





UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

*PROPIEDADES DE ADHESIÓN, MIGRACIÓN Y MOTILIDAD DE  
CÉLULAS STEM HEMATOPOYÉTICAS EXPANDIDAS CON  
CITOQUINAS DE ACCIÓN TEMPRANA EN CO-CULTIVO CON  
CÉLULAS STEM MESENQUIMALES*

**ANA MARÍA DEL PILAR PERDDMD ARCINIEGAS**

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Facultad de Medicina

Universidad Nacional de Colombia

Bogotá D.C.

2012



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

*PROPIEDADES DE ADHESIÓN, MIGRACIÓN Y MOTILIDAD DE  
CÉLULAS STEM HEMATOPOYÉTICAS EXPANDIDAS CON  
CITOQUINAS DE ACCIÓN TEMPRANA EN CO-CULTIVO CON  
CÉLULAS STEM MESENQUIMALES*

**Ana María del Pilar Perdomo Arciniegas**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
Doctora en Ciencias Biomédicas

Director:

**Jean Paul Vernot Ph.D.**

Grupo de investigación:

Fisiología Celular y Molecular

Miembros del Comité Tutorial:

**Carlos Parra López M.D. Ph.D**

Universidad Nacional de Colombia

**Professor Christopher Rudd Ph.D**

Universidad de Cambridge, UK

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Facultad de Medicina

Universidad Nacional de Colombia

Bogotá D.C.

2012

*Dedicada a María Camila, mi  
hija, mi fuente de energía vital...*

## Resumen

Las células *stem* hematopoyéticas (CSH) fundamentan el trasplante hematológico. La expansión con citoquinas de CSH altera su capacidad para injertarse en la MO. El co-cultivo de CSH con células *stem* mesenquimales (CSM) optimiza la actividad como injerto de las CSH. Aunque los procesos de adhesión y migración celular son fundamentales para el injerto adecuado de las CSH, el co-cultivo de CSH con CSM no ha sido estudiado desde esa perspectiva. En este trabajo se plantea que las CSM puedan modificar las capacidades adhesivas, migratorias y de motilidad de CSH expandidas con citoquinas. Se estableció un modelo comparativo de CSH expandidas en presencia o ausencia de CSM con una normalización previa de la diferenciación hematopoyética. De esta forma los grupos comparados mantuvieron la expresión de CD34, CD133, Gata-2 y Notch-1, así como su clonogenicidad. Al evaluar los efectos del co-cultivo sobre la migración de CSH se encontró que este favorece la migración mediada por VCAM-1, un sustrato central en la anidación medular de las CSH más primitivas. También el co-cultivo de expansión de CSH con CSM modula la quimiotaxis inducida por agentes combinados en las CSH expandidas con citoquinas. Se demostró que las CSH expandidas con citoquinas tienen una motilidad aumentada y no responden a la inducción migratoria mediada por VCAM-1. Por el contrario, las CSH co-cultivadas se inducen quimiotácticamente y en respuesta a VCAM-1. Las CSM inhiben la inactivación de LFA-1 de las CSH expandidas a través de factores solubles y contacto directo. Esta inactivación afecta la migración de CSH mediada por VLA-4 sugiriendo una regulación cruzada entre estas integrinas. Se encontró que las CSM regulan negativamente la fosforilación de Akt de las células co-cultivadas. Se propone que la expresión de PTEN suprimida por el factor transcripcional Bmi-1 pueda estar involucrada. Estas modificaciones se discuten a la luz de la anidación de CSH a la MO y su impacto en trasplantes.

**Palabras clave:** hematopoyética, mesenquimal, co-cultivo, VCAM-1, migración.

## **Abstract**

Hematopoietic stem cells (HSC) lose their capacity for engraftment during ex-vivo cytokine expansion. It has been shown that mesenchymal stem cells (MSC) improve HSC transplantability; however, the molecular mechanisms responsible for this effect have not yet been completely elucidated. Even though cell migration and adhesion are fundamental processes for HSC engraftment, co-culture of HSC with MSC has not been studied from this perspective. In this work we have established a comparative model of cytokine-expanded HSC in the presence or absence of CSM in which both groups expressed the same levels of CD34, CD133, Gata-2 and Notch-1. Both groups also had the same clonogenic abilities showing a comparable undifferentiated phenotype. In this work we reported that expanding HSC in co-culture with MSC enhanced a vascular cell adhesion molecule (VCAM-1)-dependent pro-migratory phenotype. MSC did not regulate HSC expression of CD49d (VCAM-1 counter-receptor molecule) but did decrease the cytokine-induced HSC VCAM-1-mediated pro-adhesive phenotype. It was demonstrated that cytokine-expanded HSC had an increased motility that was modulated by MSC co-culturing. Akt phosphorylation was downmodulated in HSC by MSC co-culturing, finding that could be correlated with the less motile phenotype and Bmi-1 downmodulation in co-cultured HSC. Co-culture with MSC reduced the expression of the inactive conformation of lymphocyte function-associated antigen (LFA-1) at the HSC uropod, and induced higher expression of an LFA-1 activation epitope. Interestingly, VCAM-1-dependent HSC migration was modulated by targeting this LFA-1 high affinity form, suggesting integrin cross-regulation. VCAM-1-mediated HSC transmigration appeared to favor the more primitive HSC immunophenotype. Our results suggested that co-culture with MSC improves VCAM-1-dependent migration of primitive HSC, which is affected in ex-vivo cytokine-expanded HSC.

**Keywords:** Hematopoietic, mesenchymal, co-culture, VCAM-1, migration.

## **Agradecimientos**

Este estudio fue realizado con la colaboración de los miembros del Grupo de Fisiología Celular y Molecular en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y el apoyo del Instituto Materno Infantil y del Hospital de la Misericordia de Bogotá. La realización de este trabajo fue posible gracias a la contribución de diferentes personas a las que me gustaría agradecerles a continuación:

Al Dr. Jean Paul Vernot quién con su iniciativa y carácter ha guiado el grupo de Fisiología Celular y Molecular y a quién agradezco por generar espacios para la investigación científica dentro de la Facultad. Le agradezco su firmeza manteniéndome enfocada en el desarrollo de este proyecto y la libertad que generosamente me ha dado para proponer y llevar a cabo mis propias iniciativas.

A los actuales miembros del Grupo de Fisiología Celular y Molecular Jorge Luis Galeano y Diego Martínez quienes colaboraron en las etapas finales del desarrollo de este trabajo. A Carolina Gámez por su permanente apoyo y confianza.

A los antiguos miembros del grupo Hernando del Castillo y Carolina Martínez por sus aportes técnicos y científicos en los procedimientos de RT-PCR y purificación celular desarrollados en este trabajo.

A Mónica Cubillos y Paola Ortiz miembros antiguos del grupo y quienes apoyaron labores de organización y desarrollo de proyectos del laboratorio.

Al Dr. Gustavo Salguero por la revisión crítica de uno de los manuscritos producto de este trabajo.

A los donantes de sangre de cordón umbilical y de médula ósea, y a sus padres por consentir su participación en este estudio.

Al Dr. Armando Amador del servicio de Ortopedia del Hospital de la Misericordia por su colaboración en la recolección de muestras de médula ósea. A los médicos de sala de partos del Instituto Materno Infantil que colaboraron en la recolección de las muestras de sangre de cordón umbilical.

A Esperanza Ríos por su colaboración en la logística de la recolección de muestras de sangre de cordón umbilical.

A Rocío Gonzalez por su colaboración y apoyo en el laboratorio.

Al Dr. Robert Balderas de Becton Dickinson por la donación de los anticuerpos antifosfoproteínas y H111 usados en este estudio.

Al Dr. Orlando Chaparro y a Italy Lineros por la donación de la línea celular EAhy926 usada en este estudio.

Al Prof. Christopher Rudd y al Dr. Carlos Parra por sus aportes como parte de mi comité tutorial.

A los Drs. Alison Taylor, Yuning Lu, Kerry Inder y Xin Smith quienes me aportaron conocimientos técnicos y científicos durante mi pasantía en la Universidad de Cambridge y en el Instituto de Investigaciones Médicas de Cambridge.

A los miembros de mi familia, a mi hija María Camila por ser mi impulso y mi alegría. A Andrés, mi compañero, por su amor y apoyo.

A mi madre, María Isabel por sus oraciones y por su poesía. A mi padre, Fernando Augusto por su apoyo irrestricto. A mi hermana María Fernanda, por allanarme terrenos y por darme soporte con su fe en mí.

A mis amigos, por compartir conmigo el camino. A Ximena, por nuestras conversaciones iluminadoras y simplemente por su amistad.

*Propiedades de adhesión, migración y motilidad de células stem hematopoyéticas expandidas con citoquinas de acción temprana en co-cultivo con células stem mesenquimales*

Este trabajo fue financiado por COLCIENCIAS a través de la convocatoria para proyectos de salud (RC401-2006), por la División de Investigaciones de la Sede Bogotá y por el programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional de Colombia. El desarrollo de mis estudios en el programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y mi pasantía en la Universidad de Cambridge fue financiado por el fondo “Doctorados Nacionales COLCIENCIAS-ICETEX” a través de la convocatoria de apoyo a estudiantes de doctorados nacionales del año 2007.

## Contenido

RESUMEN .....	I
ABSTRACT.....	II
AGRADECIMIENTOS .....	III
CONTENIDO.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS .....	X
LISTA DE TABLAS.....	XIV
LISTA DE ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	XV
INTRODUCCIÓN .....	1
<b><u>1. MARCO TEÓRICO.....</u></b>	<b><u>5</u></b>
1.1 LAS CÉLULAS STEM HEMATOPOYÉTICAS.....	5
1.1.1 ONTOGÉNESIS DE LAS CÉLULAS STEM HEMATOPOYÉTICAS.....	5
1.1.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS CÉLULAS STEM Y DE LAS CSH .....	6
1.1.3 CARACTERÍSTICAS PROLIFERATIVAS DE LOS PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS. ....	8
1.1.4 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS CSH .....	9
1.1.5 INMUNOFENOTIPO DE LAS CSH Y PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.....	13
1.1.6 GENES REGULADORES DE LA ACTIVIDAD HEMATOPOYÉTICA.....	17
1.2 ADHESIÓN Y MIGRACIÓN DE CSH DURANTE EL DESARROLLO HEMATOPOYÉTICO. ....	20
1.2.1 CIRCULACIÓN DE CSH EN LA VIDA INTRAUTERINA.....	20
1.2.2 CIRCULACIÓN DE CSH EN LA VIDA POSNATAL .....	23
1.2.3 INTERACCIÓN DE LAS CSH CON LOS OSTEÓBLASTOS .....	26
1.2.4 INTERACCIÓN DE LAS CSH CON LAS CÉLULAS ENDOTELIALES .....	27
1.2.5 INTERACCIÓN DE LAS CSH CON CÉLULAS ESTROMALES Y CSM. ....	28
1.3 CSH COMO SUSTRATO DE TRASPLANTE HEMATOLÓGICO .....	29
1.3.1 TRASPLANTES HEMATOLÓGICOS: MO VS SCU.....	30
1.3.2 EXPANSIÓN DE CSH CON CITOQUINAS Y TRASPLANTE HEMATOLÓGICO .....	31
1.3.3 EXPANSIÓN DE CSH EN CO-CULTIVO CON CSM Y TRASPLANTE HEMATOLÓGICO.....	34
<b><u>2. OBJETIVOS .....</u></b>	<b><u>37</u></b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b><u>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</u></b>	<b><u>38</u></b>
3.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE SCU.....	38
3.2 RECOLECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE DATOS CLÍNICOS. ....	38
3.3 AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN DE CÉLULAS DE BAJA DENSIDAD (FCBD) DE SCU.....	39
3.4 SEPARACIÓN INMUNOMAGNÉTICA DE CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> DE SCU .....	40

