



- ◆ Trabajo realizado por el equipo de la Biblioteca Digital de la Universidad CEU-San Pablo
- ◆ Me comprometo a utilizar esta copia privada sin finalidad lucrativa, para fines de investigación y docencia, de acuerdo con el art. 37 de la M.T.R.L.P.I. (Modificación del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual del 7 julio del 2006)

# Células madre del cordón umbilical

Dr. Jaime Pérez de Oteyza, Dra Anabelle Chinae,  
Servicio de Hematología Hospital Ramón y Cajal  
Centro Integral Oncológico Clara Campal. Grupo Hospital  
de Madrid

Unidad de Terapia Celular, Facultad de Medicina, Universidad  
CEU San Pablo

La primera observación de la presencia de células madre en la sangre del cordón umbilical (SCU) se debe a Knudtzon y cols, quienes en 1974 publicaron la detección de unidades formadoras de colonias circulantes en muestras de cordón humano<sup>1</sup>. En la discusión de su artículo, los autores ya sugirieron la posibilidad de que esas "células madre hematopoyéticas" pudieran ser de utilidad en la regeneración de la médula ósea. Este hallazgo motivó que otros grupos comenzaran a investigar el potencial de la SCU como fuente de células madre. Así, en 1982 Nakahata y Ogawa demostraron la presencia, no sólo de progenitores comprometidos, sino de células multipotentes con capacidad de autorrenovación<sup>2</sup>. Ya en la década de los 80, el equipo encabezado por Broxmeyer comprobó que la cantidad de progenitores hematopoyéticos obtenidos recogiendo toda la sangre presente en el cordón umbilical, podría ser suficiente para regenerar la hematopoyesis de una persona<sup>3</sup>. Sus estudios y los de Koike y cols también demostraron que la SCU podía someterse a un procedimiento de crioconservación que garantizaba la posibilidad de almacenamiento durante un tiempo prolongado, manteniendo su viabilidad y su funcionalidad hematopoyética<sup>4,5</sup>. Estos hallazgos permitieron establecer la hipótesis de que la SCU podía ser utilizada como fuente de progenitores hematopoyéticos en niños que precisasen un trasplante de médula ósea pero no tuviesen un donante compatible. Fue entonces cuando E. Gluckman decidió tratar a un niño con anemia de Fanconi, mediante el trasplante de SCU proveniente de un hermano sano a quien se recogió la sangre del cordón en el momento del nacimiento. Este primer trasplante se publicó en 1989 y el paciente continúa vivo y curado en la actualidad<sup>6</sup>.

A partir de aquel momento comenzó a desarrollarse la idea de la conveniencia de crear bancos de cordón umbilical en los que almacenar unidades de SCU que estuvieran disponibles para los pacientes, emparentados o no emparentados, que lo necesitasen.

## Células madre hematopoyéticas

Las células madre hematopoyéticas del cordón umbilical tienen unas características peculiares que las diferencian de las de la médula ósea adulta y de las que circulan en la sangre periférica. La SCU contiene un número mayor de poblaciones más primitivas tales como las "células iniciadoras de cultivo a largo plazo" (LTCIC), y también muestran una mayor actividad de telomerasa, lo que se asocia a un mayor potencial proliferativo. Este hecho se traduce en que con SCU es posible regenerar la hematopoyesis de un paciente empleando un menor número de células que si se utiliza médula ósea o sangre periférica. En efecto, para garantizar el prendimiento de un trasplante alogénico de médula ósea o progenitores hematopoyéticos de sangre periférica se necesita una cantidad de  $1-2 \times 10^6$  células CD34+ por kilogramo de peso del receptor. Por el contrario en los trasplantes de cordón se requiere un número en torno a  $1 \times 10^5$  células CD34+, es decir, de una magnitud diez veces menor, lo que da una idea de su enorme capacidad proliferativa.

Una de las peculiaridades de las células madre del cordón umbilical reside en el hecho de que, aun siendo células madre adultas, todavía conservan algunas de las propiedades de célula madre embrionaria, tales como la expresión de los factores transcripción Oct-4, Rex-1, Sox-2 y Nanog, los antígenos embrionarios específicos de estadio SSEA-3 y SSEA-4, y marcadores como TRA-1-60 y TRA-1-81, también propios de células embrionarias<sup>7</sup>.

