

ALFA Y OMEGA DE LAS CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

Julio Roberto Cáceres-Cortés*

RESUMEN

Durante varios años la separación de las células madre hematopoyéticas, a partir de la médula ósea humana, fue técnicamente difícil en hematología experimental. Su aislamiento y caracterización de fuentes alternas como el cordón umbilical y sangre periférica son ahora el común denominador de varios proyectos de investigación de vanguardia. En esta monografía se sintetizan algunos aspectos importantes sobre la naturaleza de las células madre hematopoyéticas tales como su origen, su potencial proliferativo, la presencia de inhibidores intracelulares de la proliferación y su capacidad de repoblación total de la hematopoyesis. También se discuten en el presente trabajo la influencia y acción de diferentes factores de crecimiento hematopoyético, en la inhibición de la apoptosis o muerte celular programada, la proliferación, la diferenciación, la movilización hacia sangre periférica y el mantenimiento *in vitro* de las células madre y sus subsecuentes progenitores. Se dan evidencias sobre la baja frecuencia y el estado de latencia, como dos importantes características limitantes en el estudio de las células madre hematopoyéticas CD34⁺. Finalmente, el aislamiento y purificación de células madre hematopoyéticas a partir de fuentes alternas como la sangre periférica y el cordón umbilical se ponen a discusión.

Palabras clave: células madre hematopoyéticas, células CD34⁺, factores de crecimiento hematopoyéticos.

ABSTRACT

For years, isolation of human hematopoietic stem cells from bone marrow was considered a puzzle in experimental the hematology. Now these cells are target of different kind of experiments around the world, and their isolation and a characterization from other sources, such as umbilical cord and peripheral blood, are a common factor in many research projects. In this review, i have synthesized some important aspects of the nature of hematopoietic stem cells, such as like their origin, proliferative potential, presence of intracellular proliferative inhibitors and reconstitution capacity of total hematopoiesis. The influence and action of different hematopoietic growth factors on the inhibition of apoptosis or programmed cell death, proliferation, differentiation, mobilization toward peripheral blood, and *in vitro* maintenance of stem cells and subsequent progenitors are also discussed. Evidence is given that rarity and quiescence are two important limiting characteristics in the study of CD34⁺ hematopoietic stem cells. Finally, isolation and purification of hematopoietic stem cells from peripheral blood and umbilical cord are also discussed.

Keywords: hematopoietic stem cells, CD34⁺ cells, hematopoietic growth factors.

FECHA DE RECEPCIÓN 30 DE MAYO DE 1997, FECHA DE ACEPTACIÓN 18 DE AGOSTO DE 1997.

INTRODUCCIÓN

ORIGEN DE LAS CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

La sangre humana está compuesta por varios tipos de células que ejecutan diversas funciones en el organismo. Los eritrocitos transportan el oxígeno; las plaquetas controlan la coagulación sanguínea; los linfocitos, monocitos y granulocitos intervienen en la defensa inmunitaria contra cuerpos extraños como bacterias y virus. Todas estas células son generadas en forma sorprendente a partir de una misma célula, la célula madre hematopoyética^{1,2}; ésta tiene la capacidad de autorrenovarse y dar origen a precursores hematopoyéticos, los cuales proliferan y se diferencian repetidas veces dando lugar a células maduras con

cualidades reducidas de proliferación. Únicamente los macrófagos, células cebadas y linfocitos conservan la capacidad de dividirse en la madurez^{3,4,5} (Fig 1).

Durante el desarrollo del embrión humano, las primeras células madre hematopoyéticas aparecen en el saco vitelino, luego migran al hígado y de ahí a la médula ósea por el torrente circulatorio. La migración es una propiedad de estas células y está mediada por factores quimioattractantes presentes en los sitios de destino. En estado embrional las células hematopoyéticas poseedoras del receptor c-Kit siguen un gradiente del Factor de la Célula Madre (*Stem Cell Factor*, SCF) o ligando de Kit de tipo membranal expresado por los fibroblastos, que actúa como centro de atracción. Este fenómeno conocido como haptotaxis dirige la migración igualmente de

*UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER, FES ZARAGOZA, UNAM.

