

Recuento de células CD34+ por citometría de flujo

Count of CD34 + cells by flow cytometry

Esteban Jara-Segura ⁽¹⁾, Evan Jensen-Gamboa ⁽¹⁾

⁽¹⁾Laboratorio Clínico Jensen & Suárez; Heredia.

Artículo recibido el 26/04/2018

Aceptado para su publicación el 13/07/2018

Correspondencia: ejara@labjensu.com

Resumen

Los trasplantes de células madre hematopoyéticas (CMH) han sido fundamentales para la restitución de la hematopoyesis en el hombre: esta práctica clínica se ha llevado a cabo desde los años 50, y se ha determinado que el éxito de este procedimiento no solo se asocia con la compatibilidad que debe existir entre el donador y el receptor, también en el número adecuado de células CD34+. Este se ha convertido en el parámetro clínico de mayor importancia.

La citometría de flujo (CF) es el método de elección para la identificación de células CD34+. El protocolo más recomendado es la utilización de plataforma única y evaluación de la viabilidad celular. En este artículo se describen los diferentes procesos; sus ventajas y desventajas, y la forma correcta del análisis con base en los lineamientos de la Sociedad Internacional de Hemoterapia e Ingeniería de Injertos (ISHAGE).

Palabras clave: células madre hematopoyéticas, citometría de flujo, plataforma doble, plataforma única, trasplante de células madre.

Abstract

Hematopoietic stem cell transplantation (CMH) has been fundamental to the restoration of hematopoiesis in man: this clinical practice has been carried out since the 1950s, and it has been determined that the success of this procedure is not only associated with the compatibility that must exist between the donor and recipient, but also with the appropriate number of CD34 + cells. This has become the most important clinical parameter.

Flow cytometry (CF) is the method of choice for the identification of CD34 + cells. The most recommended protocol is the use of a single platform and evaluation of cell viability. This article describes the different processes; their advantages and disadvantages, as well as the correct form of analysis based on the guidelines of the International Society of Hemotherapy and Graft Engineering (ISHAGE)

Key words: stem cell hematopoietic, Cytometry flow, dual platform, single platform, stem cell transplant.

Introducción

El término stem cell (en inglés) o células madre (CM) fue propuesto por primera vez por Till y McCulloch, considerados los pioneros en la implementación de terapias de regeneración de células sanguíneas y trasplantes de médula ósea. Las CM son una población muy diversa, que preservan su capacidad de generar desde diferentes linajes celulares hasta tejidos, y dependiendo de su potencial de diversificación, se pueden clasificar en: totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales, oligopotenciales y unipotenciales ⁽¹⁾.

Las células madre hematopoyéticas (CMH) se originan en la médula ósea (MO) y tienen la capacidad de ser multipotentes, es decir, producen la gran diversidad de células sanguíneas, como eritrocitos y plaquetas, así como células de nuestra inmunidad innata y adaptativa (células linfoides y mieloides) ⁽²⁾.

Las CMH poseen marcadores celulares específicos como los antígenos CD34, el receptor FLT3 y el antígeno THy. El antígeno CD34 es una glicoproteína de membrana que, en comparación con los mencionados, está más relacionada con las CMH, lo cual se ha demostrado incluso en cultivos celulares de unidades formadoras de colonia, por lo que se considera el estándar de oro. Esta proteína se expresa en etapas iniciales de la diferenciación sanguínea manteniéndose aún en los precursores linfoides y mieloides para luego dejar de expresarse cuando el precursor entra en una etapa de diferenciación más comprometida (Figura 1) ^(3, 4, 5).