Otra de sus peculiaridades es la baja inmunogenicidad manifestada por la débil expresión de antígenos del sistema mayor de histocompatibilidad y por falta de capacidad estimuladora de la proliferación de linfocitos alogénicos. Esta propiedad resulta claramente ventajosa en situaciones de utilización terapéutica alogénica, en las que cabe esperar una menor probabilidad de rechazo o de enfermedad de injerto contra huésped.

La cantidad de células madre hematopoyéticas que pueden obtenerse en una unidad de sangre de cordón umbilical es muy variable, aunque se han identificado factores dependientes tanto de la madre como del feto, que determinan un mayor o menor contenido de estos progenitores. En un estudio del grupo COLBT que analizó los datos 8.000 unidades de SCU procedentes de varias universidades estadounidenses, se observó que los nacidos de etnia caucásica y los de etnia hispana tenían un contenido mayor de células CD34+/CD38- y CD34/CD61+ que los de etnia afroamericana o asiática<sup>8</sup>. Asimismo observaron que los nacidos por cesárea tenían un mayor contenido de progenitores hematopoyéticos compro-

metidos (CFU). Otros autores han encontrado que este incremento en el número de células madre en las cesáreas, es más marcado cuando se realiza debido a sufrimiento fetal<sup>9</sup>. Diversos estudios han tratado de correlacionar el contenido de células madre con el sexo del nacido, encontrado resultados poco concluyentes. Aroviita y cols encontraron una mayor concentración de células CD34+ en los nacidos varones independientemente de su peso<sup>10</sup>, pero otros grupos no han hallado diferencias significativas<sup>11</sup>. La edad de la madre parece influir en el contenido en células progenitoras, que es mayor en las gestantes más jóvenes<sup>12</sup>.

Aparte de las células madre hematopoyéticas, la SCU contiene otras poblaciones de células madre que le confieren un enorme interés desde el punto de vista de su potencial uso terapéutico<sup>13</sup>, tales como las células madre mesenquimales, progenitores endoteliales y poblaciones recientemente descritas que describiremos a continuación.

### Células madre mesenquimales

Las células multipotenciales del estroma, también llamadas células madre mesenquimales, se han definido como un tipo de células adherentes en cultivo, caracterizadas por la expresión de CD105, CD73 y CD90, por la ausencia de otros antígenos de linaje linfohemopoyético como CD34, CD45, CD79a, CD19, CD14, CD11b o DR, y por la propiedad de diferenciarse in vitro a condroblastos, osteoblastos y adipocitos<sup>14</sup>. Aparte de estos requisitos mínimos para ser consideradas MSC, se caracterizan también por la expresión de las moléculas STRO-1, VCAM y SH-3, así como por la capacidad de producción de interleukina 10 (IL10) y TGF- $\beta$ . También hay evidencia de que sus propiedades de autorrenovación y diferenciación se asocian a la expresión de determinados micro RNAs, como el miR-140, que participa en su diferenciación a cartílago y el miR-24 en la formación de osteocitos<sup>15</sup>. En la figura 1 puede observarse un cultivo de células madre mesenquimales originando adipocitos, obtenido en nuestro laboratorio. Otros grupos han caracterizado la estructura funcional de los adipocitos generados de esta forma y su dinámica de expresión de marcadores específicos<sup>16</sup>.

Las células madre mesenquimales presentes en el cordón umbilical son candidatas clave para estrategias de terapia celular y medicina regenerativa<sup>17</sup>. Entre otras utilidades potenciales se ha comprobado en modelos murinos que pueden ser de utilidad para la reparación del epitelio pulmonar<sup>18</sup>, para la regeneración de la piel<sup>19</sup> y para el tratamiento de la diabetes<sup>20</sup>.