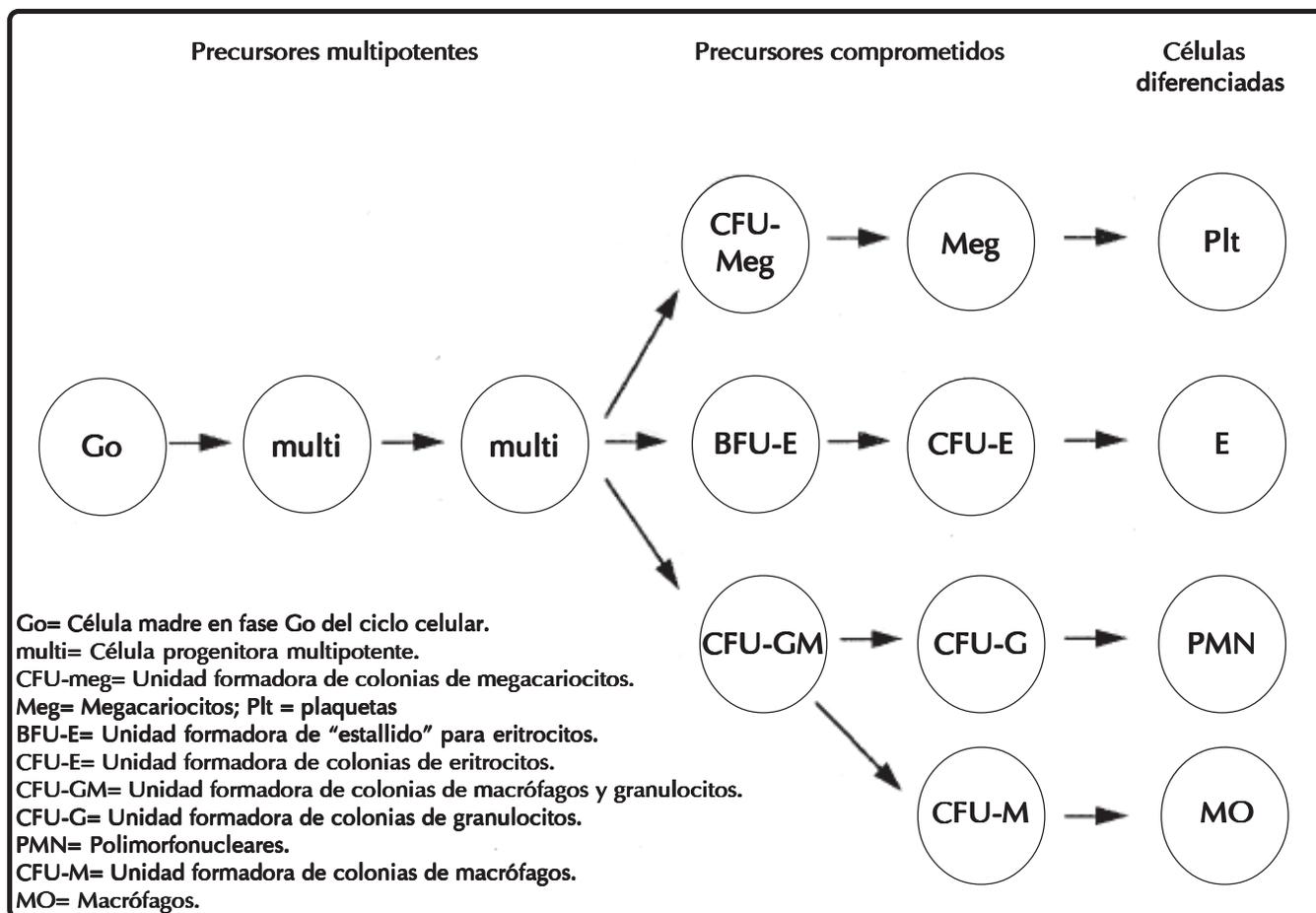


Fig 1. Diagrama jerárquico de la hematopoyesis mostrando únicamente la diferenciación de la rama mieloide.

las células germinales y melanocitos⁶. Se asumía que las células hematopoyéticas en estado adulto, permanecían indiferenciadas y dentro de la médula ósea, las cuales conforme adquirían la madurez salían a la circulación. Incluso la expresión del antígeno CD34, otorgaría residencia permanente dentro del microambiente medular. Pero recientes observaciones indican que las células CD34⁺ están presentes en la sangre periférica, y que conservan su capacidad de repoblar y reconstituir la hematopoyesis⁷. Esto hizo cambiar el concepto de residencia de las células madre hematopoyéticas.

