células CD34+, lo que restringe su uso casi exclusivamente para pacientes pediátricos o aquellos

» **Tabla 2.** Diferencias entre las fuentes de CPH.

Fuente	Ventajas	Desventajas/complicaciones
Médula ósea	<ul style="list-style-type: none"> <li>Menor incidencia de enfermedad injerto vs. hospedero</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Necesarias múltiples punciones en crestas ilíacas para obtención</li> <li>Anestesia general</li> <li>Dolor, infección en sitio de punción</li> </ul>
Sangre periférica	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fácil movilización</li> <li>Inmune reconstrucción temprana</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aplicación de FEC-G</li> <li>Dolor óseo, fiebre</li> <li>Esplenomegalia transitoria</li> </ul>
Cordón umbilical	<ul style="list-style-type: none"> <li>Recolección libre de complicaciones</li> <li>Permite cierta incompatibilidad entre donador/receptor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Baja cantidad de CD34+</li> <li>Imposible una infusión posterior de linfocitos del donador en caso de recaída de la enfermedad</li> </ul>

con peso corporal máximo de 35 kilogramos. Aunque se han ideado técnicas para superar esta limitante, tales como el uso de dos unidades de CPH de SCU (doble cordón),<sup>43,44</sup> la expansión celular *ex vivo*<sup>45,46</sup> y el trasplante haploidéntico.

Los resultados óptimos dependen también de factores inherentes al paciente como son el estado físico, tipo y estado de la enfermedad.<sup>47</sup> Pero sin duda, la cantidad de células trasplantadas, tanto de células nucleadas totales (CNT) como de CD34+, es el punto crítico para la elección de la unidad de CPH de sangre de CU adecuada para cada paciente.<sup>48</sup> Aún hay controversia en cuanto al número idóneo de células a infundir, mientras que algunos autores consideran que el número total de CD34+ es el de mayor peso para elegir una unidad de CPH otros consideran que la cantidad de CNT es la que debe tomarse en cuenta.

## » Células nucleadas totales

Las recomendaciones para la criopreservación de SCU están regidas principalmente por NETCORD, una asociación internacional que agrupa a los bancos de sangre de cordón umbilical que cumplen con los estándares de calidad adecuados. Entre otras, NETCORD tiene la función de actualizar el inventario de unidades de CPH disponibles a nivel mundial para uso en trasplante. Dicha asociación establece en su reglamentación criopreservar unidades con una cantidad mínima de células nucleadas totales de  $3 \times 10^7$ . Para la infusión, la dosis recomendada es de  $2.5 \times 10^7$  por kilo de peso corporal (KPC) del paciente

(rango de  $1.7 \times 10^7$  a  $3.7 \times 10^7$ ).<sup>49</sup> Dosis menores a  $1.7 \times 10^7$  se relacionan con falla del injerto con una probabilidad de 75% de muerte, mientras que cuentas mayores de  $3.7 \times 10^7$ , se asocian a grados severos de EICH.<sup>50</sup>

## » Células CD34+

La dosis promedio a infundir es de  $3.7 \times 10^6$  KPC con cantidades mínimas y máximas de  $2.0 \times 10^6$  y  $5.0 \times 10^6$  respectivamente.<sup>51</sup> De igual manera que para las CNT, las dosis menores están relacionadas con una recuperación de la cuenta de neutrófilos muy prolongada (más de 35 días), con alta posibilidad de complicaciones infecciosas, por el contrario los pacientes que reciben dosis mayores a las recomendadas presentan una alta incidencia de EICH severa (III - IV) con una elevada mortalidad.<sup>52</sup>