## Células progenitoras multilínea

Recientemente se ha identificado en la SCU una nueva estirpe de célula madre multipotente que se ha denominado células progenitoras multilínea (MLPC). Se trata de una población adherente al plástico, caracterizada por un fenotipo CD45+, CD34+, CD9+, Nestina+. Entre sus peculiaridades se encuentran la gran capacidad de expansión manteniendo estabilidad genética y una gran plasticidad con capacidad de diferenciación hacia líneas de las tres capas germinales, sin aparente potencial teratogénico. Estas células son distintas de las mesenquimales descritas anteriormente, en la expresión de CD9, CD109 Y CD90. Mediante microarrays se ha visto que se distinguen en la expresión de 360 de los 942 genes comparados<sup>21</sup>. Las MLPC tienen un tiempo de duplicación de 35 a 50 horas y pueden duplicarse hasta 80 veces sin perder la integridad genómica.

## Células madre endoteliales

Las células madre endoteliales también se hallan representadas en la SCU, en un número 10 veces mayor que en la médula ósea, caracterizándose por un fenotipo CD34+, CD11b+, KDR+, VEGFR3+. La presencia de esta población ha despertado un gran interés por sus posibilidades de aplicación en medicina regenerativa para enfermedades cardiovasculares<sup>22</sup>. En modelos experimentales, varios grupos han utilizado progenitores endoteliales de la sangre del cordón umbilical para desarrollar válvulas cardíacas<sup>23</sup>. Básicamente emplean armazones o matrices acelulares con forma de anillo valvular sobre las que se cultivan las células del cordón umbilical humano en condiciones apropiadas para la diferenciación de los progenitores endoteliales. De esta manera se consigue generar un tejido de cobertura que reúne todas las características antigénicas y funcionales de un neoendotelio, expresando moléculas tales como el factor von Willebrand o el CD31. Además, mediante ensayos de adhesión plaquetaria se ha comprobado que este endotelio no es trombogénico<sup>24</sup>.

El grupo de Schmidt, en Zurich ha empleado progenitores endoteliales derivados del cordón umbilical humano para generar estructuras semejantes a vasos sanguíneos sobre matrices biodegradables<sup>25</sup>. Recientemente se han implantado ya en pacientes dispositivos similares a vasos sanguíneos desarrollados a partir de células madre, demostrando su utilidad clínica en la revascularización de enfermos con arteriopatía isquémica<sup>26</sup>.

## Células madre muy pequeñas semejantes a las embrionarias

Otra de las poblaciones que se ha podido identificar en la SCU es la de las denominadas "células madre muy pequeñas semejantes a las embrionarias" o "very small embryonic-like stem cells" (VSEL)<sup>27</sup>. Como su nombre indica, tienen un tamaño pequeño de entre 3 y 5 micras, presentan factores de transcripción como Oct-4 y Nanog, y expresan antígenos embrionarios como SSEA-4<sup>28</sup>. Además, exhiben un fenotipo característico CXR4+, AC133+, CD34+, lin-, CD45- y expresan otros marcadores de célula germinal primordial, tales como fosfatasa alcalina de tipo fetal, Mvh, Stella, Nobox, Fragilis y Hdac6<sup>29</sup>. El gran interés de este subtipo celular radica en que conserva la pluripotencialidad propia de las células embrionarias, mientras que al estar presentes en la SCU su obtención no requiere la manipulación de embriones<sup>30</sup>.

## Células madre somáticas sin restricción

En el año 2004, Kögler y cols describieron una nueva célula madre somática humana con propiedades pluripotenciales intrínsecas que denominaron "Unrestricted Somatic Stem Cell" (USSC)<sup>31</sup>. Esta rara población se encontró en la fracción CD45- de la SCU, mostrando un crecimiento adherente. Su propiedad más llamativa reside en que es capaz de sufrir más de 40 duplicaciones sin diferenciación espontánea ni pérdida de longitud de los telómeros, pudiendo expandirse hasta 10<sup>15</sup> células sin perder pluripotencialidad. Desde el punto de vista fenotípico, expresan CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD54, CD58, CD71, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166 y CD271<sup>32</sup>. También presentan los factores de transcripción Oct-4 y Nanog, y los antígenos SSEA-3 y SSEA-4, que como ya vimos son marcadores de célula madre embrionaria. Desde el punto de vista funcional se ha comprobado su capacidad de diferenciación a linajes de mesodermo, ectodermo y endodermo, incluyendo osteoblastos, condroblastos, adipocitos, células hematopoyéticas y células neurales como astrocitos y neuronas<sup>33</sup>. Más aún, el trasplante de USSC humanas en un modelo ovino, constató el desarrollo de hepatocitos productores de albumina y de cardiomiocitos humanos que podían seguirse detectando muchos meses después del injerto. Es importante resaltar que en estos experimentos con animales, no se observó aparición de tumores en ningún caso<sup>34</sup>. Este hecho resulta de gran importancia ya que la aparición de tumores en uno de los riesgos potenciales cuando se emplean células embrionarias.