Actualmente se sabe de la existencia de otras fuentes de células hematopoyéticas CD34⁺ como el hígado fetal y el cordón umbilical, cuya capacidad de autorrenovación y formación de nueva sangre está en investigación. Se considera que la célula madre hematopoyética proveniente de cualquiera de estas fuentes tiene inherente la capacidad de producir dos células con cualidades diferentes, una de estas células continúa su diferenciación ulterior y la otra permanece siendo pluripotencial. La célula madre hematopoyética humana más primitiva que ha permanecido por mucho tiempo siendo un misterio, ahora está por convertirse en una realidad. La purificación de la célula madre puede hacerse por selecciones positivas de células portando ciertos antígenos (CD34, Thy-1) combinando con

selecciones negativas para los antígenos de diferenciación (CD38, CD13, etc.). Las células CD34⁺ primitivas en su conjunto no están constituidas por una población homogénea, sino que reagrupan diferentes subpoblaciones teniendo potenciales de proliferación y diferenciación variables para producir los progenitores linfo-mieloides⁸. El ensayo original para detectar células madre es el ensayo de formación de colonias en bazo al día 12 (CFU-S)⁹. Por muchos años las CFU-S se consideraron equivalentes a las células madre. Pero esto ha sido cuestionado últimamente¹⁰. Estos trabajos publicados han demostrado que aunque los progenitores reconstituyentes de la hematopoyesis a largo y corto plazo tienen actividad de CFU-S, la mayoría de los CFU-S de día 12 son progenitores transitorios¹¹. La célula madre más primitiva usualmente tiene una actividad pre-CFU-S¹². Son demasiado primitivas como para formar colonias al día 12, pero dan lugar a progenitores que pueden hacerlo.

LA CÉLULA MADRE ES UNA CÉLULA EN REPOSO CON UN ENORME POTENCIAL DE PROLIFERACIÓN Y DE DIFERENCIACIÓN
 Las células madre son escasas, en promedio 1 por cada 10,000 entre las células mononucleares de la médula ósea, y a pesar de ser el origen del sistema celular más proliferativo, permanecen la mayor parte del tiempo sin dividirse. Este estado quiescente o de latencia protege el patrimonio genómico de posibles accidentes

durante la división celular. La escases y la quiescencia han sido dos dificultades importantes en el estudio de estas células.

Observando el sistema equilibrado a que dan lugar las células madre hematopoyéticas, se podría pensar que están programadas para la diferenciación. Sin embargo, la orientación de la célula madre hacia un linaje determinado parece ser operado de manera aleatoria, es decir estocástica, según la teoría de Till y McCulloch⁹ teoría bien detallada por las experiencias de M. Ogawa¹⁰. Los estudios de M. Ogawa sobre *células blásticas formadoras de colonias*, demostraron que éstas células puede dar lugar a linajes celulares muy diferentes, por ejemplo una célula hija da lugar a macrófagos y granulocitos mientras que la otra a megacariocitos y eritrocitos inclusive una sola célula, observaron ellos, puede dar lugar a cinco colonias celulares diferentes.

Parece difícil creer que un sistema tan ordenado pueda obedecer a las leyes de probabilidad. Morrison y Weissman⁸, han podido predecir el potencial de autorrenuevo de progenitores multipotentes basándose en la expresión de marcadores de superficie. Para ellos eso habla de un modelo determinístico: el autorrenuevo está determinado por factores intrínsecos. Estas células son poblaciones que representan un *linaje de progenitores multipotentes* constituido por un continuo que va desde las formas más primitivas hasta las más diferenciadas. Pero si la probabilidad es el origen de ciertas opciones durante la diferenciación, la evidencia de regulaciones internas en los progenitores explicaría la homeostasis existente. B. Panterne, ha demostrado un retrocontrol en monocitos maduros sobre sus progenitores¹⁴.

El retrocontrol se realiza por medio de un factor de crecimiento, el factor estimulante de la formación de colonias de macrófagos (*macrophage colony-stimulating factor* M-CSF o CSF-1) secretado por los monocitos maduros, que controla negativamente su receptor sobre los precursores mielomonocitarios. Este retrocontrol disminuye la producción de los monocitos en beneficio de los granulocitos.