3.5	AISLAMIENTO DE CÉLULAS STEM MESENQUIMALES .....	40
3.6	CONGELAMIENTO DE CSM .....	42
3.7	ENSAYOS DE MULTIPOTENCIALIDAD DE CSM .....	42
3.8	EXPANSIÓN DE CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> CON CITOQUINAS DE ACCIÓN TEMPRANA. ....	43
3.9	CONDICIONES DE CO-CULTIVO DE CSM Y CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> O CÉLULAS REH .....	44
3.10	MARCACIÓN DE CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> CON CFSE.....	44
3.11	DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO .....	45
3.12	CONDICIONES DE COSECHA DE LAS CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> CO-CULTIVADAS CON CSM .....	45
3.13	DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	46
3.14	SEPARACIÓN CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO (SORTING) .....	47
3.15	CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS CON PERLAS ESPECÍFICAS (CBA) .....	47
3.16	ENSAYOS DE CLONOGENICIDAD PRIMARIA .....	48
3.17	DISEÑO DE PRIMERS SYBRGREEN Y SONDAS TAQMAN® .....	48
3.18	AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE ARN TOTAL.....	49
3.19	SÍNTESIS DE cADN .....	49
3.20	PCR CUANTITATIVO (SYBRGREEN) .....	50
3.21	PCR CUANTITATIVO (SONDAS TAQMAN®).....	51
3.22	ENSAYOS DE MIGRACIÓN .....	52
3.23	ENSAYOS DE ADHESIÓN .....	53
3.24	DETECCIÓN DE FOSFOPROTEÍNAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO (PHOSPHOFLOW).....	54
3.25	MICROSCOPÍA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA Y CONFOCAL .....	54
3.26	VIDEO-MICROSCOPÍA EN TIEMPO REAL .....	55
3.27	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS .....	55
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
4.1	ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DEL AISLAMIENTO DE CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> .....	57
4.1.1	RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SCU .....	57
4.1.2	PURIFICACIÓN DE CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> CON PERLAS INMUNOMAGNÉTICAS.....	57
4.1.3	OPTIMIZACIÓN DE LA SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS PRE-PURIFICACIÓN .....	58
4.2	AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CSM. ....	62
4.3	EXPANSIÓN DE CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> CON CITOQUINAS DE ACCIÓN TEMPRANA .....	66
4.3.1	EXPANSIÓN A MEDIANO PLAZO DE CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> , EXPRESIÓN DE MARCADORES DE CSH Y ENSAYOS DE CLONOGENICIDAD .....	66
4.3.2	DINÁMICA DE EXPRESIÓN DE CD34 Y CD133 EN CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> EXPANDIDAS A CORTO PLAZO .....	71
4.3.3	EXPRESIÓN DE NOTCH-1, GATA-2 Y BMI-1 EN CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> EXPANDIDAS .....	77
4.4	MODELO DE EXPANSIÓN DE CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> EN CO-CULTIVO CON CSM. ....	81
4.4.1	PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> EN CO-CULTIVO CON CSM Y CITOQUINAS .....	83
4.4.2	CLONOGENICIDAD Y EXPRESIÓN DE BMI-1, NOTCH-1 Y GATA-2 EN CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> EXPANDIDAS Y EN CO-CULTIVO CON CSM. ....	86
4.5	MIGRACIÓN DE CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> EXPANDIDAS CON CITOQUINAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE CSM. ....	88
4.6	QUIMIOTAXIS DE CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> EXPANDIDAS CON CITOQUINAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE CSM. ...	90
4.7	ADHESIÓN DE CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> EXPANDIDAS CON CITOQUINAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE CSM. ....	96
4.8	EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> EXPANDIDAS CON CITOQUINAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE CSM.....	99
4.9	ESTADOS DE ACTIVACIÓN DE LFA-1 DE CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> EXPANDIDAS CON CITOQUINAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE CSM .....	103
4.10	MIGRACIÓN MEDIADA POR VCAM-1 Y ACTIVIDAD DE LFA-1 EN CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> EXPANDIDAS EN	

PRESENCIA Y AUSENCIA DE CSM .....	104
4.11 EXPRESIÓN DE LFA-1, DIFERENCIACIÓN Y MIGRACIÓN .....	105
4.12 MOTILIDAD DE CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> EXPANDIDAS CON CITOQUINAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE CSM. ..	107
4.13 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR INVOLUCRADAS EN LA EXPANSIÓN DE CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> CON CITOQUINAS Y EN CO-CULTIVO CON CSM. ....	109
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>112</b>
5.1 CONSIDERACIONES DEL AISLAMIENTO DE CSH.....	113
5.2 CONSIDERACIONES PARA EL AISLAMIENTO Y EXPANSIÓN DE CSM .....	116
5.3 CONSIDERACIONES SOBRE LA EXPANSIÓN DE CSH .....	117
5.4 ESTABLECIMIENTO DEL MODELO DE CO-CULTIVO DE CSH Y CSM .....	122
5.5 EFECTOS DEL CO-CULTIVO DE CSM Y CSH EN LAS PROPIEDADES ADHESIVAS, MIGRATORIAS Y DE MOTILIDAD DE LAS CSH .....	123
5.6 EL CO-CULTIVO CON CSM RESTABLECE LA MIGRACIÓN MEDIADA POR VCAM-1 AFECTADA EN CSH EXPANDIDAS. ....	124
5.7 EL CO-CULTIVO CON CSM RESTABLECE EL BALANCE ENTRE ADHESIÓN Y MIGRACIÓN EN LA INTERACCIÓN MEDIADA POR VLA-4.....	126
5.8 EL CO-CULTIVO CON CSM ATENÚA LA QUIMIOTAXIS, LA POLARIZACIÓN Y LA MOTILIDAD INCREMENTADA DE LAS CSH EXPANDIDAS CON CITOQUINAS .....	128
5.9 EL CO-CULTIVO DE CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> CON CSM RESTABLECE LA MIGRACIÓN INDUCIDA POR EL CO-ESTÍMULO DE SDF-1 Y VCAM-1 .....	130
5.10 EL CO-CULTIVO CON CSM PRESERVA LA ACTIVIDAD DE LFA-1 EN CSH EXPANDIDAS CON CITOQUINAS: REGULACIÓN CRUZADA ENTRE LFA-1 Y VLA-4 .....	132
5.11 EL CO-CULTIVO CON CSM MODULA LA FOSFORILACIÓN DE AKT DE CSH EXPANDIDAS CON CITOQUINAS INVOLUCRADA EN LA MOTILIDAD CELULAR DE CSH .....	134
5.12 APLICABILIDAD DEL CO-CULTIVO EN TRASPLANTES HEMATOLÓGICOS .....	137
<b>6. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>141</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>142</b>
REFERENCIAS .....	144
ANEXOS.....	172
ARTÍCULO 1 .....	A
ARTÍCULO 2 .....	B

## **Lista de Abreviaturas**

CSH	Células <i>stem</i> hematopoyéticas
CSM	Células <i>stem</i> mesenquimales
PHM	Progenitores hematopoyéticos multipotentes
MO	Médula ósea
SCU	Sangre de cordón umbilical
<i>LTC-IC</i>	<i>Long Term-Culture-Initiating Cells</i>
<i>SCID</i>	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
<i>VCAM-1</i>	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
FBN	Fibronectina
<i>ICAM-1</i>	<i>Intercellular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VLA	<i>Very Late Antigen</i>
<i>LFA-1</i>	<i>Lymphocyte function associated antigen-1</i>
<i>CFU-S</i>	<i>Spleen- Colony Forming Units</i>
<i>SCF</i>	<i>Stem Cell Factor</i>
<i>SDF-1</i>	<i>Stromal Derived Factor</i>
TPO	Trombopoyetina
<i>Flt3L</i>	<i>Fetal liver tyrosine kinase-3</i>
CFU-GEMM	Unidad formadora de colonias granulo-eritroides monocito macrófago
CFU-GM	Unidad formadora de colonias granulocito-macrófago
CFU-E	Unidad formadora de colonias eritroides
BFU-E	Unidad formadora de brotes eritroides
WBC	<i>White blood cells</i> (número de leucocitos)
RBC	<i>Red blood cells</i> (número de eritrocitos)
LYM%	Porcentaje de linfocitos.
LYM#	Número de linfocitos
<i>ISCT</i>	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
PI3K	Fosfoinositol 3 quinasa
<i>PTEN</i>	<i>Phosphate and Tensin Homologue deleted on chromosome-10</i>

## **Lista de figuras**

Figura 1. Esquema de la jerarquía hematopoyética. ....	7
Figura 2. Circulación y tránsito de CSH en la hematopoyesis embrionaria y fetal. ....	21
Figura 3. Localización de las CSH en la MO: interacciones de las CSH con las células estromales y los nichos vascular y endosteal. ....	27
Figura 4. Conteo automatizado de la FCBD. ....	39
Figura 5. Análisis de curvas de amplificación (qRT-PCR) en el programa DART-PCR. ....	51
Figura 6. Purezas de células CD34 <sup>+</sup> obtenidas después del aislamiento inmunomagnético. ....	58
Figura 7. Curvas ROC de las variables predictivas de la obtención de células CD34 <sup>+</sup> . ....	61
Figura 8. Aislamiento y cultivo de CSM. ....	63
Figura 9. Caracterización de las CSM por su inmunofenotipo y la valoración de sus propiedades de multipotencialidad. ....	64
Figura 10. Diferenciación osteogénica de CSM. ....	65
Figura 11. Diferenciación adipogénica de CSM. ....	65
Figura 12. Coexpresión de CD34 y CD133 en células frescas CD34 <sup>+</sup> . ....	68
Figura 13. Expresión de CD34 y CD133 en células frescas CD34 <sup>+</sup> y expandidas con citoquinas de acción temprana durante 14 días. ....	68
Figura 14. Clonogenicidad primaria de células CD133 <sup>+</sup> frescas, expandidas en cultivo con citoquinas de acción temprana por 14 días y separadas por citometría según la expresión de CD133 <sup>+</sup> ( <i>sorting</i> ). ....	69
Figura 15. Microfotografías de colonias formadas en metilcelulosa de las células expandidas en cultivo con citoquinas de acción temprana por 14 días y separadas con base en la expresión de CD133. ....	70
Figura 16. Definición de umbrales de expresión del marcador CD34. ....	71
Figura 17. Porcentaje de células CD34 <sup>alto</sup> de células frescas CD34 <sup>+</sup> o expandidas	