Recientemente, se ha comprobado que las USSC tienen además la propiedad de facilitar el anidamiento o "homing" de los progenitores hematopoyéticos CD34+

en la médula ósea<sup>35</sup>. Este hallazgo sugiere que las USSC purificadas podrían emplearse para facilitar el injerto en los pacientes que se someten a un trasplante con SCU.

## Criopreservación de células del cordón umbilical

La conservación de la sangre del cordón umbilical para uso diferido, requiere el empleo de un método que garantice el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de las células madre. Como hemos mencionado anteriormente, la criopreservación es el procedimiento idóneo para este fin. Básicamente consiste en someter a las células a un proceso de enfriamiento progresivo, con descenso controlado de la temperatura a un ritmo entre 1°C y 2°C por minuto. Este proceso se lleva a cabo en un equipo de congelación programada controlado por ordenador. En el momento en que se produce la transición de fase líquida a fase sólida, la muestra libera calor de fusión que el equipo compensa hasta alcanzar el punto eutéctico. El enfriamiento gradual se continúa hasta que se alcanzan los -100°C, momento en el que la muestra se transfiere a un contenedor de nitrógeno líquido para su almacenamiento definitivo a -196°C<sup>36</sup>. Para evitar el daño celular crio-inducido se emplean sustancias crioprotectoras como el dimetilsulfóxido (DMSO), que gracias a sus propiedades coligativas, evitan la formación de microcristales y la deshidratación celular. Sin embargo, el DMSO produce algunos efectos adversos, por lo que cuando la muestra se descongela para su uso clínico, suele ser recomendable eliminarlo mediante procedimientos de lavado celular<sup>37</sup>. A este respecto se han publicado procedimientos de lavado automáticos o semiautomáticos, como el desarrollado por nosotros, que no alteran la funcionalidad de las células madre y no afectan a su capacidad de implante<sup>38</sup>.

Una de las cuestiones fundamentales es cuanto tiempo pueden mantenerse las células criopreservadas, existiendo la unánime idea de que la duración puede ser indefinida. Teniendo en cuenta que la sangre del cordón umbilical se viene almacenando desde 1989, los datos disponibles no permiten retrotraerse más en el tiempo, pero Broxmeyer y cols han demostrado la recuperación funcional de progenitores hematopoyéticos y células madre en la sangre del cordón umbilical humano criopreservada durante 15 años<sup>39</sup>.

Clásicamente se ha considerado que las células sólo pueden someterse a criopreservación una vez, es decir, que tras haber sido descongeladas, no podrían volver a congelarse de nuevo. De hecho en la actualidad no se admite la posibilidad de realizar un trasplante con una unidad congelada dos veces. Esto supone

una considerable limitación, que obliga a utilizar toda la muestra en un solo procedimiento, impidiendo en teoría conservar una parte para otras aplicaciones. Sin embargo, recientemente el grupo de Gunetti y cols ha conseguido validar un procedimiento de re-congelación de sangre del cordón umbilical en condiciones de buena práctica de fabricación (GMP). Este hallazgo ofrece nuevas opciones tanto para aplicaciones en trasplante como en medicina regenerativa, ya que permite descongelar unidades que están actualmente almacenadas, fraccionarlas para su utilización parcial y recongelarlas para ulteriores aplicaciones<sup>40</sup>.