## » Trasplante de doble cordón umbilical

El primer trasplante de este tipo fue realizado en adultos en el Hospital Universitario de Minnesota EUA. El trasplante de dos unidades de CPH logra injertos en más de 57% de los casos.<sup>53</sup> Como regla, la suma de la celularidad de ambas unidades de CPH debe ser estar en los rangos establecidos en los lineamientos de NETCORD previamente mencionados. Al infundir al menos una unidad con “buena celularidad” (lo mínimo en CNT o CD34+) junto con una con “celularidad deficiente”, esta última permite el injerto de la primera.<sup>54</sup> Finalmente la hematopoyesis, en la mayoría de los casos, sólo provendrá de la unidad de CPH con mayor celularidad aunque hay reportes médicos en los cuales la unidad de CPH con menor celularidad es la que injerta, esto ocurre entre la cuarta y sexta semana posterior al trasplante corroborado por las pruebas de quimerismo. En la mayoría de los casos no es predecible cuál de las dos unidades trasplantadas, injertará.<sup>55</sup>

En pacientes con leucemia aguda se recomienda actualmente, independientemente de la celularidad, el trasplante de doble unidad de CPH dado que se produce un efecto injerto contra tumor mayor (los linfocitos del donador destruyen células tumorales residuales en el paciente), disminuyendo así la posibilidad de recaída.<sup>56</sup> En pacientes con enfermedades hematológicas benignas, no hay beneficio del trasplante de doble unidad de CPH, en éstos la recomendación es el trasplante de una sola unidad con la celularidad adecuada e histocompatibilidad de 100%.<sup>57</sup>

## » Expansión celular ex-vivo y aplicación intraósea directa de CPH

Las CPH de SCU muestran proliferación acelerada cuando son incubadas con determinadas citocinas *in-vitro*.<sup>58</sup> En el año 2002 Shpall y colaboradores demostraron la factibilidad de esta técnica y aunque inicialmente no hubo diferencias notables en la reconstitución inmunológica entre pacientes transplantados con y sin expansión celular, esto produjo mayor investigación en el campo.<sup>59</sup> Posteriormente se demostró que el trasplante de dos unidades de CPH, una expandida *ex-vivo* y otra sin manipulación, sí provocaba una recuperación en la cuenta de neutrófilos de forma temprana. Actualmente se estudia cual es la mejor combinación, cantidad y tiempo de exposición de citocinas para mejorar la expansión.<sup>60,61</sup>

Con la idea de evitar el desperdicio de células CD34+ en su recorrido por la circulación sanguínea hasta llegar a la médula ósea, algunos grupos de trasplantes las están inyectando directamente en el hueso de los pacientes.<sup>62</sup> No obstante, se reporta una disminución en la incidencia de EICH, no hubo diferencias significativas en el injerto de neutrófilos comparado con pacientes que recibieron la infusión intravenosa.<sup>63</sup> Aún se requiere perfeccionamiento en la técnica, o quizás combinarla con infusión intravenosas paralela o expansión celular.

## » Reconstitución inmunológica

Una de las principales desventajas del TCPH de SCU es el retardo en la reconstitución inmunológica; es decir, la recuperación del sistema inmunológico en el paciente.<sup>64</sup> Mientras que el injerto mieloide (neutrófilos) ocurre alrededor del día 14 en pacientes transplantados con médula ósea (MO), éste se retraza hasta el día 22 en pacientes que reciben SCU. Respecto al injerto de plaquetas este se presenta al día 30 y 52 en pacientes transplantados de MO y SCU respectivamente.<sup>65,66</sup> Es por ello la importancia de una estricta terapia antimicrobiana, antimicótico y antiviral, así como apoyo transfusional intensivo en pacientes transplantados de SCU.

## » La histocompatibilidad

Al grado de similitud entre los antígenos de leucocitos humanos (HLA) expresados en las superficies celulares entre receptor y donador se le llama histocompatibilidad. El sistema HLA se encarga de

reconocer lo propio de lo ajeno en el organismo. Los genes que codifican para HLA se localizan en el brazo corto del cromosoma 6. Existen, referido a histocompatibilidad, dos clases de HLA: I y II. Los HLA clase I se expresan en casi todas las células nucleadas del cuerpo humano, mientras que los HLA clase II se encuentran casi exclusivamente en células que participan en la presentación de antígenos a los linfocitos T; es decir, células dendríticas, monocitos y linfocitos B.<sup>67</sup>