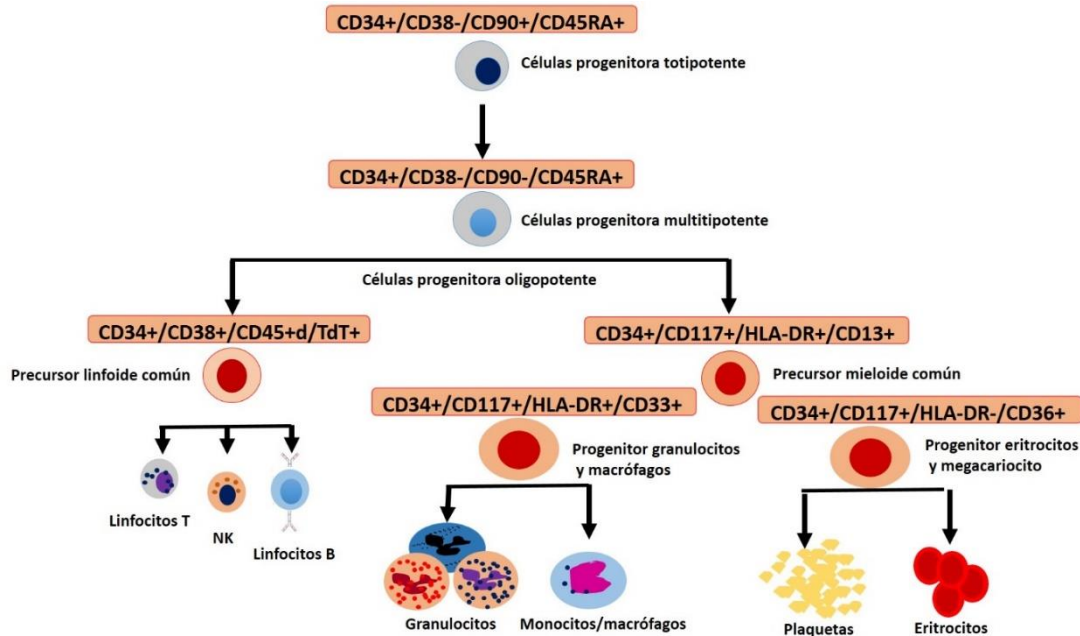
Gracias a su capacidad multipotente, las CMH se usan en trasplantes con el objetivo de sanar, reemplazar o renovar tejidos dañados y este procedimiento se conoce como trasplante de células precursoras hematopoyéticas (TCMH) ^(6,7).

Entre los tipos de trasplantes para CMH los más utilizados son los autólogos y alogénicos. Los trasplantes alogénicos se realizan con mayor frecuencia en casos de leucemias agudas (linfoide y mieloide), linfomas no Hodgkin y síndromes mielodisplásicos, mientras que los autólogos se indican usualmente en mieloma múltiple y en linfomas de cualquier tipo ⁽⁷⁾.

Las CMH pueden ser recolectadas en MO, también se pueden obtener a partir de cordón umbilical o de sangre periférica (SP). Actualmente se utilizan con mayor frecuencia las CMH obtenidas de sangre periférica, ya que a pesar de representar únicamente de 0,1% a 0,01% de la celularidad total, existen procesos de movilización de estas células de la MO a SP mediante el uso de citoquinas y de quimioterapia, logrando inclusive una mayor recolección de estas células. También se ha demostrado que existe una menor contaminación de células tumorales en este producto, el tiempo de reconstitución hematopoyética es más rápido, la obtención es menos traumática y además se considera un producto de manejo más fácil para procedimientos *ex vivo* ^(4, 5, 7, 8).

El éxito del TCMH aparte de la compatibilidad entre donador y receptor (en el caso de trasplantes alogénicos) se debe a la cantidad de células madre viables y por esta razón es necesario realizar ensayos para cuantificar las CMH en todo producto recolectado ⁽⁹⁾.

Figura 1. Las células madre hematopoyéticas poseen la capacidad de autorrenovación y potencial de generar todos los diversos linajes hematológicos. Durante la diferenciación primero pierden la capacidad de autorrenovación, posteriormente se van comprometiendo a la formación de cierto linaje maduro. Durante este proceso la expresión de proteínas va cambiando y genera poblaciones con diferente fenotipo.



En el pasado se asumía que un alto conteo de glóbulos blancos en sangre periférica era un buen indicio de que se podría efectuar una adecuada recolección de CMH, sin embargo, se ha comprobado que no hay una correlación directa entre ellos ⁽¹⁰⁾. Otra forma de evaluar el injerto es mediante ensayos de unidades formadoras de colonias (UFC), pero son ensayos tediosos que requieren equipos específicos y se necesitan períodos entre 10 y 14 días para ser interpretados ^(4, 11).

Mediante la determinación de CD34⁺ por citometría de flujo (CF) se han obtenido recuentos semejantes a los obtenidos en ensayos de UFC, en tiempos menores y se considera un método más sencillo, lo cual permite la toma de decisiones clínicas de forma urgente para enfrentar fallas hematopoyéticas. Esto ha permitido que el recuento de células de CD34⁺ por medio de CF sea la técnica de selección para evaluar la efectividad de este tipo de procedimientos ^(4, 11).

Diversos estudios han comprobado que hay una alta correlación entre el número de células CD34⁺ y el tiempo de recuperación hematopoyética en los pacientes trasplantados. Se ha establecido que para un trasplante exitoso se requieren entre 1,5 a 2 x10⁶ células CD34⁺/kilogramo paciente ^(4, 11, 12).

En casos de movilización de células madre en SP también se ha determinado que un recuento mayor de células CD34⁺ previo a la recolección, predice un alto conteo en el producto (bolsa) por obtener de este mismo tipo de células posterior a la estimulación con quimioterapia y/o citoquinas, logrando un mayor aprovechamiento del proceso ^(4, 10).