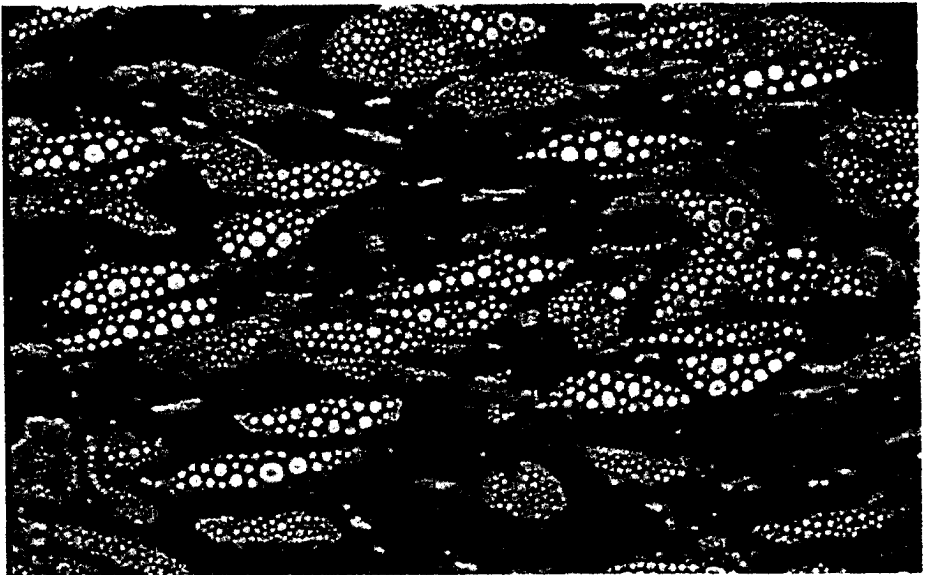
### Expansión de células del cordón umbilical

Tal como se refirió anteriormente, la utilización de la sangre del cordón umbilical en el trasplante hematopoyético requiere disponer de un número mínimo de células madre que aseguren el implante. Esta cifra depende del peso del receptor, lo que supone una dificultad en pacientes adultos. Por ello, se han desarrollado numerosas iniciativas encaminadas a tratar de incrementar el contenido en células madre mediante manipulación "in vitro", empleando diversas combinaciones de citokinas y factores de crecimiento. Los experimentos iniciales mostraron la factibilidad de expandir progenitores comprometidos a linajes determinados, en proceso ya de maduración y diferenciación. Sin embargo, la expansión real de las verdaderas células madre no ha resultado tan sencilla. Considerando que uno de los principales problemas del trasplante hematopoyético con SCU es la lentitud del prendimiento plaquetario, se han iniciado numerosos proyectos encaminados a incrementar el componente de progenitores megacariocíticos. El grupo canadiense de Edmonton, comprobó que los progenitores megacariocíticos de la SCU expandidos con trombopoyetina e interleukina-3 mantenían su capacidad de anidamiento<sup>41</sup>. Las estrategias fundamentales de expansión han ido encaminadas a definir la combinación idónea de citokinas<sup>42</sup>, a desarrollar sistemas de cultivo tridimensional en biorreactores<sup>43</sup>, y a modular la expresión de genes que regulan la proliferación celular. Así, Rizo y cols, en un modelo clínicamente relevante, han demostrado que la expresión forzada del gen BMI1 en las células CD34+ de la SCU facilita la autorrenovación y el mantenimiento a largo plazo de las células madre hematopoyéticas<sup>44</sup>. También se ha comprobado que el co-cultivo con poblaciones de células mesenquimales del estroma mejora las posibilidades de expansión de la SCU<sup>45</sup>.



## Consideraciones finales

De todo lo anteriormente expuesto se deduce que la sangre del cordón umbilical posee una exquisita variedad de subpoblaciones de células madre y progenitores de distintas estirpes. Las células madre hematopoyéticas (HSC), las células madre mesenquimales (MSC), las células progenitoras multilinaje (MLPC), los progenitores endoteliales (EPC), las células madre muy pequeñas semejantes a las embrionarias (VSEL) y las células madre somáticas sin restricción (USSC), constituyen una fuente de extraordinaria versatilidad que las convierte en candidatas ideales para aplicaciones no ya futuras, sino actuales en el campo del trasplante, la terapia celular y la medicina regenerativa.