Cuando hay discordancia de las moléculas de HLA entre receptor y donador, se produce rechazo del injerto y EICH severa, ya que los linfocitos del donador reconocen las moléculas HLA extrañas en el receptor.<sup>68</sup>

La posibilidad de incompatibilidad en el HLA entre donador y paciente es una de las ventajas que ofrece el uso de CPH de CU. En comparación con CPH de médula ósea y sangre periférica movilizada, en las cuales la compatibilidad debe ser de 100% para garantizar el injerto y evitar EICH severa, la disparidad hasta en dos alelos, es decir una compatibilidad en cuatro de seis alelos entre donador y paciente no influye de manera significativa en la incidencia de EICH.<sup>41,69</sup> Se recomienda por lo menos, la tipificación de antígenos HLA Clase-I A y B y Clase-II DR para búsqueda de unidades compatibles. Una compatibilidad de 100% o 6/6 (los seis alelos del donador corresponden a los seis alelos del paciente) permite que se infundan unidades de CPH con mínima celularidad, mientras que en una compatibilidad 4/6 la cantidad de células a infundir debe ser la máxima recomendada.<sup>70</sup>

## » Conclusiones

A veinte años de iniciado el trasplante de médula ósea de SCU, mucho se ha descubierto: la biología de la CPH, existencia de otros tipos celulares, el uso de doble cordón y la expansión celular. Todavía quedan sin embargo, problemas por resolver, sobretodo en el trasplante de adultos, para quienes superar la baja celularidad es un punto crítico. Se están llevando a cabo nuevos procedimientos tales como el trasplante de tres unidades de CPH en conjunto con inmunoterapia con células NK,<sup>71</sup> el uso conjunto de células mesenquimales,<sup>72</sup> y la utilización de una unidad de CPH de SCU y CPH de sangre movilizada de otro donador.<sup>73,74</sup>

## Referencias

- Peng HQ, Levitin-Smith M, Rochelon B, et al. Umbilical cord stricture and overcoiling are common causes of fetal demise. *Pediatr Dev Pathol* 2006;9:14-19