La citometría de flujo permite que los resultados sean fácilmente comparables y reproducibles, ya que los datos obtenidos se pueden almacenar en formato digital. Es importante destacar que esta técnica posee una amplia variedad de parámetros para identificar las CMH, entre ellos el uso de diferentes anticuerpos o combinaciones de estos y diversas estrategias de análisis, por lo que se han utilizado distintos protocolos para mejorar la calidad del recuento de células CD34⁺ (4, 9).

Debido a esta variedad de técnicas y a pesar de que, desde 1994, la Sociedad Internacional de Hemoterapia e Ingeniería de Trasplantes (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering ISHAGE) propuso un protocolo para la determinación de CD34⁺, la estandarización internacional no se ha logrado. El presente estudio repasará los principales métodos utilizados y se discutirán con base en nuestra experiencia.

Métodos de recuento de CD34+

Independientemente de la metodología por elegir se debe contar con ciertos requisitos mínimos. Con base en lo propuesto por ISHAGE, se debe procesar una muestra recolectada en un tubo que contenga el anticoagulante EDTA para sangre periférica y ACDA en las muestras que provengan de aféresis con la correcta identificación. En caso de ser necesario, deben ser transportadas a temperatura ambiente (18-22°C) y garantizar que no se hayan congelado o sobrepasado temperaturas mayores a 37°C. Además, es indispensable contar con un citómetro de flujo de tres o más fluorescencias.

Recuento de células CD34+ por doble plataforma

Se le conoce a este ensayo como de doble plataforma debido a que para el conteo absoluto de células CD34⁺ se debe disponer además de un citómetro de flujo, de un equipo de hematología que determine el recuento total de glóbulos blancos y con base en ambos datos obtener el conteo absoluto. Por esta razón, una vez obtenida la muestra se debe obtener el recuento total de leucocitos en primera instancia (4, 9).

La técnica para recuento de CD34⁺ propuesto por ISHAGE inicia con el marcaje de la muestra con CD45 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y CD34 con ficoeritrina (PE). El antígeno CD45 es una proteína encontrada en todos los leucocitos conocido como antígeno panleucocitario, por lo que su uso permite confirmar que los eventos CD34⁺ sean glóbulos blancos y permite discriminar otros eventos como plaquetas, agregados de plaquetas y otros restos que se pueden unir en baja proporción a los anticuerpos CD34 (4).

Se debe tomar en cuenta que ambos anticuerpos deben ser monoclonales. El anti CD45 debe reconocer tanto las isoformas como las distintas glicofomas del antígeno panleucocitario. En cuanto al anti CD34 existen tres distintos grupos según la sensibilidad a neuraminidasa y a ciertas proteasas específicas (grupos I, II y III). ISHAGE recomienda excluir el grupo I debido a que estos anticuerpos no reconocen el antígeno en algunas células provenientes de leucemias y, si se utiliza como conjugado FITC, se debe excluir también el grupo II debido a que sus cargas impiden la adecuada interacción antígeno-anticuerpo; por esta última razón se sugiere utilizar el conjugado PE o efectuar el protocolo con el grupo III (4).

En este método es de utilidad el uso de un control negativo CD45 FITC/ isotipo IgG1 PE que permite diferenciar señales inespecíficas de aquellas producidas por la unión del anticuerpo CD34 y además sugiere titular los anticuerpos por utilizar para conocer la intensidad de cada señal y ajustar la compensación del equipo ^(4, 13).

Debe ser establecido un umbral en el diagrama de puntos con base en la dispersión frontal de la luz (FSC) y la dispersión lateral de la luz (SSC), parámetros que permiten determinar el tamaño y la complejidad de los eventos respectivamente. Es así como se discriminan la mayoría de restos celulares pero no los linfocitos ^(4, 13).

El equipo se debe compensar y calibrar para iniciar la adquisición de los eventos requeridos. La cantidad de muestra por utilizar generalmente es de 100 µl y en los casos donde el recuento de leucocitos sobrepasa los 2x10⁶/µl se recomienda hacer una dilución. La velocidad de adquisición ideal es media o baja, el número de eventos analizados no debe ser menor a 100,000 eventos CD45+ o un mínimo de 1000 eventos de CD34+.

Para el análisis de la población de estudio se recomienda una estrategia que minimice la cantidad de restos celulares y de células maduras a las que puede adherirse los anticuerpos de manera inespecífica. En primer lugar, se selecciona la población basado en un diagrama de puntos con los parámetros CD45 versus SSC con el fin de seleccionar los glóbulos blancos, dejando por fuera los eventos CD45- y los dobletes que pueden ser eliminados utilizando el diagrama de FSC-H/FSC-A. (Figura 2. A y B).