*Figura 1: Formación de adipocitos en cultivo a partir de células madre mesenquimales. (J. Pérez de Oteyza y Paloma Ramos)*

## Bibliografía

- 1 Knudtson S: In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* 1974;43:357.
- 2 Nakahata T, Ogawa M: Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono and multipotent hemopoietic progenitors. *J Clin Invest*, 1982; 80:1324
- 3 Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Army M, Thomas L, Boyse EA: Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:3828.
- 4 Koike K: Cryopreservation of pluripotent and committed hemopoietic progenitor cells from human bone marrow and cord blood. *Acta Paediatr Japan* 1983; 25:275-983.
- 5 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 4/02/1991
- 6 Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, Friedman H, Douglas GW, DeVergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, Cooper S, English D, Kurtzberg J, Bard J, Boyse EA: Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;32 I:1174.
- 7 Zhao Y, Eang H, Mazzone T. Identification of stem cells from human umbilical cord with embryonic and hematopoietic characteristics. *Exp Cell Res*. 2006, 312:2454-64
- 8 Cairo MS, Wagner EL, Fraser J, et al. Characterization of banked umbilical cord hematopoietic progenitor cells and lymphocyte subsets and correlation with ethnicity, birth weight, sex and type of delivery: A Cord Blood Transplantation (COLBT) Study report. *Transfusion* 2005; 45:856-866.
- 9 Manegold G, Meyer-Monard D, Tichelli A, Pauli D, Holzgreve W, Troeger C. Cesarean section due to fetal distress increases the number of stem cells in umbilical cord. *Transfusion* 2008;Jan 15 (epub ahead of print).
- 10 Aroviita P, Teramo K, Hiilesmaa V, Kekomäki R. Cord blood hematopoietic progenitor cell concentration and infant sex. *Transfusion* 2005;45:613-621
- 11 Solves P, Mirabet V, Perales A, Soler MA. Newborn's sex and hematopoietic progenitor cell content of cord blood. *Transfusion* 2005;45:1828.

- 12 Nakagawa R, Watanabe T, Kawano Y, Kanai S, Suzuya H, Kaneko M, Watanabe H, Okamoto Y, Kuroda Y, Nakayama T. Analysis of maternal and neonatal factors that influence the nucleated and CD34+ cell yield for cord blood banking. *Transfusion*. 2004 Feb;44(2):262-267.
- 13 Broxmeyer HE. Biology of cord blood cells and future prospects for enhanced clinical benefit. *Cytotherapy* 2005;7:209-218.
- 14 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-317.
- 15 Lakshminpathy U, Hart R. MicroRNA expression in multipotent mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 2008;26:356-363.
- 16 Karahuseynoglu S, Kocaeft C, Balci D, Erdemli E, Can A. Functional structure of adipocytes differentiated from human umbilical cord stroma-derived stem cells. *Stem cells* 2008; 26:682-691.
- 17 Bieback K, Klüter H. Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. *Curr Stem Cell Res Ther* 2007; 2:310-23.
- 18 Sueblinvong V, Loi R, Eisenhauer PL, Bernstein, IM, Suratt BT, Spees JL, Weiss DC. Derivation of lung epithelium from human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177:701-711.
- 19 Dai Y, Li J, Li J, Dai G, Mu H, Wu Q Hu, Cao Q. Skin epithelial cells in mice from umbilical cord blood mesenchymal stem cells. *Burns* 2007;418-428.
- 20 Liu M, Han ZC. Mesenchymal stem cells: Biology and clinical potential in Type 1 diabetes therapy. *J Cell Mol Med* 2008;feb 24 (Epub ahead of print).
- 21 Van de Ven C, Collins D Bradley MB, Morris E, Cairo MS. The potencial of umbilical cord blood multipotent stem cells for nonhematopoietic tissue and cell regeneration. *Exp Hematol* 2007:1753-1765.
- 22 Bonanno G, Mariotti A, Procoli A, Corallo M, Rutella S, Pessina G, Scambia G, Mancuso S, Pierelli L. Human cord blood CD133+ cells immunoselected by a clinical-grade apparatus differentiate in vitro into endothelial and cardiomyocyte-like cells. *Transfusion* 2007;47:280-289
- 23 Schmidt D, Hoerstrup SP. Tissue engineered heart valves based on human cells *Swiss Med Wkly* 2005;135:618-623
- 24 Fang, Xie S, Wang S, Gao H, Wu C and Pan L. Construction of tissue-engineered heart valves by using decellularized scaffolds and endothelial progenitor cells *Chin Med J* 2007; 120 (8): 696-702