2. Di naro E, Ghezzi F, Raio L, et al. Umbilical cord morphology and pregnancy outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod* 2001;96:150-157.
3. Raio L, Ghezzi F, Di naro, et al. Sonographic measurement of the umbilical cord and fetal anthropometric parameters. *Eur J Obstet Gynecol Reprod* 1999;83:131-135.
4. Nanav AK, Kohnen G, Milovanov AP, et al. **Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord.** *Placenta* 1997;18:53-64.
5. Miki T, Lehmann T, Cai H, et al. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* 2005;23:1549-1559.
6. Nathan DG. The beneficence of neonatal hematopoiesis. *N Engl J Med* 1989;321:1190-1192.
7. Broxmeyer HE. Investigator profile. *J Hematother Stem Cell Res* 2000;9:597-605.
8. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc, et al. Human umbilical cord blood as potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci* 1989;86:3828-3832.
9. Ende M, Ende N. Hematopoietic transplantation by means of fetal(cord) blood. *Virginia Med J* 1972;99:276-280.
10. Knudtzon S. In Vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* 1974;43:357.
11. Nakahata T, Ogawa M. Hematopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotent hemopoietic progenitors. *J Clin Invest* 1982;80:1324-1326.
12. Koike K. Cryopreservation of pluripotent and committed hemopoietic progenitor cells from human bone marrow and cord blood. *Acta Paediatr* 1983;275:983.
13. Besalduch-Vidal J. Nature and characterization of granulocyte-macrophage precursors in cord blood. University of Valencia School of Medicine, Spain. Doctoral Dissertation; 1985.
14. Boyse EA, Broxmeyer HE, Douglas GW. Preservation of fetal and neonatal hematopoietic stem and progenitor cells of the blood. U.S. Patent 5,004,681; 1991.
15. Broxmeyer HE, et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:4109-4113.
16. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321:1174-1175.
17. Rubinstein P, Dobrla L, Rosenfeld RE, et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:10119-10122.
18. Sugarman J, Kaland V, Kodish, et al. Ethical issues in umbilical cord blood banking. *JAMA* 1997;278:838-943.
19. International standards for cord blood collection, processing, testing, banking, selection and release. Third Ed; 2006.
20. Barker JN, Wagner JE. Umbilical-cord blood for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:526-532.
21. Chang Y, Tseng C, Hsu L, et al. **Characterization of two populations of mesenchymal progenitors in umbilical cord blood.** *Cell Biol Int* 2006;30:495-499.
22. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2006;8:315-317.
23. Erices A, Conget P, Minguez JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;109:235-242.
24. Dazzi F, Ramaamy R, Glennie S, et al. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev* 2006;20:161-171.
25. Kogler G, Sensken S, Airey JA, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004;200:123-135.
26. Kogler G, Sensken S, Wernet P. Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. *Exp Hematol* 2006;34:1589-1595.
27. Engelhardt M, Lubbert M, Guo Y, CD34+ or CD34-: which is the more primitive? *Leukemia* 2002;16:1603-1608
28. Bongso A. History and perspective of stem cell research. *Best Pract Res Clin Obst and Gyn* 2004;18:827-840.
29. Alison MR, Poulsom R, Forbes S. An introduction to stem cells. *J Pathol* 2002;197:419-423.
30. Kuehnle I, Goodell MA. The therapeutic potential of stem cells from adults. *BMJ* 2000;325:372-376.
31. Tse William, Bunting K, Laughlin M. New insights into cord blood stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 2008;15:279-284.
32. Urbano-Ispizua A. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: Stem cell source. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20:265-280.
33. Cashen AF, Lazarus HM, Devines SM. Mobilizing stem cells from normal donors: is it possible to improve upon G-CSF? *Bone Marrow Transplant* 2007;39:577-588.
34. Tabilio A, Falzetti F, Giannoni C, et al. Stem cell mobilization in normal donors. *J Hematother* 1997;6:227-234.
35. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematology* 2002;30:973-981.
36. Pulsipher MA, Nagler A, Lannone R. Weighing the risks of G-CSF administration, leukopheresis and standard marrow harvest: ethical and safety considerations for normal pediatric hematopoietic cell donors. *Pediatr Blood Cancer* 2006;46:422-433.
37. Buckner CD, Clift RA, Sanders JE, et al. Marrow harvesting from normal donors. *Blood* 1984;64:630-634.
38. Reimann V, Creutzig U, Koehler G. Stem cells derived from cord blood in transplantation and regenerative medicine. *Dtsch Arztebl Int* 2009;106:831-836.
39. Rubinstein P, et al. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood* 1993;81:1679-1690.
40. Kurtzberg J. Update on umbilical cord blood transplantation. *Curr Opin Pediatr* 2009;21:22-29.
41. Gluckman E, Koehler G, Rocha V. Human leukocyte antigen matching in cord blood transplantation. *Semin Hematol* 2005;42:85-90.
42. Gluckman E, Rocha V, Arcese W, et al. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: Guideline for donor choice. *Exp Hematol* 2004;32:397-407.
43. Cutler C, Yeap BY, Kao G, et al. Double umbilical cord blood transplantation using reduced intensity conditioning: a single-centre experience. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:Suppl:S23.
44. Ballen KK, Spitzer TR, Yeap BY, et al. Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:82-89.
45. De Lima M, McMannis JD, Saliba R, et al. Double cord transplantation with and without ex-vivo expansion. *Blood* 2008;112:63. (Abstract)
46. Hofmeister CC, Zhang J, Knight KL, et al. Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from hematopoietic niche. *Bone Marrow Transplantation* 2007;39:11-23.
47. Chaidos A, Kanfer E, Apperley JF. Risk assessment in hematopoietic stem cell transplantation: Disease and disease stage. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20:125-154.
48. Schoemann H, Theunissen K, Maertens J. Adult umbilical cord blood transplantation: a comprehensive review. *Bone Marrow Transplant* 2006;38:83-93.
49. International standards for cord blood collection, processing, testing, banking, selection and release. Netcord Third Ed; 2006.
50. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, et al. **Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival.** *Blood* 2003;100:1611-1618.
51. Migliaccio AR, Adamson JW, Stevens CE, et al. Cell dose and speed of engraftment in umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood* 2000;96:2717-2722.
52. Lee SJ, Kamani N, Confer DL. Principles and tools for selection of umbilical cord blood and unrelated adult donor grafts. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:112-119.
53. Brunstein CG, Barker JN, Weisdorf DJ, et al. Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease. *Blood* 2007;110:3064-3070.
54. Scardavou A, Smith K, Hawke R, et al. CD34+ viability is a critical determinant of the engraftment potential of umbilical cord blood in double unit transplantation. *Blood* 2007;110:600.
55. Szabolcs P, Niedzwiecki D. Immune reconstitution after unrelated cord blood transplantation. *Cytotherapy* 2007; 9:111-122.
56. Grewal SS, Barker JN, Wagner JE. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? *Blood* 2003;101:4233-4238.
57. Verneris MR, Brunstein C, DeFor TE, et al. Risk of relapse after umbilical cord blood transplantation in patients with acute leukemia: marked reduction in recipients of two units. *Blood* 2005;106:93. (Abstract)
58. Lewis I, Vefaille CM. Multilineage expansion potential of primitive hematopoietic progenitors. Superiority of umbilical cord blood compared to mobilized peripheral blood. *Exp Hematol* 2000;28:1087-1095.
59. Shpall EJ, Quinones R, Giller R, et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8:368-370.
60. Lazzari L, Lucchi S, Rebulla P, et al. Long-term expansion and maintenance of cord blood haematopoietic stem cells using thrombopoietin, flt3-ligand, interleukin-6 and interleukin-11 in serum-free and stroma-free culture system. *Br J Haematol* 2001;112:397-404.
61. Stanevsky A, Goldstein G, Nagler A. Umbilical cord blood transplantation: Pros, cons and beyond. *Blood Reviews* 2009;23:199-204.
62. Brunstein CG, Barker JN, Weisdorf DJ, et al. Intra-BM injection to enhance engraftment after myeloablative umbilical cord blood transplantation with two partially HLA-matched units. *Bone Marrow Transplant* 2009;43:935-940.
63. Frassoni F, Gualandi F, Podesta M, et al. Direct intrabone transplant of unrelated cord blood cells in acute leukemia: a phase I/II study. *Lancet Oncol* 2008;9:831-839.
64. Tse W, Bunting KD, Laughlin MJ. New insights into cord blood stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 2008;15:279-284.
65. Greval SS, Barker JN, Davies S, Wagner JE. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? *Blood* 2003;101:4233-4241.
66. Moscardo F, Sanz J, Senent L, et al. Impact of hematopoietic chimerism at the day +14 on engraftment after unrelated umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancies. *Haematologica* 2009;94:827-831.

67. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;14:782-785.
68. Kamani N, Spellman S, Katovich C, et al. State of the art: HLA matching and outcome of unrelated donor umbilical cord blood transplants. *Biol B and Marrow Transpl* 2008;14:1-6.
69. Montaño-Figueroa EF, Fernandez-Torres J, Flores-Jimenez AD, Rojo-Medina J. Human leukocyte antigen matching: an important factor, but not the unique to the success in unrelated-cord blood transplantation. *Vox Sanguinis* 2010;99:(abstract S-44).
70. Rubinstein P. Cord blood banking for clinical transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2009;44:635-642.
71. Miller JS, Brunstein CG, Cooley S, et al. A novel triple umbilical cord blood transplant (UCBT) strategy to promote NK cell immunotherapy (unit 1) with a fully ablative preparative regimen followed by a double UCBT in patients with refractory AML. *Blood* 2006;108:3111.
72. Le Blanc K, Samuelson H, Gustafsson B, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2007;21:1733-1738.
73. Magro E, Regidor C, Cabrera R, et al. Early hematopoietic recovery after single unit unrelated cord blood transplantation in adults supported by co-infusion of mobilized item cells from a third party donor. *Haematologica* 2006;91:640-648.
74. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood. *Stem Cells* 2008;26:146-506.