Posteriormente se seleccionan los eventos CD34+ que hayan sido previamente clasificados como CD45+ en un diagrama CD34 versus SSC. Por último, en el diagrama de FSC/SSC se redefine la selección de células CD34+, las cuales se deben reconocer por la presentación de un grupo homogéneo de eventos que se ubican con las características de una célula precursora/célula *stem* con un tamaño igual o ligeramente mayor a los linfocitos pequeños (linfocitos B) y un SSC menor a los monocitos, para finalmente obtener el porcentaje de células CD34+ de todos los eventos analizados (Figura 2. D).

Una vez obtenido el porcentaje de células CD34+ se procede a realizar el siguiente cálculo para obtener la concentración absoluta de CD34+:

$$\frac{\text{Recuento total de leucocitos}}{\mu\text{L}} \times \frac{\% \text{ de CD34} +}{100} \times \text{Factor dilución} = \frac{\text{Células CD34} +}{\mu\text{L}}$$

Recuento de células CD34+ por plataforma única

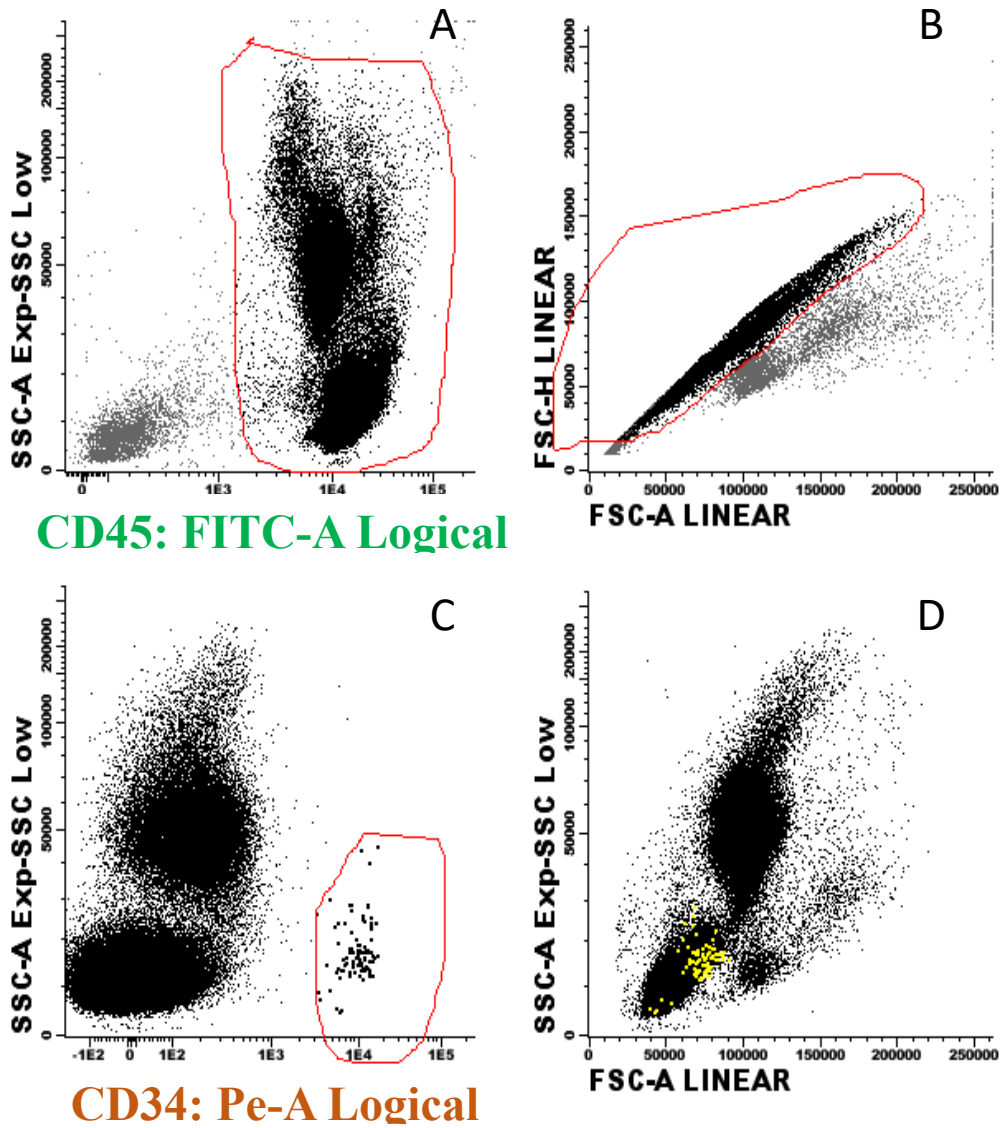
Las técnicas que solo requieran del citómetro de flujo para obtener el conteo absoluto de CD34+ son conocidas como métodos de plataforma única ⁽⁹⁾.