con citoquinas de acción temprana en diferentes días de cultivo. ....	72
Figura 18. Relación de la intensidad de expresión de CD34 al inicio y al final de la expansión de células CD34 <sup>+</sup> en diferentes días de cultivo.....	72
Figura 19. Proliferación celular y expresión de CD34 y CD133 en células CD34 <sup>+</sup> expandidas en cultivo por cinco días. ....	74
Figura 20. Porcentajes de células CD34 <sup>alto</sup> y CD133 <sup>+</sup> en cada división celular....	75
Figura 21. Proliferación de células CD34 <sup>+</sup> marcadas con CFSE al tercer día de cultivo con citoquinas de acción temprana.....	76
Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR de células CD34 <sup>+</sup> aisladas de SCU y expandidas durante 14 días. ....	77
Figura 23. Curvas de disociación en primera derivada de los productos de amplificación. ....	78
Figura 24. Valoración de la subunidad 18 del RNAr como gen de normalización para los ensayos de qRT-PCR.....	79
Figura 25. Expresión relativa (ER) de los genes Bmi-1, Notch-1 y Gata-2 con respecto al día 0 de cultivo.....	80
Figura 26. Expresión relativa (E.R.) de los genes Bmi-1, Notch-1 y Gata-2 con respecto al día 14 de cultivo.....	80
Figura 27. Expresión de CD34 en células CD34 <sup>+</sup> recién aisladas (F) y cosechadas después de tres días de cultivo con CSM (HM), con citoquinas (HC) o con CSM y citoquinas (HMC).....	81
Figura 28. Selección de las células CFSE <sup>+</sup> en las condiciones HM, HC y HMC para el análisis de la expresión de marcadores en las células CD34 <sup>+</sup> cultivadas. ....	82
Figura 29. Microscopía de fluorescencia y luz de los cultivos celulares después de tres días en las condiciones H, HM, HC y HMC.....	83
Figura 30. Divisiones de las células CD34 <sup>+</sup> previamente marcadas con CFSE en las condiciones HM, HC y HMC. ....	84
Figura 31. Promedio de los porcentajes de división de células CD34 <sup>+</sup> en las condiciones HM, HC y HMC.....	85
Figura 32. Promedio del número de células CD34 <sup>+</sup> sembradas (F) y cosechadas al tercer día de cultivo en las condiciones HM, HC y HMC. ....	86
Figura 33. Clonogenicidad primaria de las células CD34 <sup>+</sup> frescas (F) y	

cosechadas al tercer día de cultivo en las condiciones HM, HC y HMC. ....	87
Figura 34. Clonogenicidad y expresión del marcador CD133 en HC y HMC. ....	87
Figura 35. Expresión relativa (ER) de los genes Bmi-1, Notch-1 y Gata-2 en las condiciones HC y HMC con respecto al día 0 de cultivo (F). ....	88
Figura 36. Migración <i>in vitro</i> mediada por VCAM-1 e ICAM-1 de células CD34+ frescas (F) y en las condiciones HC y HMC. ....	89
Figura 37. Migración <i>in vitro</i> mediada por VCAM-1, ICAM-1 y FBN en HC y HMC. ....	90
Figura 38. Migración <i>in vitro</i> mediada por VCAM-1 y SDF-1 en HC y HMC. ....	91
Figura 39. Migración inducida por SDF-1 y expresión del receptor CXCR4 de células CD34 <sup>+</sup> frescas (F) y expandidas con citoquinas (HC). ....	92
Figura 40. Migración <i>in vitro</i> mediada por diferentes estímulos en células CD34 <sup>+</sup> frescas. ....	92
Figura 41. Expresión de CXCR4 de HC y HMC en relación con el número de divisiones. ....	93
Figura 42. Endocitosis del receptor CXCR4 después de la estimulación con SDF-1 en células CD34 <sup>+</sup> F, HC y HMC. ....	94
Figura 43. Concentración de citoquinas en medios condicionados. ....	94
Figura 44. Migración inducida por medio condicionado (Me.Co.) en ausencia y presencia de VCAM-1 en células cultivadas en las condiciones HC y HMC. ....	96
Figura 45. Adherencia a ICAM-1 y FBN de células cultivadas en las condiciones HC y HMC. ....	97
Figura 46. Adherencia a VCAM-1 de células cultivadas en las condiciones HC y HMC. ....	98
Figura 47. Expresión de moléculas de adhesión en células CD34 <sup>+</sup> frescas y cultivadas en las condiciones HC y HMC. ....	100
Figura 48. Factores regulatorios de la expresión de CD11a en células CD34 <sup>+</sup> en expansión. ....	101
Figura 49. Cantidad relativa de transcritos de CD11a, CD49d y CD44 en HC y HMC. ....	102
Figura 50. Detección de las conformaciones abierta y cerrada de LFA-1 en HC y HMC. ....	103

Figura 51. Efectos del anticuerpo MEM148 en la migración mediada por VCAM-1 en HC y HMC.....	105
Figura 52. Expresión de la molécula de LFA-1 (inactiva) y de CD34 en células CD34 <sup>+</sup> frescas y cultivadas con citoquinas por tres y cinco días.....	105
Figura 53. Migración mediada por VCAM-1 de células con inmunofenotipo CD34 <sup>-</sup> /CD133 <sup>-</sup> que han sido cultivadas en las condiciones HC y HMC.....	106
Figura 54. Morfología de las células frescas CD34 <sup>+</sup> y en las condiciones HC y HMC.....	107
Figura 55. Video-microscopía de HC sembradas en medio condicionado sobre CSM.....	108
Figura 56. Video-microscopía de HMC sembradas en medio condicionado sobre CSM.....	108
Figura 57. Desplazamientos, velocidades y trayectorias de HC y HMC.....	109
Figura 58. Fosforilaciones en Ser-473 Akt y Thr-202/Tyr204 Erk de células en las condiciones HC y HMC.....	110
Figura 59. Vías migratorias de células CD34 <sup>+</sup> frescas y en las condiciones HC y HMC.....	137

## **Lista de tablas**

Tabla 1. Características generales de las células <i>stem</i> . .....	6
Tabla 2. Integrinas involucradas en los procesos migratorios hematopoyéticos..	22
Tabla 3. Ventajas relativas del reemplazo hematológico con SCU. ....	31
Tabla 4. <i>Primers</i> diseñados para cuantificación relativa de ARNm ( <i>SybrGreen</i> ). 48	
Tabla 5. Estadística descriptiva de variables usadas para optimización de muestreo de SCU.....	59
Tabla 6. Análisis de regresión lineal multivariado.....	60
Tabla 7. Expansión de células CD34 <sup>+</sup> después de 14 días de cultivo con citoquinas de acción temprana.....	67
Tabla 8. Concentración de citoquinas en medio condicionado HMC. ....	95
Tabla 9. Distribución de frecuencias de células elongadas y redondeadas en HC y HMC .....	107

## **Lista de artículos publicados**

1. Perdomo-Arciniegas AM, Vernot JP. Optimised cord blood sample selection for small-scale CD34+ cell immunomagnetic isolation. Mol. Med. Report., 2012; 5:749-52. (Artículo N° 1)
2. Perdomo-Arciniegas AM, Vernot JP. Co-culture of hematopoietic stem cells with mesenchymal stem cells increases VCAM-1-dependent migration of primitive hematopoietic stem cells. Int. J. Hematol. 2011; 94:525-32. (Artículo N° 2)

## INTRODUCCIÓN

El sistema hematopoyético está compuesto por una variedad de tipos celulares que se generan a partir de progenitores hematopoyéticos inmaduros por procesos de expansión y diferenciación celular. De la adecuada generación de estos progenitores y células maduras dependen funciones vitales como el transporte de oxígeno, la hemostasia y la inmunidad. Las células *stem* hematopoyéticas (CSH) ocupan el primer lugar en la jerarquía de los progenitores hematopoyéticos: una sola de estas células puede generar todos los progenitores necesarios para restablecer el sistema hematopoyético completo; produciendo eritrocitos, granulocitos, monocitos, linfocitos entre otros tipos celulares. En otras palabras una sola CSH puede reconstituir la médula ósea de un organismo completo. Las CSH son el paradigma de la terapia regenerativa pues se utilizan desde hace más de cinco décadas para reemplazar el sistema hematopoyético completo de pacientes con enfermedades de origen hematológico y no-hematológico.

La médula ósea (MO), tejido donde las CSH inicialmente fueron descubiertas, ha sido ampliamente usada en este tipo de trasplantes. Pero con la identificación de CSH en sangre de cordón umbilical (SCU), el trasplante de SCU se ha posicionado como alternativa terapéutica. Por su baja inmunogenicidad y accesibilidad, el trasplante de SCU es especialmente útil en casos en donde no se consigue un donante de MO compatible. Estos casos pueden llegar a alrededor de un 30% del total de trasplantes, en países desarrollados como Estados Unidos. Infortunadamente, la SCU en comparación con la MO tiene menos células y porcentaje de CSH lo que la pone en una desventaja relativa como sustrato de trasplante, pues la dosis celular por peso del individuo tiene una relación directa con el éxito del trasplante. Esto limitó inicialmente el uso de SCU en trasplantes a pacientes pediátricos.

Con el descubrimiento de factores de crecimiento de CSH, en las últimas décadas, se ha explorado el cultivo *ex vivo* de progenitores hematopoyéticos

como una manera de expandir esta población celular para su uso en trasplantes. Aludiendo a su capacidad de inducir la proliferación de progenitores hematopoyéticos tempranos se denominaron “citoquinas de acción temprana” al conjunto de factores de crecimiento compuesto por la trombopoyetina (TPO, del inglés *Thrombopoyetin*), el factor de células stem (SCF, del inglés *Stem Cell Factor*) y el ligando de la tirosina quinasa 3 de hígado fetal (Flt3L, por su sigla *Fetal liver tyrosine kinase-3 ligand*). Los trasplantes en humanos que se intentaron tras la expansión de los progenitores hematopoyéticos con estas citoquinas no mejoraron la injertabilidad de los tejidos hematopoyéticos usados. Como fundamento celular para explicar esta falla se han postulado teóricamente dos grandes hipótesis: la diferenciación y/o agotamiento de los progenitores hematopoyéticos durante la expansión y la pérdida de las capacidades intrínsecas de estas células para localizarse en su nicho natural.

La expansión con citoquinas de CSH a mediano y largo plazo induce cierta diferenciación hematopoyética, lo cual se ajusta a la primera hipótesis. Por otra parte, estudios detallados en CSH expandidas con citoquinas de acción temprana revelan cambios en la expresión y funcionalidad de moléculas de adhesión fundamentales para la circulación, tránsito, retención y homeóstasis de las CSH. Específicamente, la interacción VCAM-1/VLA-4, así como el eje quimiotáctico SDF-1/CXCR4 centrales en la anidación y retención de las células stem y progenitores hematopoyéticos en MO, se ven afectadas durante la expansión. Estos cambios ocurren en fases del ciclo celular anteriores a la mitosis y la pérdida de marcadores de células stem, es decir antes de una diferenciación propiamente dicha. Asimismo, en detrimento de la hipótesis de la diferenciación, CSH y progenitores expandidos pueden repoblar la MO tras ser inyectados intramedularmente. Sin embargo los progenitores expandidos e inyectados en la MO no pueden migrar hacia otros sitios de hematopoyesis, soportando la hipótesis de que estas células pierden sus propiedades intrínsecas de migrar y localizarse en sitios que son su nicho natural.