El grupo de A. W. Burgess sugirió la existencia de una jerarquía de los diferentes factores estimuladores de colonias (*colony-stimulating factors* (CSFs)) e interleucinas en el retrocontrol de la expresión de receptores en los progenitores¹⁵. Este control puede ejercerse sobre el propio receptor de la citocina (*down-regulation*) o sobre el receptor de otra citocina (*down-modulation*). Vemos que, si la teoría estocástica postula un mecanismo aleatorio de la diferenciación, existen sin embargo mecanismos de regulación que actúan sobre los progenitores derivados de ésta célula. Por lo

tanto, conviene tomar con cautela las diferentes teorías sobre la diferenciación de la célula madre.

La interpretación de ciertas experiencias puede ser modificada ulteriormente a la luz de nuevos resultados. Es así como los resultados de algunos experimentos de D. Metcalf, explicados por el autor en términos deterministas¹⁶, pueden actualmente ser reinterpretados por mecanismos de retrocontrol parecidos a los descritos¹⁷.

INHIBIDORES INTERNOS Y EXTERNOS PARA CONTROLAR LA PROLIFERACIÓN DE LA CÉLULA MADRE

Ante la ineficacia de la mayoría de los moduladores biológicos para sacar a la célula madre de la fase de quiescencia Go, se ha buscado la posibilidad de que éste estado sea mantenido por inhibidores extracelulares o por factores de control negativo intracelular. Se conocía ya la existencia de algunos inhibidores de la hematopoyesis como el TGF- β (*transforming growth factor*- β), el MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein-1 α*), el TNF (*tumor necrosis factor*), el INF γ (*interferón gama*)¹⁸ e igualmente a los genes supresores de tumores. Desarrollando oligonucleótidos antisentido para los inhibidores y para los genes supresores de tumores, es posible estudiar la función de ciertos genes que mantienen a la célula madre en estado de quiescencia.

Esta estrategia permite controlar la salida de la fase Go de células CD34⁺ CD38⁺ pertenecientes al compartimiento de la célula madre y permitirles dividirse *in vitro*¹⁹. En efecto, bloqueando la expresión de inhibidores como el TGF- β o el producto de genes supresores de tumores como el gen Rb (retinoblastoma), se ha logrado activar progenitores más indiferenciados que aquellos cultivados con la más óptima combinación de citocinas.

Con ayuda de cultivos de células aisladas provenientes del compartimiento de la célula madre, se ha logrado demostrar que en presencia de oligonucleótidos antisentido de TGF- β se bloquea la producción autócrina de este inhibidor. La célula madre contiene entonces la maquinaria necesaria para mantenerse en estado de quiescencia¹⁹. La estrategia de oligonucleótidos antisentido para los inhibidores o genes supresores, ha permitido igualmente evaluar el potencial hematopoyético de células primitivas con diferentes grados de diferenciación.

L. Terstappen y colaboradores postularon, que el compartimiento de la célula madre está incluido en la subpoblación CD34⁺ CD38⁺ y que la población de células CD34⁺ CD38⁺ HLD DR- de la médula ósea fetal contiene una célula madre capaz de diferenciarse no solamente hacia los linajes linfo-mieloides sino que también hacia células estromales²⁰. J. Hatzfeld, ha demostrado que las células

CD34⁺ CD38⁻ y no las células CD34⁺ CD38⁺ son activadas por el oligonucleótido antisentido de TGF- β ¹⁹, y que el compartimiento de la célula madre es capaz de producir este inhibidor de la proliferación en lugar de las células estromales.

El cultivo *in vitro* que más se acerca al estado fisiológico es el crecimiento de células madre sobre células estromales²¹. El estroma es una capa de células adherentes que pueden crecer *in vitro* a partir de tejidos hematopoyéticos y que producen factores necesarios para la hematopoyesis (Fig 2).

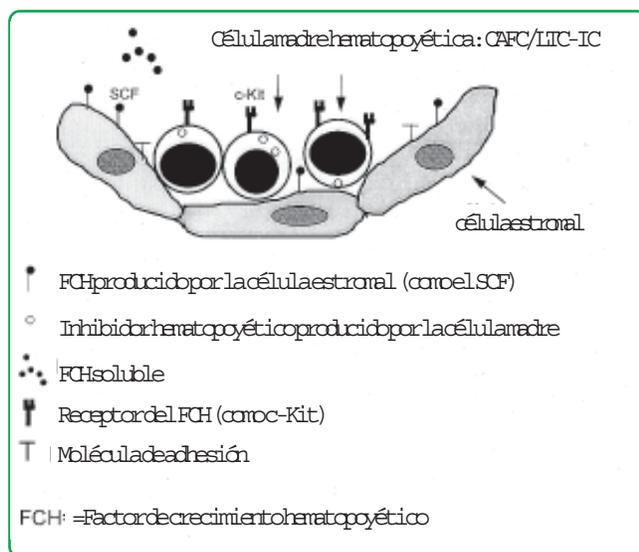


Fig 2. Esquema mostrando la interacción celular entre las células madre hematopoyéticas y el estroma.