Keeney y colaboradores, propusieron utilizar las guías de ISHAGE modificando el protocolo al agregar microesferas con concentración, tamaño e intensidad de fluorescencia conocida y así determinar el conteo absoluto de células CD34+ ⁽¹³⁾.

Para iniciar este proceso se debe diluir la muestra con el fin de obtener un conteo menor o igual a 2x10⁶ leucocitos/µL. Posteriormente se marcan las células con los mismos anticuerpos mencionados anteriormente (CD34PE y CD45FITC) y se realiza el proceso de lisis eritrocitaria según las indicaciones de los reactivos utilizados con el fin de eliminar los

glóbulos rojos. Finalmente se añade el mismo volumen de esferas que el agregado de la muestra (100 µl).

Figura 2. Identificación de células CD34+ utilizando los anticuerpos CD45 FITC/CD34 Pe; Método plataforma doble.

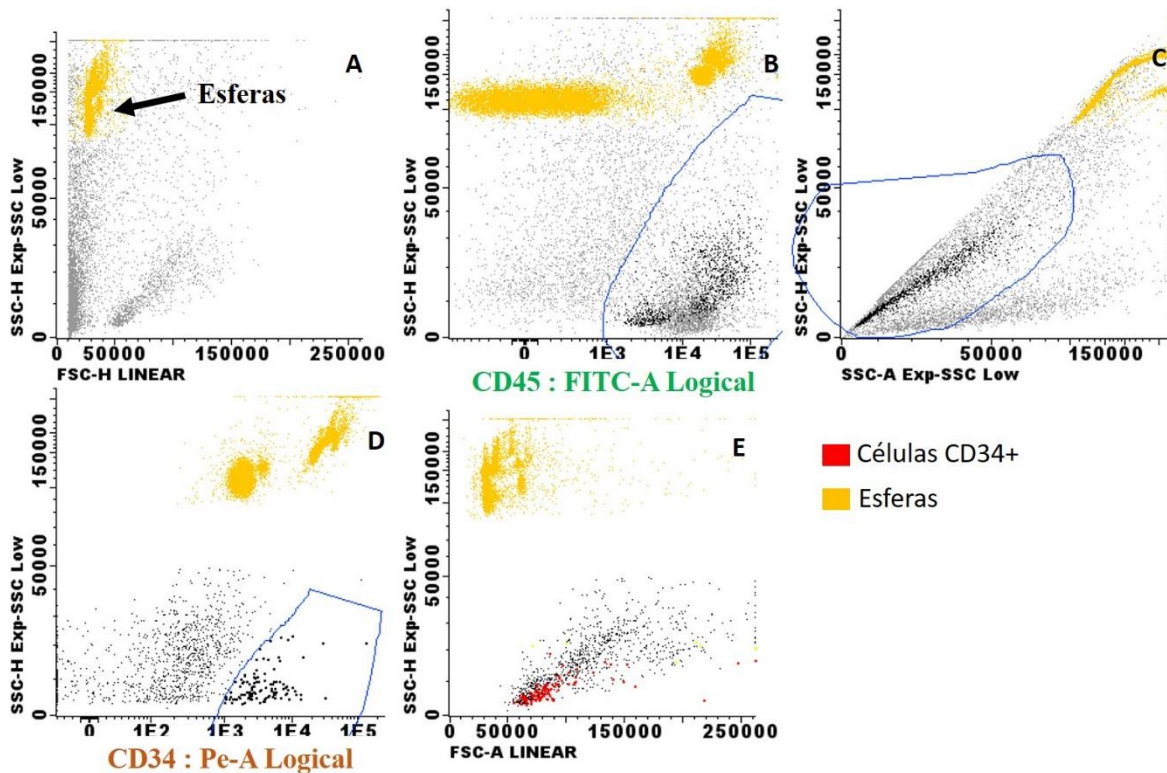


La mayoría de los estudios sugieren no realizar lavados posteriores a la lisis en estos ensayos, pues gracias a la estrategia de selección de la población CD34+ los anticuerpos no adheridos y la hemoglobina libre no interfieren en el conteo absoluto. Además, al no efectuar lavados se evita la pérdida de microsferas y de células poco frecuentes como lo son las CMH⁽¹⁴⁾.