Al retirar las CSH y ponerlas fuera de su microambiente especializado, estas

tienden a perder sus características particulares, lo que se ha contemplado como una posible causa del fallo en la expansión y trasplante de CSH. Se ha propuesto que el co-cultivo de CSH con células del microambiente medular puede mejorar las condiciones de expansión manteniendo una población de progenitores primitivos, retomando lo que en algún momento se postuló como hipótesis del “nicho hematopoyético” (Schofield, 1978). Las células *stem* mesenquimales (CSM) hacen parte del microambiente medular pero a su vez son progenitoras de células estromales que también interactúan con los progenitores hematopoyéticos. La interacción entre CSH y CSM que se da a través de proteínas de la matriz extracelular, moléculas de adhesión y factores solubles modula la función hematopoyética. Teniendo en cuenta esta propiedad las CSM se han usado como coadyuvantes en trasplantes o como células co-estimuladoras para la expansión en cultivo mostrando una mayor rapidez de la repoblación medular. Las ventajas del trasplante de CSH expandidas co-cultivadas con CSM tiene fundamentos celulares y moleculares que todavía permanecen sin revelar. Una hipótesis plausible que no había sido explorada hasta ahora es la modulación por parte de la CSM de las propiedades migratorias y adhesivas de las CSH expandidas con citoquinas de acción temprana.

Para explorar esta hipótesis este estudio se dividió en diferentes fases, que permitieran garantizar una adecuada evaluación de los efectos de los diferentes tratamientos aplicados a las células CD34<sup>+</sup>. En primer lugar se aislaron células CD34<sup>+</sup> de SCU permitiendo un enriquecimiento de CSH primarias. Se estableció un protocolo costo-efectivo de selección de muestras de SCU para obtener los números de células CD34<sup>+</sup> necesarios para la realización de los experimentos. Se determinó un tiempo de cultivo de células CD34<sup>+</sup> con citoquinas de acción temprana en que se obtienen células divididas con una mínima diferenciación con respecto al primer día de cultivo. Se evaluaron los efectos de la expansión con citoquinas en la adhesión y migración celular mediada por distintos sustratos comparando con células recién aisladas y con el co-cultivo con CSM. Se observó que las CSM pueden modular los efectos inducidos por las citoquinas en la adhesión, migración y motilidad de las células CD34<sup>+</sup>. Las demostraciones de la

preservación de la migración mediada por VCAM-1 y de la motilidad en células CD34<sup>+</sup> co-cultivadas reveló que las CSM pueden modular la fisiología de las CSH en otro aspecto diferente al mantenimiento de un fenotipo hematopoyético primitivo. Los hallazgos descritos sobre los efectos del co-cultivo de CSM en la migración, motilidad, adhesión y vías de señalización involucradas, permiten delimitar enfoques hacia el descubrimiento de factores específicos que regulan estos procesos y en un futuro permitir una implementación más racional de los protocolos de trasplante con CSH aisladas de SCU.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 Las células stem hematopoyéticas

### 1.1.1 Ontogénesis de las células stem hematopoyéticas

Las células *stem* hematopoyéticas (CSH) aparecen en los mamíferos durante la embriogénesis, extraembrionariamente en el saco vitelino e intraembrionariamente en la esplacnopleura para-aórtica y la región aorta-gónada-mesonefros (Moore y Metcalf, 1970; Medvinsky y Dzierzak, 1996). Desde allí migran hacia el hígado, bazo, timo y finalmente hacia la MO, el sitio predominante de la hematopoyesis adulta. La ausencia de precursores hematopoyéticos en los órganos hematopoyéticos intraembrionarios (como el hígado, el bazo y el timo) y su presencia extraembrionaria llevó a especular durante cierto tiempo que la única fuente de estos precursores era el saco vitelino y desde allí migraban hacia los sitios intraembrionarios (Moore y Metcalf, 1970). Posteriormente en el modelo aviar, usando quimeras de embriones de codorniz con saco vitelino de pollo se demostró la presencia de progenitores intraembrionarios independientes demostrando su origen independiente (Dieterlen-Lievre, 1975).

La presencia de progenitores hematopoyéticos en el embrión humano se identificó directamente por primera vez a través del aislamiento de células CD34<sup>+</sup> purificadas de saco vitelino y tejidos intraembrionarios (Huynt y cols, 1995). Las células embrionarias aisladas con esta metodología, formaban predominantemente progenitores no-eritroides, con alto potencial proliferativo en ensayos de clonogenicidad (ver, en capítulo 1.1.3). Corroborando estos hallazgos, se identificó una población CD34<sup>+</sup> adherida al endotelio aórtico (Tavian y cols, 1996), demostrando que estas células CD34<sup>+</sup> co-expresan marcadores de predominio hematopoyético: CD45, Gata-2, Gata-3, c-kit, Flk-1 (Labastie y cols, 1998). El origen independiente entre la hematopoyesis intra y extra-embionaria

se pudo determinar en ensayos en los que se evaluó la presencia de estos progenitores en la esplacno-pleura antes del establecimiento de la circulación en el embrión (Tavian y cols, 2001). Se ha demostrado que la capacidad de estos progenitores humanos de reconstituir *in vivo* el compartimento hematopoyético difiere dependiendo de su procedencia: los precursores intraembrionarios producen una progeñie multilíneaje en ratones inmunodeficientes por más de 6 meses, mientras que las células hematopoyéticas aisladas de saco vitelino solo reconstituyen la población mieloide a corto plazo (Cumano y cols, 2001; Tavian y cols, 2001). Actualmente a pesar de los avances en estas investigaciones, todavía está en debate la jerarquía entre los progenitores hematopoyéticos (embrionarios y extraembrionarios) y el origen más primitivo de estos subtipos celulares (Tavian y cols, 2010).

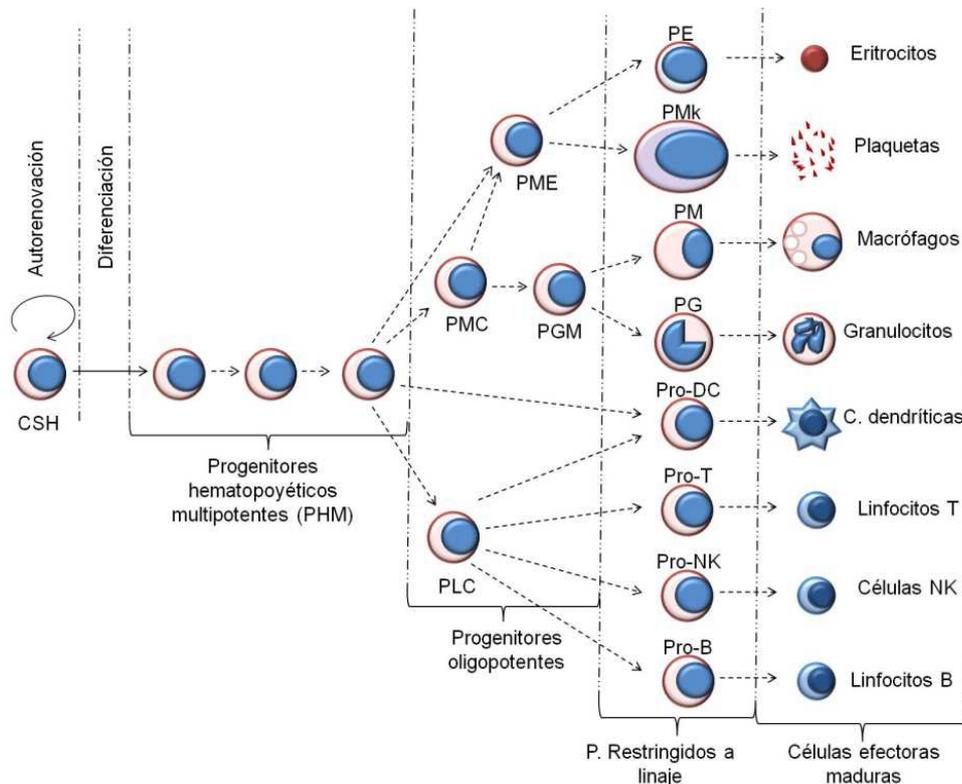
### **1.1.2 Características generales de las células stem y de las CSH**

Como cualquier tipo de célula *stem*, las CSH se definen por tres características (Tabla 1). La primera es su capacidad de auto-renovación, definida como un tipo de división celular en la que una o ambas células hijas son células *stem* reteniendo el mismo potencial de desarrollo que la célula madre. Es un concepto limitado, que contrasta con el de proliferación que se refiere a todos los tipos de mitosis, ya sea que den lugar a células *stem*, progenitores restringidos o células maduras diferenciadas (Reya y cols, 2001). En segundo lugar las células *stem* deben poder diferenciarse en múltiples tipos de células maduras, para reemplazar las células que cumplen su vida útil en los tejidos adultos. En el sistema hematopoyético, las CSH ocupan el primer lugar en la jerarquía de todos los progenitores hematopoyéticos y originan al menos ocho tipos distintos de células efectoras maduras (eritrocitos, plaquetas, granulocitos, macrófagos, células dendríticas, células T, células B y células *natural killer* (NK)) (Fig. 1).

**Tabla 1. Características generales de las células stem.**

- 1. Potencial de autorenovación.**
- 2. Potencial de diferenciación.**
- 3. Regulación estricta del número total de células stem.**

La tercera característica es la regulación estricta del número total de células *stem* por mecanismos tanto intrínsecos como extrínsecos, resultando en la estabilidad de la población de células *stem* (Park y cols, 2004). Esta característica de las células *stem* se aplica especialmente para las células *stem* adultas, ya que son las CSH aisladas de la MO adulta las que tienen una tasa proliferativa mínima. El balance entre autorenovación y proliferación de las CSH en la MO está modulado a través de la relación con otros tipos celulares que le dan un microambiente específico, al que se ha denominado nicho hematopoyético (Schofield, 1978; Wilson y Trumpp, 2006).



**Figura 1. Esquema de la jerarquía hematopoyética.**

Las CSH ocupan el primer lugar de la jerarquía de los progenitores hematopoyéticos en general. Las CSH pueden autorenovarse y/o diferenciarse en progenitores hematopoyéticos multipotentes (PHM). Los PHM dan origen a los progenitores oligopotentes, que incluyen los progenitores linfocitos común (PLC), Mieloide Común (PMC) y también los descendientes de los PMC: los progenitores granulocito-macrófago (PGM) y megacariocito-eritrocito (PME). Siguen en la jerarquía los progenitores restringidos por linaje, que son progenitores eritroides (PE), megacariocíticos (PMk), de macrófagos (PM), granulocíticos (PG), de células dendríticas (Pro-DC), de linfocitos T (Pro-T), de linfocitos B (Pro-B) y de células NK (Pro-NK) que originan las respectivas células maduras. Modificado de Bryder y cols, 2006.