De esta manera se establece una área cubierta por células en forma adoquinada (*cobble-stone area forming cell*, CAFC) la cual es un patrón microscópico detectable que forman las células madre sobre las células estromales²². Recientemente se ha comprobado que existe una alta correlación entre las células capaces de iniciar cultivos a largo plazo (*long-term culture initiating cell*, LTC-IC) con las células que forman CAFC²³. Las células madre pueden ser cultivadas tanto en medios líquidos como semisólidos en ausencia del soporte dado por células estromales. Varias combinaciones de citocinas han sido utilizadas en tales cultivos para mantener y promover la proliferación de las células madre. Pero desafortunadamente, ninguna combinación de citocinas ha sido identificada capaz de promover una expansión significativa o el mantenimiento a largo plazo de las células madre en tales cultivos. La autorrenovación y la diferenciación de las células madre no concuerda con lo encontrado *in vivo*⁸. Probablemente la utilización de oligonucleótidos antisentido de inhibidores de la hematopoyesis sea una buena estrategia en la expansión de células madre.

MOVILIZACIÓN, MANTENIMIENTO Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

El sistema jerárquico de la hematopoyesis es congruente con la acción de factores de crecimiento en diferentes puntos a todo lo largo de la cascada de diferenciación. Un dogma previo sostenía que tanto el G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*), el M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) y la eritropoyetina eran selectivamente activos sobre granulocitos, macrófagos y eritrocitos respectivamente, mientras que el GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), interleucina-1 (IL-1), IL-3, e IL-6 actuaban sobre células madre multipotentes. Aunque esta aseveración puede ser cierta, recientes datos demuestran que muchos factores de crecimiento actúan en varios puntos durante la diferenciación.

La utilización de citocinas en el ser humano como G-CSF, GM-CSF y el factor de la célula madre (*Stem Cell Factor*, SCF) o factor Steel (*Steel factor*, SF) induce la movilización de células CD34⁺ de médula ósea hacia la sangre periférica²⁴. Ellas pueden ser recobradas por nuevas técnicas de enriquecimiento para dicha población y mantenidas *in vitro*, en presencia de cocteles de citocinas. Por otra parte, a diferencia de lo que ocurre *in vivo*, las células CD34⁺ cultivadas *in vitro* en presencia de GM-CSF tienden a diferenciarse. Surge la pregunta, ¿es posible mantener las células CD34⁺ en proliferación *in vitro* sin diferenciarse? Recientes observaciones²⁵ indican que el SCF inhibe la apoptosis o muerte celular programada de las células hematopoyéticas y que puede mantener vivas las células CD34⁺ sin inducir diferenciación²⁶ y expandirlas con la coestimulación de interleucina-1 β (IL-1 β), IL-3, IL-6 y eritropoyetina (EpO)²⁴. Para la realización de estudios en trasplante, la utilización del SCF podría ser vital en el mantenimiento de estas células *ex vivo* en un estado no diferenciado.

En la actualidad es cada vez más usado el trasplante de sangre periférica con células madre movilizadas, en comparación con el trasplante de médula ósea, dado sus más bajos costos y su más fácil manejo. Por otra parte, es sabido que la sangre periférica contiene *per se* progenitores CD34⁺ CD33⁻ circulantes diferentes a las células pluripotenciales CD34⁺ CD33⁻ de médula ósea, observándose una diferenciación inicial. La utilización de citocinas para movilizar progenitores hematopoyéticos más primitivos a la sangre periférica garantiza que se encuentren en mayor proporción.

En relación a la capacidad de ciertas citocinas de influir en el estado de diferenciación de las células madre hematopoyéticas, se cree que la expresión coordinada de genes linaje específicos en las células hematopoyéticas en proliferación está mediada en parte por la activación o supresión de factores de transcripción. El transactivador GATA-1 es un ejemplo de ellos que se encuentra restringido a los linajes eritroide, megacariocítico y de células cebadas²⁷. Es posible que *in vitro* el SCF no active los factores de transcripción necesarios para la diferenciación de células CD34⁺ y en cambio el GM-CSF induzca la activación de estos factores.