- 25 Engineered Living Blood Vessels: Functional Endothelia Generated From Human Umbilical Cord-Derived Progenitors. Schmidt D, Asmis LM, Odermatt B, Kelm J, et al. *Ann Thorac Surg* 2006;82:1465-71
- 26 L'Heureux N, McAllister TN, de la Fuente LM. Tissue engineered blood vessels for arterial revascularization. *N Engl J Med* 2007;357:1451-53
- 27 Kucia M, Halasa M, Wysoczynski M, Baskiewicz-Masiuk M et al. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood. *Leukemia* 2007; 21:297-303.
- 28 Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Machalinski B, Kucia M. J Appl Genet. Bone Marrow derived stem cells-our key to longevity ?. *J Appl Genet* 2007; 48:307-319
- 29 Zuba-Surma EK, Kucia M, Andel.Latif A, et al. Morphological characterization of very small embryonic-like stem cells (VSELs) by image stream system analysis. *J Cell Mol Med* 2008; 12:292-303
- 30 McGuckin CP, Forraz N. *Cell. Prolif.* 2008; 41(suppl1):31-40.
- 31 Kögler 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; 200:125-135
- 32 Kögler G, Sensken S, Wernet P. Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from umbilical cord. *Exp Hematol* 2006; 1589-1595
- 33 Fallahi-Sichani M, Soleimani M, Najafi SM, Kiani J, Arefian E, Atáís A. *Cell Biol Int* 2007;31:299-303
- 34 Sensken S, Waclawczyk S, KnauppAS, TrappT, EnczmannJ, Wernet P, Kögler G. In vitro differentiation of human cord blood-derived unrestricted somatic stem cells towards an endodermal pathway. *Cytotherapy* 2007; 9:362-378.
- 35 Chan SL, Coi M, Wnendt S, Krauz M, Teng E, Leong HF, Merchav S. *Stem Cells* 2007; 25:529-536.
- 36 Perez-Oteyza J, Bornstein R, Corral M, et al. Controlled-rate versus uncontrolled-rate cryopreservation of peripheral blood progenitor cells: A prospective multicenter study. *Haematologica* 1998;83:1001-1005.
- 37 Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberry PJ. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Am J Hematol* 2007;82:463-472.

- 38 Ramos Oliva P, Ramos Oliva ML, Larrea L, Roldan E, Garcia Laraña J, Perez-Oteyza J. Removal of dimethylsulfoxide prior to reinfusion of frozen-thawed leukaphereses products does not preclude engraftment. *Bone Marrow Transplant* 2007;37(sup1):182
- 39 Broxmeyer HE, Srour EE, Hangoc G, Cooper S, Anderson SA, Bodine DM. High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:645-650.
- 40 Gunetti M, Ferrero I, Rusticheli D, et al. Refreezing of cord blood hematopoietic stem cells for allogeneic transplantation: In vitro and in vivo validation of a clinical phase I/II protocol en European and Italian Good Manufacturing Practice conditions. *Exp Hematol* 2008:235-243.
- 41 Shirvaikar N, Reza R, Jalili A, et al. CFU-megacaryocytic progenitors expanded ex vivo from cord blood maintain their in Vitro homing potential and Express matrix metalloproteinases. *Cytotherapy* 2008; 10:182-192.
- 42 Madkaikar M, Ghosh K, Gupta M, Swaminathan S, Mohanty D. Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells using different combinations of cytokines and stromal cells. *Acta Haematol* 2007; 118:153-159.
- 43 Astori G, Largherro J, Bonfini T, et al. Ex vivo expansion of umbilical cord blood CD34 cells in a closed system: a multicentric study. *Vox Sang.* 2006;90:183-190.
- 44 Rizo A, Dontje B, Vellenga E, de Haan G, Schuringa JJ. Long-term maintenance of human hematopoietic stem/progenitor cells by expression of BM11. *Blood* 2008;111:2621-30.
- 45 Robinson SN, Ng J, Niu T, et al. Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant.* 2006:359-366.