### **1.1.3 Características proliferativas de los progenitores hematopoyéticos.**

La producción limitada de CSH en la MO contrasta con la constante generación y recambio de células sanguíneas maduras. En un ser humano adulto la tasa de producción de células sanguíneas es de alrededor  $1,5 \times 10^6$  células por segundo. Esta altísima tasa de producción necesita de una regulación precisa en diversos niveles. El potencial proliferativo hematopoyético aumenta progresivamente en los progenitores multipotentes, pluripotentes y oligopotentes, siendo estos últimos los más activos. En la jerarquía hematopoyética (Bryder y cols, 2006) representada en la figura 1 los descendientes inmediatos de las CSH son los progenitores hematopoyéticos multipotentes (PHM). Los PHM retienen el potencial de diferenciación hacia todos los linajes sanguíneos pero pierden su potencial de autorenovación, con un aumento relativo de su capacidad de proliferativa (Fig.1). Las CSH de la MO adulta son quiescentes en su mayoría, alrededor del 95% de estas células están en fase G0 del ciclo celular (Fleming y cols, 1993; Ramshaw y cols, 1995). La quiescencia se postula como un mecanismo de protección contra la depleción de esta población y contra los efectos deletéreos derivados de un error replicativo en la célula progenitora de mayor jerarquía (Passegué y cols, 2006). A pesar de esto también es necesario que las CSH mantengan una tasa proliferativa para compensar las pérdidas secundarias a la diferenciación (Glauche y cols, 2009). En las CSH de MO la tasa de división es cada 36 y 145 días (según las diferencias entre las CSH llamadas “activas” y “durmientes”, respectivamente) (Pietras y cols, 2011). Por el contrario, en las CSH aisladas de hígado fetal, MO fetal y SCU no se aplica el concepto de que el potencial *stem* hematopoyético recae solamente en las células quiescentes (Wilpshaar y cols, 2000; Wilpshaar y cols, 2002). Las células CD34<sup>+</sup> aisladas de hígado fetal y MO fetal que están en fase G1, S/G2 y M del ciclo celular tienen la misma capacidad repobladora a largo término que las que se encuentran en fase G0 (Wilpshaar y cols, 2002). De hecho, las CSH embrionarias y fetales entran en ciclo celular una vez cada 24 h (Pietras y cols, 2011). Además, la evaluación comparativa entre células en fase G0 y G1 de células CD34<sup>+</sup> aisladas de SCU, demuestra que estas reconstituyen la MO de ratones inmunodeficientes luego de trasplantes sucesivos

(Wilpshaar y cols, 2000). Esta evidencia indica que la quiescencia no es una característica *sine qua non* de las CSH.

Se ha mencionado que el verdadero carácter *stem* de una CSH se evalúa con su capacidad de restablecer la hematopoyesis luego de trasplantes sucesivos en ratones inmunodeficientes. Este es el ensayo más aceptado para la definición experimental entre CSH y progenitores hematopoyéticos multipotentes (PHM) (Fig.1) (Majeti y cols, 2007; Bryder 2006). Los PHM restablecen rápidamente la hematopoyesis (>proliferación que CSH) repoblando la MO murina, sosteniendo esta actividad solo 12 semanas (Hogan y cols, 2002). Por su parte, las CSH “verdaderas” aunque repueblan la MO más lentamente pueden mantenerse por largo tiempo (>20 semanas) (Hogan y cols, 2002) y permiten la repoblación de la MO de ratones inmunodeficientes trasplantados sucesivamente (Chen y cols, 1994; Allsopp y Weissman, 2002). Como se puede inferir, la distinción entre CSH y PHM implica largos experimentos que se complican por la morbimortalidad secundaria a infecciones de estos sujetos. A continuación se analizará en detalle este modelo de evaluación en conjunto con otras formas de caracterización de la función hematopoyética.

#### **1.1.4 Caracterización funcional de las CSH**

Históricamente, la caracterización de las CSH inició cuando Till y McCulloch definieron la capacidad clonogénica de las CSH, denominando “colonias” a los nódulos que se formaban en el bazo después de inyectar suspensiones celulares variables de MO a ratones irradiados (Till y McCulloch, 1961; Becker y cols, 1963). Ellos concluyeron que mediante esa metodología podían determinar el número de células con capacidad proliferativa contenidas en determinada MO. A estas células las llamaron Unidades Formadoras de Colonias (UFC o CFU, sigla en inglés *Colony Forming Units*). Este ensayo de formación de colonias en el bazo (CFU-S, *spleen*) solo puede determinar la formación de colonias mieloides y eritroides, por lo que se necesitaron desarrollos técnicos subsecuentes para la determinación *in-vivo* del número de unidades formadoras de colonias de células

T y B (Ezine y cols, 1984; Müller-Hermelink y cols, 1984; Whitlock y cols, 1987). Además este ensayo permite valorar la presencia tanto de CSH como de PHM pues ambos tipos de células tienen la misma multipotencialidad.

- Ensayos de clonogenicidad primaria

El desarrollo de ensayos en agares suplementados permitió la valoración *in vitro* de la capacidad clonogénica de una suspensión celular de manera similar a los ensayos CFU-S. MacNiece y cols, denominaron a las células capaces de formar colonias con más de 50.000 células en este tipo de agares, “células con alto potencial proliferativo” (HPP-CFC, del inglés *High Proliferation Potential- Colony Forming Cells*). Estos ensayos permiten la detección de colonias granulomonocíticas y/o eritroides de acuerdo con los suplementos usados (GM-CSF e IL-3 y/o eritropoyetina, respectivamente) (MacNiece y cols, 1989; MacNiece y cols, 1990). Los agares mencionados contienen metilcelulosa suplementada con citoquinas de acción temprana y citoquinas inductoras de diferenciación granulomonocítica y eritroide. Estos permiten evaluar la frecuencia y capacidad proliferativa de células formadoras de colonias en una población heterogénea y el tipo de Unidad Formadora de Colonia (UFC) de acuerdo a su potencial eritroide (BFU-E y CFU-E), granulocito-macrófago (CFU-GM), granulocítico (CFU-G), macrófago (CFU-M) o mixto (CFU-GEMM). Actualmente estos ensayos se han propuesto en conjunto con los conteos de células CD34<sup>+</sup>, como una manera de evaluar el número de CSH/PHM en las unidades de SCU o MO para almacenar en bancos para uso clínico (Rubinstein, 2009; Page y cols, 2011). El ensayo denominado células formadoras de áreas en empalizada (*Cobblestone-Area Forming-Cells*) es también de clonogenicidad directa. Evalúa la capacidad de las células sembradas sobre células estromales de formar colonias de células adheridas. Se determina el tipo de progenitor de acuerdo al tiempo de la formación de estas áreas (Bock, 1997).

- Ensayos de clonogenicidad secundaria

La evidencia de que las células responsables de la formación de las mencionadas

CFU-S, UFC, pueden provenir de PHM y no de CSH motivó el desarrollo de los cultivos a largo término en células estromales (LTC-IC del inglés, *Long Term-Culture- Initiating Cells*) (Ploemacher y Brons, 1989; Sutherland y cols, 1989). Estos son ensayos clonogénicos como los mencionados anteriormente pero después de un cultivo de 5 semanas sobre células estromales. Para su cuantificación se realizan varias diluciones de la suspensión de células obtenidas al final del cultivo y se determina la dilución límite para generar colonias (Sieburg y cols, 2002). Este tipo de ensayo permite un mejor discernimiento entre CSH y PHM pues estos últimos no se mantienen por tanto tiempo en el cultivo de células estromales. Sin embargo las CSH que se encuentran *in vivo* son biológicamente distintas de las anteriormente mencionadas LTC-IC (Larochelle y cols, 1996).

- Trasplantes en modelos animales

Se ha visto que los ensayos *in vitro* pueden evaluar las capacidades clonogénicas y de diferenciación que tienen tanto las CSH como los PHM (Hogan y cols, 2002, Majeti y cols, 2007), pero como ya se ha mencionado la prueba definitiva de *stemness* en las CSH son los trasplantes sucesivos (Chen y cols, 1994). La identificación de cepas de ratones inmunodeficientes ha posibilitado un microambiente permisivo para la evaluación del quimerismo hematopoyético humano tras el xenotrasplante de CSH humanas (Kawashima y cols, 1996; Bosma y cols, 1983; Shultz y cols, 1995). Las cepas usadas incluyen los ratones *beige*, *nude*, con inmunodeficiencia ligada al cromosoma X (*bnx*), SCID (del inglés, *Severe Combined Immunodeficiency*) y NOD (del inglés *Non-Obese Diabetic*).

La cepa de ratón más aceptada para los ensayos de repoblación usada es la llamada NOD/SCID que combina la cepa SCID deficiente en células T y B, e inmunoglobulinas y la cepa NOD deficiente en macrófagos y células NK (Shultz y cols, 1995; Bock, 1997). La cepa NOD/SCID tiene los defectos derivados de la disfuncionalidad en una enzima que participa en reparación del DNA (*Prkdc*, del inglés *protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide*) afectando las células que hacen recombinación somática y los de NOD que afecta los mecanismos de

tolerancia periféricos. Los ratones NOD/SCID no desarrollan diabetes autoinmune, pues esta es mediada por las células T que están afectadas en los ratones SCID (Shultz y cols, 1995). Para obtener mayor inmunosupresión, se han realizado otros cruces de cepas como la que incluye la deficiencia de la cadena gamma común de interleuquinas, generando ratones NOD/SCID/IL-2R gamma<sup>-/-</sup> (Shultz y cols, 2005). La escogencia de la cepa para el xenotrasplante es importante, ya que la eficacia de estos trasplantes varía en estas cepas y hasta entre los sexos del animal trasplantado (Notta y cols, 2010). Por otra parte, el tipo de inoculación de las CSH (inyección intravenosa (i.v.) versus intra-medular) modifica el resultado de la repoblación medular (Yahata y cols, 2003).

Estos modelos sirven para evaluar diferentes capacidades según el tiempo transcurrido después del trasplante. Esto se debe a que la repoblación de la MO con CSH inyectadas depende de al menos tres pasos: la anidación (*homing*) en la MO, su localización y retención en microambientes específicos dentro de la MO (*lodgment*) y la ejecución de sus potencialidades de autorenovación y/o diferenciación a corto y largo plazo (Jetmore y cols, 2002). Se ha definido que la anidación se determina en las siguientes horas (3 - 24 h) después de la inyección de las células (Nilson y cols, 1997; Scott y cols, 2003), de 4-12 semanas para determinar el injerto a corto plazo (PHM) y a partir de las 20 semanas el injerto de largo plazo (CSH) (Nilson y cols, 1997; Hogan y cols, 2002). No obstante la complejidad del proceso de repoblación medular también puede llevar a conclusiones erradas en este modelo. Por ejemplo la carencia de repoblación medular a largo plazo después de un xenotrasplante puede no solo indicar insuficiencia de CSH sino un defecto inicial en la anidación (Scott y cols, 2003).

La combinación entre los modelos de xenotrasplante y la producción de anticuerpos monoclonales contra las moléculas de las células de MO han permitido identificar inmunofenotipos que definen la presencia de CSH. Esta inmunofenotipificación es cada vez más específica en la definición del inmunofenotipo *stem* y la de otros progenitores hematopoyéticos (especialmente en el modelo murino). A continuación se enunciarán algunas de las moléculas

estudiadas del modelo murino y humano que identifican CSH y PHM.

### **1.1.5 Inmunofenotipo de las CSH y progenitores hematopoyéticos**

El inmunofenotipo que caracteriza cada miembro de la jerarquía del modelo hematopoyético (Fig. 1) ha recibido gran atención durante las últimas décadas. La identificación de marcadores de superficie específicos de CSH permite separar poblaciones indeseadas de las unidades de reemplazo hematopoyético. El inmunofenotipo que distingue entre CSH, PMH y progenitores comunes está más definido en el modelo murino que en humanos.