EL CORDÓN UMBILICAL: ALTERNATIVA EN EL TRASPLANTE SANGUÍNEO

Con más frecuencia la sangre de cordón umbilical es más utilizada para ser trasplantada en niños. Sin embargo, es importante conocer también las condiciones de trasplante de sangre de cordón umbilical a un adulto. Se han hecho estudios comparativos¹⁹ entre el potencial hematopoyético de la sangre de cordón umbilical y el potencial de médula ósea. En esos estudios las células purificadas CD34⁺ CD38⁻ de sangre de cordón y de la médula ósea, proliferaron en medio líquido a largo plazo bloqueando la producción autócrina de TGF- β para permitir un máximo desarrollo del compartimiento de la célula madre. Este desarrollo fue evaluado cada semana tomando una alícuota del cultivo y sembrándola en cultivos semisólidos secundarios con el fin de determinar la producción de los diferentes progenitores. Luego de siete semanas de cultivo en líquido, la producción total de diferentes tipos de progenitores (BFU-E: *burst forming unit erythroid*; CFU-GM: *colony forming unit-granulo-monocytes*) en la sangre de cordón se reveló significativamente superior comparada con la de médula ósea²⁸.

Debido al grado de eficiencia en la reconstitución de la hematopoyesis, su bajo grado de rechazo contra injerto y su superior potencial comparado con el de médula ósea hacen del cordón umbilical una buena alternativa en el trasplante sanguíneo en malignidades hematológicas y no hematológicas.

PERSPECTIVAS Y CONCLUSIONES

Los resultados antes expuestos aportan una prueba suplementaria: el compartimiento de la célula madre está constituido por células heterogéneas teniendo potenciales hematopoyéticos diferentes. Sin duda alguna en el futuro será necesario definir las subpoblaciones de células madre, como se han definido las subpoblaciones de las células T o de macrófagos.

Actualmente, uno de los objetivos es obtener células madre que permitan crear fácilmente almacenes de ellas. La sangre proveniente de cordón umbilical se ha revelado como una buena alternativa para la creación de estos bancos de células madre. Las ventajas de la sangre de cordón umbilical es su disponibilidad en México y su más fácil obtención a diferencia de la médula ósea.

Pero aún quedan problemas por resolver: (a) ¿será necesario congelar bolsas de sangre de cordón o podremos hacer bancos de células madre CD34⁺ y que puedan ser congeladas en viales de 1.5 ml?; (b) ¿será necesario trasplantar las células madre purificadas con ciertas subpoblaciones celulares que favorezcan la destrucción de células malignas (fenómeno de *graft versus leukemia* GVL) sin provocar el fenómeno de rechazo contra injerto (*graft versus host* o GVH)?; (c) ¿se podrá activar solamente una parte de las células madre o asociarlas a progenitores más maduros para acelerar el éxito del trasplante? ¿Cuál será el papel de las citocinas en éste caso?; (d) además dentro de las finalidades de muchos proyectos de investigación,

la célula madre es una candidata de opción para la terapia génica de las enfermedades genéticas, el cáncer y el SIDA; en estos casos ¿se podrán sacar de la fase G0 las células madre purificadas, activarlas para practicar la transferencia del gen, y después regresarlas a la fase de quiescencia para impedir que se diferencien?

En la última década, se comenzó a estudiar la posibilidad de purificar la célula madre para utilizarla con fines clínicos, comprendida la terapia génica, y el proyecto parecía utópico para muchos. Ahora, esos proyectos se han convertido en una realidad en numerosos centros de trasplante. Es probable que, en los próximos años, la realidad rebase a los viejos mitos subyacentes de la célula madre.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a la Dra. Trang Hoang jefa del Laboratory of Hemopoiesis and Leukemia del IRCM de Montreal, Canadá, al International Council for Canadian Studies, a la Universidad de Montreal y al Dr. Benny Weiss, jefe de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de FES-Zaragoza, UNAM, por el financiamiento y apoyo recibido para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Orkin SH. Hematopoiesis: How does it happen? *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7:870-877.
2. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem cell population. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:2804-2808.
3. Robinson BE, Quesenberry PJ. Hematopoietic growth factors. Part I. *Amer J Med Sci* 1990; 300:163-70.
4. Robinson BE, Quesenberry PJ. Hematopoietic growth factors. Part II. *Amer J Med Sci* 1990; 300:237-44.
5. Robinson BE, Quesenberry PJ. Hematopoietic growth factors. Part III. *Amer J Med Sci* 1990; 300:311-321.
6. Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN. The kit ligand, Stem Cell Factor. *Adv Immunol* 1994; 55:1-95.
7. Brugger W, Heimfeld S, Berenson J, Mertelsmann R, Kanz L. Reconstitution of hemopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated ex vivo. *N Eng J Med* 1995; 333:283-287.
8. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Dev Biol* 1995; 11:35-71.
9. Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L. A stochastic model of stem cell proliferation based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1964; 51:29-36.