Después de ser compensado y calibrado el citómetro, se recomienda ajustar el FSC de forma que incluya en los histogramas la totalidad de microesferas añadidas a la muestra, tomando en cuenta que poseen menor tamaño que los linfocitos ⁽¹³⁾.

Posterior a la adquisición de eventos se deben, de igual manera, minimizar los restos celulares y señales que no sean propias de leucocitos, siguiendo los mismos pasos que el protocolo de ISHAGE para seleccionar las células CD45+ y CD34+ como se explicó anteriormente (Figura 3 B-E). Además, se debe establecer un diagrama comparativo de FITC vs SSC, de tal manera que se seleccionen los eventos que representan las microesferas (Figura 3 A).

Figura 3. Identificación de células CD34+ utilizando los anticuerpos CD45 FITC/CD34 Pe; Método plataforma única.



Una vez determinado el conteo de células CD34+ y el recuento de microesferas, se determina el conteo absoluto de células CD34+ con base en la concentración de esferas que brinda la casa comercial mediante la siguiente fórmula:

Células CD34+:

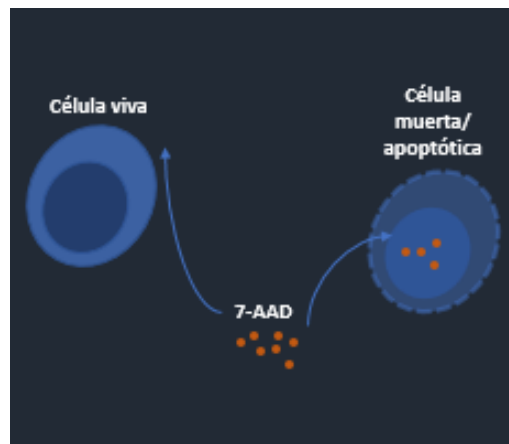
$$\frac{\text{Recuento total de células CD34} \times \text{concentración de esferas} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Recuento total de esferas}}$$

Otros métodos utilizan tubos que contienen *pellets* liofilizados que al disolverse con la muestra liberan una cantidad conocida de microesferas.

Recuento de células CD34+ por plataforma única y viabilidad celular.

Este método varía únicamente del anterior en la adición de 7 amino actinomicina D (7AAD), un colorante químico fluorescente que generalmente se excluye de las células viables que poseen membranas intactas, pero penetra aquellas células muertas o con membranas que han sufrido algún daño. Al ingresar se unen al ADN bicatenario mediante intercalación entre pares de bases en regiones ricas en guanina-citosina (Figura 4). El 7-AAD se puede excitar a 488 nm con un láser de argón que emite a una longitud de onda máxima de 647 nm. Debido a estas características espectrales, el 7-AAD puede usarse en combinación con otros fluorocromos excitados a 488 nm, como FITC y PE.

Figura 4. El colorante 7-AAD logra introducirse en las células que presentan daño en su membrana celular, su propiedad de unión con el ADN y fluorescencia hace fácilmente detectable su señal por medio de la citometría de flujo



La aplicación del 7-AAD reviste vital importancia en lo que respecta a la utilización de células de cordón umbilical, ya que se reporta una reducción del 50% del recuento de células CD34 por microlitro en los recuentos al utilizar este reactivo, evidenciando el gran porcentaje de células no viables y la razón del fracaso en muchos de los trasplantes ^(5, 12) (Figura 5).

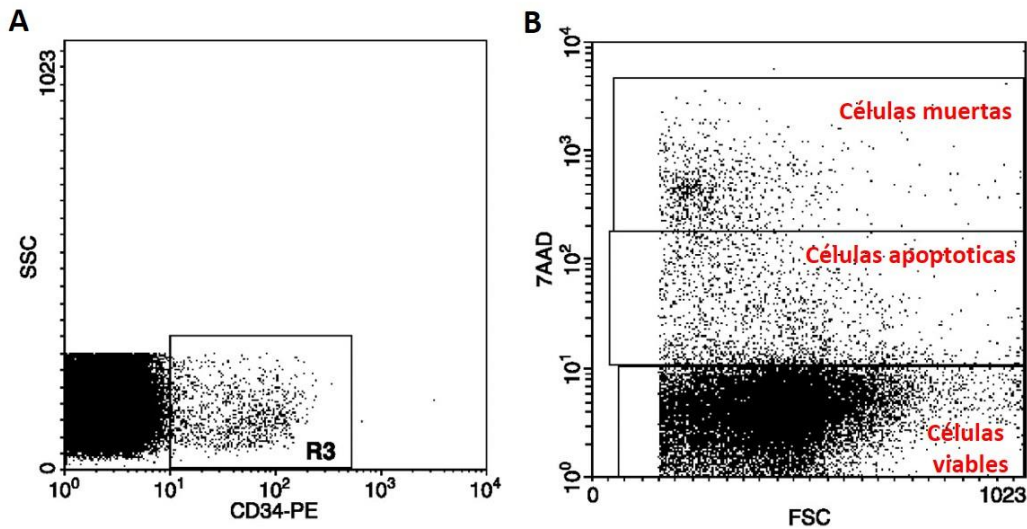
Otra gran utilidad que presenta el 7-AAD en los bancos de cordón umbilical o en cualquier banco de almacenaje de células CD34, es que una vez llegado el momento de la descongelación para su uso, resulta necesario valorar la viabilidad de estas después de la preservación por años ⁽⁸⁾.