- **Inmunofenotipo de CSH murinas**

El inmunofenotipo de las CSH murinas ha sido hasta ahora el más estudiado. Las CSH murinas se encuentran dentro de la población de células que expresan CD117 (c-Kit) y *Stem cell antigen-1* (Sca-1) y no expresan marcadores de linaje: granulo-monocítico (CD16, CD32, Gr-1 y CD11b), linfocítico (CD4, CD8 y CD19) y eritrocítico (Ter119). Esta población, llamada KSL (referido al inmunofenotipo  $(Kit^+/Sca^+/Lin^-)$ ) es heterogénea, pues a pesar de estar enriquecida en CSH, solo 1 de cada treinta tiene capacidad de repoblación a largo término (Morrison y Weissman, 1994; Bryder y cols, 2005). Esta heterogeneidad se puede revelar mediante el uso de marcadores adicionales como CD34, CD38, Thy 1.1, CD105, flt-3 y CD150 (Yang y cols, 2005; Randall y cols, 1996; Morrison y Weissman, 1994; Chen y cols, 2002; Morrison y cols, 1997; Adolfsson y cols, 2001; Kiel y cols, 2005). Por ejemplo, la población KSL que expresa los marcadores CD34, flt3, Thy 1.1, CD244 y CD11b está enriquecida en PHM, también llamadas células repobladoras a corto término (Yang y cols, 2005; Randall y cols, 1996; Morrison y cols, 1994; Chen y cols, 2002; Morrison y cols, 1997), mientras que las KSL que expresan CD38, CD105, CD150 poseen una actividad repobladora a largo término definiéndolas como CSH (Randall y cols, 1996; Adolfsson y cols, 2001, Kiel y cols, 2005).

- Inmunofenotipo de CSH humanas, papel de la molécula CD34

El inmunofenotipo de CSH de primates no-humanos y humanos difiere del de CSH murinas. En la MO humana, casi toda la actividad hematopoyética se encuentra en la población que expresa CD34<sup>+alto</sup> (Sutherland y cols, 1989; Gao y cols 2001). Son las células CD34<sup>+</sup> y no las CD34<sup>-</sup>, las que permiten la reconstitución de la médula ósea de babuinos irradiados (Berenson y cols, 1988). Esta diferencia entre la expresión de CD34 en CSH murinas y humanas, al parecer se explica por la presencia de secuencias regulatorias que flanquean el gen homólogo humano, ya que este se expresa en células KSL al trasducir enteramente (en un cromosoma) el *locus* genómico del CD34 humano (Okuno y cols, 2002). La expresión de la molécula CD34 se detecta en CSH muy primitivas pero su expresión decrece gradualmente a medida que las CSH humanas se diferencian en células *stem* maduras. La molécula CD34 se expresa también en la mayoría de células endoteliales (Simmons y cols, 1992; Puri y cols. 1995). Sin embargo diferencias en las N- y O-glicosilaciones de la porción extracelular más distal del CD34 entre CSH y células endoteliales determinan su afinidad por las L-selectinas (Lanza y cols, 1992). Mientras de la función del CD34 endotelial (rico en O-glicosilaciones), se conoce que une a los ligandos CD62L y CD62E (Simmons y cols, 1992; Puri y cols. 1995), del CD34 hematopoyético no se conoce un ligando específico. Recientemente se describió la actividad del CD34 expresado en CSH como una molécula que disminuye la adhesión, incrementando la habilidad de migración (Nielsen y McNaghy, 2009).

La población de células CD34<sup>+</sup> en humanos (como la KSL en ratón) es una población heterogénea enriquecida en CSH mezclada con distintos progenitores hematopoyéticos (Gao y cols, 2001). De la subpoblación KSL se conocen inmunofenotipos específicos que permiten determinar entre CSH y los tres distintos PHM (Fig. 1). El inmunofenotipo específico de las células CD34<sup>+</sup> humanas con capacidad *stem* y de los PHM, no se conoce tan a fondo como en el modelo murino (Majeti y cols, 2007).

- La molécula CD34 y su uso como sustrato para purificar CSH

La molécula de CD34 es una glicoproteína transmembranal tipo I de 385 aminoácidos. Su secuencia consta de un gran dominio extracelular de 258 residuos, un péptido líder de 31 residuos, un dominio transmembranal de 23 residuos y un dominio citoplasmático de 73 residuos (Sovalat y cols, 1998).

El dominio extracelular del CD34 expresado en CSH contiene cierto número de epítopes que se presentan de manera variable en células normales y blastos leucémicos (Sovalat y cols, 1998). Estos epítopes se han detectado por la sensibilidad del CD34 al tratamiento con ciertas enzimas: Los epítopes de clase III que son resistentes al clivaje con neuraminidasa, quimiopapaina y una glicoproteasa de *Pasteurella haemolytica*; los epítopes de clase I que son sensibles al clivaje con las tres enzimas, y los de clase II que son sensibles a la degradación con quimiopapaina y la glicoproteasa mencionada. Al parecer los epítopes de clase I y II se regulan negativamente en un estadio más temprano de la diferenciación hematopoyética (Steen y cols, 1996; Steen y Egeland, 1998).

El desarrollo de anticuerpos contra los mencionados epítopes de la molécula CD34 ha permitido desarrollar técnicas de separación de CSH (Cancelas y cols, 1996). A través de la marcación de estos anticuerpos con fluorocromos o con biotina es posible el aislamiento de CSH por citometría de flujo mediante *sorting* celular o a través de superficies cubiertas con estreptavidina, respectivamente. También al asociar estos anticuerpos a perlas magnéticas es posible separar CSH, reteniéndolas en campos magnéticos dejando fluir las células negativas para el marcador CD34 (Cancelas y cols, 1996). Las separaciones de células CD34 por inmovinabsorción o inmovinomagnetismo son más rápidas y confiables que las separaciones por citometría de flujo (Miltenyi y cols, 1990). Hasta ahora este ha sido el método más usado para aislar células CD34<sup>+</sup> a partir de diferentes fuentes debido a su mejor desempeño en cuanto a enriquecimiento de la población (Miltenyi y cols, 1990; de Wynter y cols, 1995). A pesar de que las casas comerciales ofrecen eficiencias y purzas máximas en los *kits* de aislamiento inmovinomagnético de células CD34<sup>+</sup>; se ha demostrado que se

requiere de variaciones en estos procedimientos para obtener buenos resultados (Kekarainen y cols, 2006; de Wynter y cols, 1999). Una de las variables que afecta la reproducibilidad en la eficiencia y la pureza de células CD34 es la frecuencia de células CD34<sup>+</sup> presente en la muestra. El aislamiento inmunomagnético de células CD34<sup>+</sup> es reproducible solo cuando se alcanza una frecuencia de células CD34<sup>+</sup> de más de 0,65% (Cancelas y cols, 1996). Por tanto este aislamiento es más reproducible en muestras MO donde la frecuencia es de 0,8 - 4% y mucho menos reproducible en SCU donde la frecuencia varía entre 0,1 y 0,6% (Cancelas y cols, 1996). El enriquecimiento de células CD34 de sangre periférica está entre 38,6% a 87,1% (54,4% +/- 12,3%). Esta alta variabilidad y baja pureza de células CD34<sup>+</sup> se correlaciona con las bajas frecuencias de células CD34 en sangre periférica (0,18 +/- 0,052%) (Kato y Radbruch, 1993). En el caso específico del aislamiento de CSH de SCU, factores adicionales se suman a la variabilidad de la purificación de células CD34<sup>+</sup>. Uno de los más importantes es el volumen de SCU que se colecta, el cual depende directamente del tiempo que se espera después del nacimiento del neonato para realizar el pinzamiento del CU (Donaldson y cols, 1999; Pafumi y cols, 2001). En el Instituto Materno Infantil de Bogotá, principal centro de salud materno-fetal colombiana, el pinzamiento del CU se practica después de su pulsación, alrededor de 3 min después del nacimiento. Esta práctica se conoce como pinzamiento diferido del CU (*delayed clamping*) y pese a que tiene reconocidos beneficios para el neonato (Andersson y cols, 2011), no se practica internacionalmente (Sivaraman y cols, 2011). Debido a que el pinzamiento diferido reduce los volúmenes colectados de SCU y a su vez el número de células CD34<sup>+</sup> recuperado, la optimización del aislamiento de células CD34 de SCU es indispensable en nuestro medio.

- Inmunofenotipo de CSH humanas, marcadores complementarios

Como un marcador alternativo y complementario de la molécula CD34 de CSH humanas se ha reportado el marcador CD133 o prominina-1. Este marcador se encontró co-expresándose proporcionalmente en células CD34<sup>+</sup> de hígado fetal y otros tejidos hematopoyéticos (Yin y cols, 1997). Estudios posteriores en sangre

periférica movilizada o de SCU muestran que la selección por medio del marcador CD133 puede ser mejor para el aislamiento de células *stem* más primitivas comparado con el CD34 (Matsumoto y cols, 2000, Jaatinen y Laine, 2007). Dado que células CD34<sup>+</sup> se pueden generar a partir de una población CD133<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>, las células CD133<sup>+</sup> parecen ser ancestrales a las CD34<sup>+</sup> (Summers y cols, 2004). Sin embargo se reporta que la actividad hematopoyética en células CD133<sup>+</sup> está ligada únicamente a la expresión del marcador CD34 (Götze y cols, 2007) y que en estas células la pérdida del marcador CD133 implica diferenciación (Bauer y cols, 2011).

Dado que el inmunofenotipo completo que caracteriza las CSH humanas hasta hace poco se desconocía (Majeti y cols, 2007), en los últimos años los esfuerzos se redoblaron para reconocerlo. Notablemente, el año pasado se publicó en la revista *Science* el primer inmunofenotipo de una sub-población de células CD34<sup>+</sup> con capacidad *stem* verdadera (Notta y cols, 2011). Notta y cols, reportan que una sola célula con el inmunofenotipo CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>/CD45RA<sup>-</sup>/CD90<sup>+</sup>/Rodamina<sup>bajo</sup>/CD49f<sup>+</sup> puede repoblar a largo plazo no solamente la MO inyectada sino sitios distantes a esta (Notta y cols, 2011). Tanto las combinaciones de marcadores de superficie de los PHM derivados de esta población así como la definición de la relación jerárquica entre ellos está por definir.

Como se ha visto con los marcadores CD34 y CD133, durante el desarrollo hematopoyético, la expresión de algunos factores transcripcionales y otras moléculas está definida por patrones que permiten seguir los estadios de diferenciación. Se contemplan a continuación algunos de estos genes que modulan el desarrollo hematopoyético.

### **1.1.6 Genes reguladores de la actividad hematopoyética**

El desarrollo del sistema hematopoyético en sus fases embrionaria, fetal y adulta está fundamentado sobre la expresión y el silenciamiento selectivo de ciertos genes. Algunos de ellos son factores transcripcionales importantes en las fases

tempranas del desarrollo (como Gata-2 y HoxB4), otros son característicos de la regulación de los procesos de proliferación y muerte celular (como Bmi-1) y por último se encuentran los que se expresan en las fases tardías del desarrollo y además regulan la interacción con los microambientes hematopoyéticos (como los receptores Notch).