10. Jones RJ, Wagner JE, Celano P, Zicha MS, Sharkis SJ. Separation of pluripotent hematopoietic stem cells from spleen colony forming cells. *Nature* 1990; 347:1538-1543.
11. Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1994; 1:661-673.
12. Spangrude GJ, Johnson GR. Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87:7433-7437.
13. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993; 51:29-36.
14. Panterne B, Zhou YQ, Hatzfeld J, Li ML, Lévesque JP, Clark SC, Hatzfeld A. CSF-1 control of c-fms expression in normal human bone marrow progenitors. *J Cell Physiol* 1993; 155:282-289.
15. Walker F, Nicola A, Metcalf D, Burgess AW. Hierarchical down-modulation of hemopoietic growth factor receptors. *Cell* 1985; 43:269-276.
16. Metcalf D. Clonal analysis of proliferation and differentiation of paired daughter cells: action of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on granulocyte-macrophage precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:5327-5330.
17. Panterne B, Hatzfeld A, Zhou YQ, Li ML, Sansilvestri P, Cardoso A, Levesque JP, Ginsbourg M, Batard P, Kiselev S, Hatzfeld J. Contrôles positifs et négatifs du développement des progéniteurs hématopoïétiques: modèles et faits. *Nouv Rev Fr Hematol* 1993; 35:281-283.
18. Guigon M, Lemoine F, Dainiak N, Schechter A, Najman A. The negative regulation of hematopoiesis: from fundamental aspects to clinical applications. Paris: Inserm John Libbey Eurotex, 1993; 229.
19. Hatzfeld J, Li ML, Brown EL, Sookdeo H, Lévesque J-P, O'Toole T, Gurney C, Clark SC, Hatzfeld A. Release of early hematopoietic progenitors from quiescence by antisense transforming growth factor B1 or Rb oligonucleotides. *J Exp Med* 1991; 174:925-929.
20. Huang S, Terstappen LWMN. Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single bone marrow stem cells. *Nature* 1992; 360:745-749.
21. Dexter TM, Moore MAS, Sheridan APC. Maintenance of hemopoietic stem cells and production of differentiated progeny in allogeneic and semiallogeneic bone marrow quimeras in vitro. *J. Exp. Med.* 1977; 145:1612-1616.
22. Ploemacher RE, Van der Sluijs JP, Van Beurden CAJ, Baert MRM, Chan PL. Use of limiting-dilution type long-term marrow cultures in frequency analysis of marrow-repopulating and spleen colony-forming hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood* 1991; 78:2527-2533.
23. Reading C, Tricot G, Dietz I, Schwartz D, Young J, Chen S, Chen B, Feng L, Brown W, Hoffman R. Evaluation of in vitro and in vivo assays of human hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 1994; 22:786 (Abstr.).
24. Sandstrom CE, Bender JG, Papoutsakis ET, Miller WM. Effects of CD34+ cell selection and perfusion on ex vivo expansion of peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 1995; 86:958-970.
25. Cáceres-Cortés JR, Rajotte D, Dumouchel J, Haddad P, Hoang T. Product of the Steel locus suppresses apoptosis in hemopoietic cells. Comparison with pathways activated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Biol Chem* 1994; 269:12084-12091.
26. Cáceres-Cortés SR, Dumouchel J, Hoang T. Steel factor supports the survival of purified CD34+ cells in the absence of cell differentiation. *Blood (suppl.)* 1995; 86: 23 (Abstr.).
27. Shivdasani RA, Orkin SH. The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* 1996; 87:4025-4039.
28. Cardoso AA, Li ML, Batard P, Hatzfeld A, Brown EL, Lévesque J-P, Hatzfeld J. Release from quiescence of CD34+ CD38- human umbilical cord blood reveals their potentiality to engraft adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:8707-8711.