En la práctica clínica a nivel mundial se establece la citometría de flujo como el método más confiable, rápido, reproducible y sensible para el recuento de células madre (CD34+) ^(4, 5, 8, 9, 10).

Se ha determinado que los recuentos altos predicen mayores posibilidades de éxito del trasplante y por lo tanto de supervivencia del paciente trasplantado con CMH. Además, por medio de citometría de flujo, se permite asegurar la pureza e impedir, en los productos de CMH, la presencia de células tumorales y otros contaminantes. Entes internacionales, como la Asociación de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés), la Farmacopea Europea

del Consejo de Europa y múltiples estudios sugieren esta técnica para comprobar la seguridad y predecir la efectividad de dichos productos (4, 5, 8-10, 15,16).

Figura 5. A. Diagrama de puntos que muestra la expresión en sangre de cordón umbilical para células CD34. B Las células positivas para CD34 presentan una alta tasa de positividad para 7-AAD lo cual sugiere un gran porcentaje de células no viables en este producto



Conclusiones

En Costa Rica, se utilizan estos productos, posteriores al conteo por citometría de flujo, para el tratamiento de diversas enfermedades hematológicas. Además, según la Autorización para las Terapias Regenerativas con Células Madre Adultas (decreto N° 39986-S), para fines distintos, las células deben ser también completamente caracterizadas y debe existir autorización de los entes encargados, ya que que aún no hay ensayos clínicos que respalden su uso para fines no hematológicos (17).

Los principales hospitales del país realizan el conteo de células madre por CD34. Zumbado y colaboradores efectuaron estudios donde se confirma la efectividad de este proceso (18).

El método de plataforma única posee las ventajas de obviar el recuento de leucocitos eliminando así la introducción de esta variable. Como consecuencia y a diferencia del método de plataforma doble, no se reporta un porcentaje de células CD34+ basados en el total de leucocitos, de células nucleadas o eventos adquiridos, sino que se calculan valores absolutos con base en el uso de microsferas con parámetros conocidos (13).

Otra ventaja repercute en las muestras que poseen pocas cantidades de células CD34+ en las cuales se introduce errores en la aproximación porcentual (redondeo), dato indispensable en plataforma doble para obtener el recuento absoluto, en el caso de plataforma única se excluye esta determinación (19).

La introducción de colorantes químicos para determinar la viabilidad celular surge de la necesidad de eliminar células necróticas cuando se trabaja con muestras de cordón umbilical, médula ósea o productos de aféresis en los cuales se involucrará algún tipo de manipulación (lavados, incubación nocturna o técnicas de preservación) que pueden provocar la muerte celular y por lo tanto disminuir la efectividad del trasplante ⁽⁵⁾.

Independientemente del método utilizado es importante destacar en el proceso de marcaje la técnica “lisado NO lavado” de eritrocitos ya que este procedimiento disminuye la pérdida de células. En caso de técnicas tradicionales el uso de soluciones lisantes con material fijador promueven la adhesión de las células al tubo lo que provoca pérdidas significativas al realizar los lavados y al tratarse de poblaciones que se encuentran escasas, como lo son las CMH, se debe mantener la máxima cantidad de producto posible para su correcto análisis

Nuestra experiencia ha demostrado que el método de plataforma única logra menos variación inter e intralaboratorial ⁽²⁰⁾, lo cual concuerda con el estudio realizado por el grupo de control de calidad NEQAS, No obstante, aquellos laboratorios que requieran implementar la técnica y no posean todos los insumos necesarios para utilizar este protocolo sugerido (ej. microesferas), pueden emplear el método de plataforma doble, ya que hay estudios en los cuales, si bien, se manifiesta que existen leves discrepancias de recuento, no existen diferencias estadísticas significativas, sino alta correlación y compatibilidad, por lo que también es válido ⁽²¹⁾.

Ante los resultados demostrados en diferentes estudios, no se justifica la presencia de centros que manipulen células madre sin la incorporación de la citometría de flujo. Esta técnica garantiza un dato que evidencia la presencia de células CD34+ en los productos y el éxito de los procedimientos en los que se utilizan depende de la viabilidad y de un adecuado número de las mismas.