- Gata-2

GATA-2 es un factor transcripcional perteneciente a una familia de seis miembros, en la que tres de ellos (GATA-1, -2 y -3) están relacionados con la hematopoyesis (Orkin 1992; Weiss y Orkin 1995). A diferencia de GATA-1 y -3, GATA-2 es indispensable para las fases iniciales del desarrollo hematopoyético, expresándose mayoritariamente en CSH y progenitores hematopoyéticos (Pevni y cols, 1995; Tsai y cols, 1994; Buza-Vidas y cols, 2011). La expresión de Gata-2 es fundamental en la producción de progenitores que originan las BFU-E y las CFU-E (Bresnick y cols, 2010). En los ratones mutantes homocigotos Gata-2<sup>-/-</sup> la hematopoyesis se reduce drásticamente desencadenando una anemia severa y muerte de los animales (Tsai y cols, 1994). Durante el desarrollo hematopoyético embrionario se ha identificado como un factor indispensable para preservar la inmadurez de los precursores hematopoyéticos (Minegishi y cols, 1999; Minegishi y cols, 2003). Su papel en la homeóstasis del compartimiento de células *stem* se ha revelado en ratones heterocigotos (Gata-2<sup>+/-</sup>) con insuficiencia de Gata-2 en los que se observa una reducción en la población KSL (Rodrigues y cols, 2005). A diferencia del efecto en células primitivas su función es dispensable en las fases terminales de la diferenciación hematopoyética (Tsai y Orkin, 1997). Al parecer Gata-2 regula la supervivencia y proliferación de progenitores hematopoyéticos tempranos ya que en ratones defectuosos de GATA-2 (heterocigotos u homocigotos) se observa una extensa muerte celular y proliferación reducida de estos progenitores (Tsai y cols, 1994; Rodrigues y cols, 2005).

- Bmi-1

Una de las familias de genes que determina la capacidad de autorenovación de

las CSH son los genes *Policomb*. La actividad biológica de esta familia recae en el silenciamiento estable de grupos de genes a través de modificaciones epigenéticas (Valk-Lingbeek y cols, 2004). Los ratones deficientes en *Bmi-1* (*B lymphoma Mo-MLV insertion region 1*), proto-oncogen representante de los genes *Policomb*, tienen una insuficiencia proliferativa de las células hematopoyéticas (van der Lugt y cols, 1994). *Bmi-1* modula la expresión de genes relacionados con el ciclo celular, específicamente inhibiendo la expresión de *p16* y *p19* (Park y cols, 2003). En CSH de MO murina, la expresión de *Bmi-1* es alta, manteniéndose en los progenitores multipotentes y reduciéndose a medida que avanza la diferenciación hematopoyética (Hosen y cols, 2007). En ensayos de expresión de *Bmi-1* cuantificado por *Southern Blot* (usando cADN) se ha demostrado que células  $CD34^+$  de MO humana expresan mayores cantidades de *Bmi-1* que las células  $CD34^-$  (Lessard y cols, 1998).

- **Notch-1**

Los miembros de la familia de receptores transmembrana *Notch* se expresan en los precursores hematopoyéticos primitivos y sus ligandos se encuentran en la superficie de las células estromales (Walker y cols, 2001). Los genes *Notch-1* tienen un papel central en la supervivencia, proliferación y la diferenciación de las células hematopoyéticas (Milner y Bigas, 1999). Se ha encontrado que la expresión de *Notch-1* aumenta con la diferenciación mieloide, especialmente en los precursores de macrófagos (Jönsson y cols, 2001; Singh y cols, 2005). En estos estudios se demuestra que también los macrófagos diferenciados expresan altos niveles de *Notch-1* a nivel de ARNm y proteína (Jönsson y cols, 2001). Además se ha observado que la activación transitoria de *Notch-1* es suficiente para reducir la autorenovación y acelerar la diferenciación hacia progenitores restringidos granulocito-macrófago y de célula dendrítica (Schroeder y cols, 2003). Recientemente se ha observado que los receptores *Notch* también modulan la diferenciación megacariocítica (Cornejo y cols, 2011). Sin embargo hay evidencia de que la sobreexpresión de *Notch-1* mejora la expansión y generación de precursores linfoides y mieloides humanos (Varnum-Finney y cols,

2000). Los ratones con mutaciones condicionales de Notch-1/2 presentan una hematopoyesis normal mostrando la redundancia de otras vías para el mantenimiento del sistema hematopoyético (Ratke y cols, 1999, Mancini 2005). Los efectos de la expresión de Notch-1 en la diferenciación y autorenovación de CSH dependen de los estímulos del microambiente que rodean a las CSH (Ohishi y cols, 2002, Fernández-Sánchez y cols, 2011).

- HoxB4

HoxB4 pertenece a la familia de factores transcripcionales *Homeobox*, involucrados principalmente en el desarrollo embrionario. La sobreexpresión de este gen en células de la MO de ratones amplifica considerablemente las CSH *in vivo* sin alterar la diferenciación o inducir la transformación de las células (Sauvageau y cols, 1995). CSH humanas transducidas con HoxB4 se expanden *in vitro* y tienen capacidades de repoblación comparables a las CSH no manipuladas (Antonchuk y cols, 2002). Los ratones deficientes en HoxB4 desarrollan normalmente todos los linajes hematopoyéticos pero tienen números reducidos de CSH en el hígado y la MO fetal (Brun y cols, 2004).

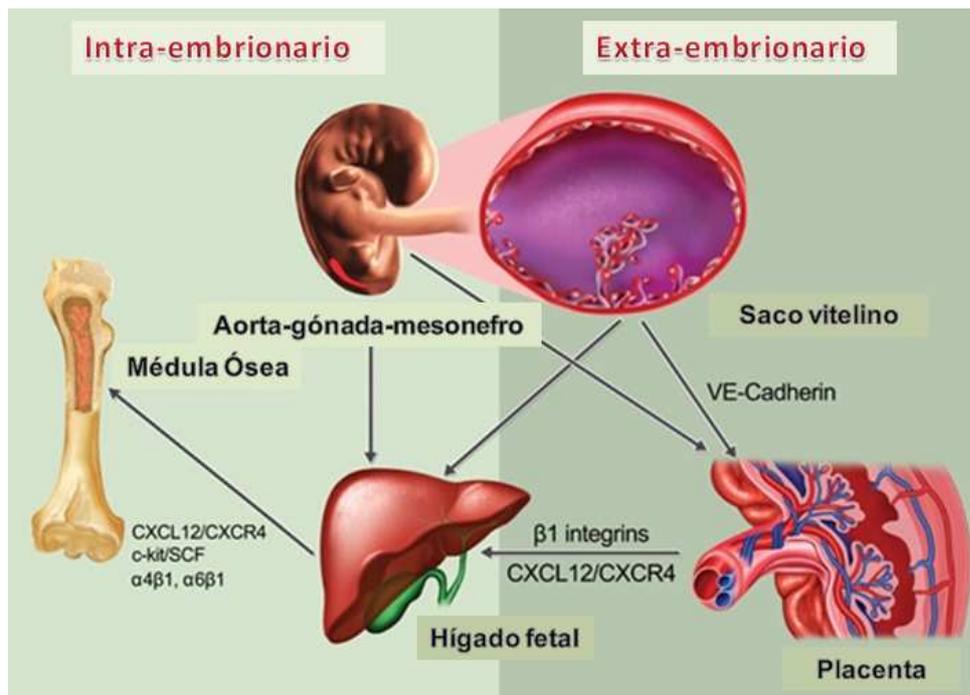
Teniendo en cuenta las características fenotípicas que definen las CSH y los progenitores hematopoyéticos, se continuará con la descripción de los procesos de circulación y tránsito de las CSH que son indispensables en el desarrollo del sistema hematopoyético. Se da especial atención a las interacciones entre diferentes moléculas que regulan la adhesión y migración celular.

## **1.2 Adhesión y migración de CSH durante el desarrollo hematopoyético.**

### **1.2.1 Circulación de CSH en la vida intrauterina**

El desarrollo de las CSH y del sistema hematopoyético involucra la capacidad celular de circulación y tránsito (vascular y no-vascular). Como se refiere en el capítulo de ontogenia de los precursores hematopoyéticos, el hígado fetal, como sitio principal de hematopoyesis, no genera CSH *in situ* sino que sirve como un

órgano de expansión de CSH y progenitores hematopoyéticos que han migrado desde la región aorta-gónada-mesonefro embrionario (Johnson y Moore, 1975) (Fig. 2). Desde el hígado fetal estas células migran hacia la MO, donde están las condiciones adecuadas para mantener la hematopoyesis en la vida adulta (Fig. 2).



**Figura 2. Circulación y tránsito de CSH en la hematopoyesis embrionaria y fetal.**

Las poblaciones de CSH definitivas emergen de los sitios hematopoyéticos intraembrionarios (Aorta-gónada-mesonefros) y extraembrionarios (saco vitelino). Al establecerse la circulación, las CSH viajan a través de los vasos y colonizan tanto la placenta como el hígado fetal. Este último se convierte en un órgano central para las hematopoyesis hasta que la MO es colonizada por las CSH. Las integrinas  $\beta$ -1 y el eje CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 regulan la migración de CSH desde la placenta hacia el hígado y la colonización de la MO. Modificado de Magnon y Frenette, 2008.

Los mecanismos que regulan estos procesos embrionarios y fetales de circulación y tránsito celular se conocen parcialmente gracias al modelo murino. Un representante fundamental en esta regulación es el eje quimiotáctico del factor derivado del estroma, SDF-1 (del inglés *Stromal Derived Factor-1*, también llamado CXCL12) y de su receptor CXCR4, los cuales se expresan muy temprano durante la etapa de gastrulación (MacGrath y cols, 1999). Las deficiencias tanto del receptor (CXCR4) como del ligando (SDF-1) resultan en fenotipos similares,

consistentes en deficiencia de células B en el hígado fetal y de la línea mielopoyética en la MO (Ma y cols, 1998). Su expresión en diferentes tipos celulares durante la embriogénesis y organogénesis ha generado interrogantes sobre los determinantes de la regulación específica dentro del sistema hematopoyético (MacGrath y cols, 1999). Al parecer factores adicionales actúan como adyuvantes en la función del eje SDF-1/CXCR4 determinando su especificidad en el sistema hematopoyético. Entre estos está c-kit o CD117, el cual se expresa altamente en CSH fetales y es receptor para el SCF. El SCF se expresa y secreta en los sitios embrionarios asociados con la migración hematopoyética (Matsui y cols, 1990). Este tiene un efecto sinérgico con el SDF-1 en la migración de CSH hacia el hígado (Christensen y cols, 2004). Igualmente, secretado por el hígado fetal, el Flt3L puede a su vez modular las señales generadas por el estímulo de la vía SDF-1/CXCR4 (Fukuda y cols, 2005).

Las integrinas son la familia de moléculas de adhesión que contribuye más a la hematopoyesis fetal y adulta (Tabla 2). La ablación condicional de las integrinas  $\beta 1$  en CSH embrionarias impide la reconstitución hematopoyética del hígado fetal (Hirsch y cols, 1996), del bazo y de la MO fetal (Potocnik y cols, 2000). Las integrinas  $\beta 1$  forman heterodímeros con diferentes moléculas  $\alpha$  y de esta manera interactúan con sus ligandos respectivos (Tabla 2). La integrina VLA-6, que tiene como ligando la laminina, regula la anidación de progenitores hematopoyéticos hepáticos fetales (Qian y cols, 2007).