Referencias

1. Salmen S, Silva N, Bahsas R, Terán G, Barboza L, Padrón K; et al. Células progenitoras pluripotenciales: Características y compartimentos especializados de residencia. *Avances en Biomedicina* 2013 Vol.2, 1, 26-38.
2. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993; 81: 2844-53.
3. Sutherland R, Keating A. The CD34 Antigen: Structure, Biology, and Potential Clinical Applications. *Journal of Hematotherapy* 1992; 1:115-129
4. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Rayash N, Chin Yee I. The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Citometry. *Journal of Hemotherapy* 1996; 5:213-226.
5. Pranke P, Hendrix J, Alespeiti G, Nardi N, Rubinstein P, Visse J. Comparative quantification of umbilical cord blood CD34+ and CD34+ bright cells using the ProCount TM-BD and ISHAGE protocols. *Q Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2006; 39: 901-906
6. Reya T, Morrison S, Clarke M, Weissman L. Stem cells, cancer, and stem cells. *Nature* 2001; 414:105-111.

7. Passweg J, Halter J, Bucher C, Gerull S, Heim D, Rovó A, Buser A, Stern M, Tichelli A. Hematopoietic stem cell transplantation: a review and recommendations for follow-up care for the general practitioner 2012; *Swiss Med Wkly.* 2012;142: w13696.
8. Leuner S, Arland M, Kahl C, Jentsch-Ulrich K, Franke a, Hoffkes HG. Enumeration of CD34-positive hematopoietic progenitor cells by flow cytometry: comparison of a volumetric assay and the ISHAGE gating strategy. *Bone Marrow Transplantation* 1998; 22: 609-706.
9. Ngmoa A, Saito S, Ohto H, Ikeada K, Yasuda H, Kawabata K, Kanno T, Kikuta A, Mochiziki K, Nollet K. CD34+ Cell Enumeration by Flow Cytometry: A Comparison of Systems and Methodologies. *Arch Pathol Lab Med* 2011; Vol 135.
10. Armitage S, Hargreaves R, Samosn D, Brennan M, Kanfer E, Navarrete C. CD34 counts to predict the adequate collection of peripheral blood progenitor cells. *Bone Marrow Transplantation* 1997; 20: 587-591
11. Fukuda J, Kaneko T, Egashira M, Oshimi K. Direct Measurement of CD34+ Blood Stem Cell Absolute Counts by Flow Cytometry. *Stem Cells* 2001; 16:294-300.
12. Deeg H, Klingemann H, Phillips G, Zant G. *A Guide to Blood and Marrow Transplantation.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1999.
13. Keeney M, Gratama JW, Sutherland DR. Critical role of flow cytometry in evaluating peripheral blood hematopoietic stem cells graft. *Journal of Quantitative Cell Science, Cytometry A* 2004; 58: 72-75.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.10103>
14. Gratama JW, Menendez P, Kraan J, Orfao A. Loss of CD34 hematopoietic progenitor cells due to washing can be reduced by the use of fixative-free erythrocyte lysing reagents. *Journal of Immunological Methods* 2000; 239 13–23.
15. Gould D, Kessler D. FDA Regulation of Stem-Cell-Based Therapies. *N Engl J Med* 2006; 355:1730-1735.
16. European Pharmacopoeia. Monograph 2.7.23: Numeration of CD34/CD45 Cells in Haematopoietic Products. *European Pharmacopoeia*, 2007.
17. Decreto Ejecutivo N° 39986-S. *La Gaceta Diario Oficial.* San José, Costa Rica, 8 de noviembre del 2016.
18. Zumbado G, Rodríguez M, Rojas X, Rojas C, Herrera H. Recolección de células madre en sangre periférica mediante aféresis de grandes volúmenes. *Acta Med Costarric.* 2014. Vol 56 (2).
19. Levering W, Preijers F, van Wieringen W, Kraan J, van Beers, Sintnicolaas K; et al. Flow Cytometric CD34+ Stem cell Enumeration: Lesson from nine year's external quality assessment within the Benelux countries. *Cytometry Part A* 2007; 58A: 72-75.
20. Whitby A, Whitby L, Fletcher M, Reilly JT, Sutherland DR, Keeney M, Barnett D. ISHAGE protocol: Are we doing it correctly? *Cytometry Part B.* 2012; 82B: 9–17.
21. Gajkowska A, Oldak T, Jastrzevska M, Machaj EK, Walewski J, Kraszevska E; et al. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells in leukapheresis product and bone marrow for clinical transplantation: a comparison of three methods. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006; 44(1): 53-60.