**Tabla 2. Integrinas involucradas en los procesos migratorios hematopoyéticos.**

Integrina	Integrina	Nombre común	Ligandos
$\beta 1$ (CD29)			
	$\alpha 4$ (CD49d)	VLA-4	Colágeno, laminina, VCAM-1
	$\alpha 5$ (CD49e)	VLA-5	Fibronectina
	$\alpha 6$ (CD49f)	VLA-6	Laminina
$\beta 2$ (CD18)			
	$\alpha L$ (CD11a)	LFA-1	ICAM-1,2,3

La interacción de las integrinas  $\beta 1$  y  $\beta 2$  con sus respectivos ligandos es modulada a su vez a través de una señal dependiente de proteínas G asociada al receptor

CXCR4 (Bonig y cols, 2006; Chigaev y cols, 2003). Se ha encontrado que la señal inducida por el SDF-1 modula en uno o dos órdenes de magnitud la afinidad de la integrina VLA-4 (del inglés, *Very Late Antigen-4*) por el VCAM-1 (del inglés, *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) (Chigaev y cols, 2003). La combinación de las señales provenientes de integrinas, quemoquinas y citoquinas define la migración de las CSH. En la figura 2 se representan las integrinas, quemoquinas y citoquinas que han mostrado ser claves en la circulación y tránsito de las CSH durante el desarrollo hematopoyético. Se observa en la figura 2 que las señales de las integrinas  $\beta 1$ , la vía SDF-1/CXCR4 y citoquinas como el SCF son centrales en el proceso de migración y localización de las CSH modulando la circulación y tránsito de la placenta al hígado fetal y del hígado fetal a la MO (Magnon y Frennete, 2008).

### **1.2.2 Circulación de CSH en la vida posnatal**

La habilidad de las CSH y los progenitores hematopoyéticos de migrar continuamente a la MO se señaló seis décadas atrás en los experimentos de Jacobson y cols, que demostraron que la protección del bazo de los ratones durante una irradiación letal permitía la supervivencia de los mismos (Jacobson y cols, 1949). Posteriormente, otros autores demostraron que las CSH que migran desde el bazo pueden “anidar” y repoblar la MO espontáneamente (Lorenz y cols, 1951) abonando el terreno para el subsecuente uso clínico del trasplante de MO en pacientes sometidos a quimioterapia o radioterapia (Thomas y cols, 1957). Como se mencionó anteriormente, se ha postulado un modelo que establece los pasos en la migración de CSH y progenitores hematopoyéticos a la MO. El primer paso constituye tanto el reconocimiento del endotelio sinusoidal propio de la MO como la extravasación de las células. El segundo paso es el reconocimiento y asentamiento de las células dentro de la MO. Estos dos pasos se han confundido definiéndose en la literatura como *homing*, aquí traducido al castellano como anidación (Magnon y Frennete, 2008). Sin embargo la fisiología celular entre estos dos pasos difiere por lo que ciertos autores han definido como *homing*

únicamente al reconocimiento del endotelio y extravasación y *lodgment* a la acomodación medular permanente (Jetmore y cols, 2002; Yahata y cols, 2003).

- Moléculas involucradas en el reconocimiento endotelial y extravasación de CSH a la MO (*homing*)

Los estudios relacionados con el reconocimiento por parte de las CSH y los progenitores hematopoyéticos del endotelio de la MO han revelado un papel central de las selectinas y de las integrinas presentes en estos tipos celulares. Con estudios de inhibición de las interacciones lectina-carbohidrato, se demostró su relevancia en la interacción entre las CSH circulantes y el endotelio (Tavassoli y Hardy, 1990). Posteriormente, Papayannopoulou y cols, establecieron el papel determinante de la interacción VLA-4 y VCAM-1 en la anidación de progenitores hematopoyéticos (Papayannopoulou y cols, 1995). En estos ensayos se demuestra que los progenitores pre-tratados con anticuerpos contra CD49d o VCAM-1 reducen su anidación a la MO en un 50%. El bloqueo simultáneo de VCAM-1 y selectinas endoteliales disminuye aún más la anidación (Frenette y cols, 1998). Estudios posteriores demuestran que la anidación de los progenitores hematopoyéticos se independiza de las selectinas y recae en la interacción VCAM-1/VLA-4 en modelos post-irradiación (Mazo y cols, 2002). Estos hallazgos son consistentes con la expresión constitutiva de VCAM-1 y de E-selectina en las células endoteliales y reticulares de la MO además de la inducción postirradiación de VCAM-1 (Jacobsen y cols, 1996; Schweitzer y cols, 1996; Mazo y cols, 1999). Esta expresión constitutiva de VCAM-1 en el endotelio y retículo de la MO se diferencia de la de otros órganos hematopoyéticos como el bazo, los nódulos linfáticos entre otros (Pappayanopoulou y cols, 1995; Schweitzer y cols, 1996). Asimismo la integrina CD49d ( $\alpha 4$ , VLA-4) tiene un papel crucial en la anidación de CSH con capacidad de repoblación de largo plazo a la MO (Pappayanopoulou y cols, 1995). Las interacciones sinérgicas mediadas por E-selectina y VCAM-1 participan en el reclutamiento inicial de las CSH y progenitores hematopoyéticos haciéndolas inicialmente rodar y adherirse al endotelio de los sinusoides medulares (Frenette y cols, 1998; Katayama y cols, 2003).

La adhesión específica a través de E-selectina depende del grado de glicosilación de sus ligandos. La molécula CD44 se expresa en CSH y progenitores hematopoyéticos apropiadamente fucosilada, lo cual la convierte en el mayor ligando de E-selectina (Dimitroff y cols, 2001). También a través de su interacción con ácido hialurónico, la molécula CD44 contribuye en la anidación de progenitores hematopoyéticos (Avigdor y cols, 2004). Experimentos con progenitores hematopoyéticos deficientes en selectinas e integrinas muestran que tanto las integrinas  $\beta 2$  como las selectinas tienen un papel secundario en la anidación que solo se revela en ausencia de CD49d (VLA-4) (Papayannopoulou y cols, 2001). Estudios recientes han revelado que VLA-6 también participa en los procesos de anidación de progenitores hematopoyéticos en colaboración con VLA-4 (Qian y cols, 2006). Se ha propuesto un modelo jerárquico de las vías moleculares involucradas en la anidación de progenitores hematopoyéticos murinos en los que la interacción VLA-4/VCAM-1 ocupa un lugar preponderante seguida de la vía SDF-1/CXCR4 (Bonig y cols, 2006).

- Moléculas involucradas en la retención de CSH en la MO (*lodging*)

Una vez las CSH cruzan los sinusoides sanguíneos de la MO, estas células migran dentro del parénquima de la MO para localizarse en un sitio apropiado para mantener su supervivencia, autorenovación y diferenciación. Las dificultades técnicas asociadas al seguimiento de progenitores hematopoyéticos en el microambiente de la MO han limitado el avance en el conocimiento relacionado. Los experimentos de inyección intramedular son fundamentales para observar la retención de progenitores hematopoyéticos. Usando este tipo de experimentos se observa que el eje SDF-1/CXCR4, así como de las integrinas  $\beta 1$  (VLA-4, VLA-5 y VLA-6) son también fundamentales en la retención de progenitores dentro de la MO (Yahata y cols, 2003; Qian y cols, 2006). La migración transestromal de células CD34<sup>+</sup> aisladas de SCU depende de las integrinas VLA-4 y VLA-5 que se activan por la acción del SDF-1 (Peled y cols, 2000). Estudios de cinética de la anidación y mantenimiento de progenitores murinos dentro de la MO muestran que la anidación las primeras 4 horas depende de VLA-5 y LFA-1 (integrina  $\beta 2$ ,

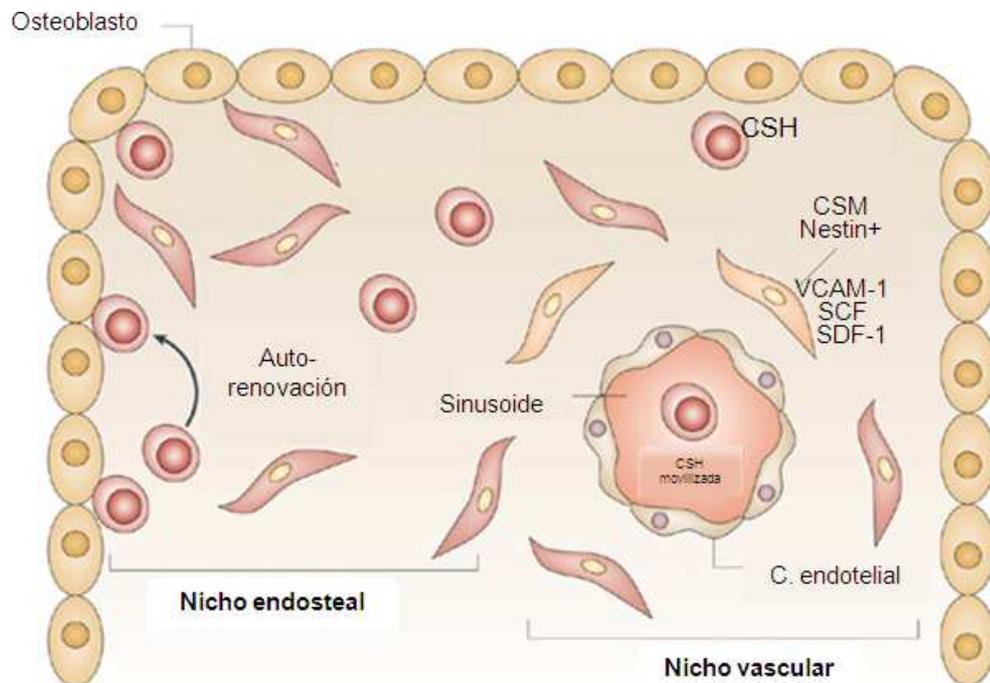
del inglés, *Lymphocyte Adhesion Molecule-1*) mientras que su retención a las 24 h es altamente dependiente de VLA-4 (Ausami y cols, 2001).

Por otra parte la interacción de las CSH y PHM con otros tipos celulares presentes en este microambiente han permitido la definición de las señales modulatorias presentes. Por tanto se describirán a continuación las interacciones intercelulares de las CSH en lo que se ha denominado el nicho hematopoyético.

### **1.2.3 Interacción de las CSH con los osteoblastos**

El enriquecimiento de CFU-S en el endosteo se tomó como la primera evidencia de que las CSH se localizan e interactúan con los osteoblastos de la MO (Lord y cols, 1975; Gong, 1978). La dependencia del número de CSH en la producción de osteoblastos que expresan N-caderina (Calvi y cols, 2003; Zhang y cols, 2003) también apunta hacia esta relación. Además la retención de progenitores en la MO se disminuye tras el trasplante de PHM deficientes en N-caderina (Hosokawa y cols, 2010). El mantenimiento y la expansión *in vitro* de CSH en co-cultivo con osteoblastos demuestran el papel regulatorio de los osteoblastos en la hematopoyesis (El-Badri y cols, 1998) que al parecer está mediado por factores solubles como la angiopoyetina-1 (Arai y cols, 2004) o factores adheridos a la membrana como a la forma transmembranal del SCF (Driessen y cols, 2003). La interacción entre osteoblastos y CSH a través de las moléculas VCAM-1/VLA-4, FBN/VLA-4/5 e ICAM-1/LFA-1 juega un papel en el mantenimiento de los progenitores hematopoyéticos (Jung y cols, 2005; Weinstein y cols, 1989). Además se reporta que la secreción de SDF-1 *in vivo* es un posible mecanismo de los osteoblastos para dirigir a las CSH dentro de estos nichos intramedulares (Jung y cols, 2006). Evidencia reciente de la independencia entre generación de CSH y la presencia de N-caderina o el número de osteoblastos (Kiel y cols, 2007; Kiel y cols, 2009) ha permitido interrogar la necesidad de los osteoblastos y los componentes del nicho endosteal en la retención y generación de CSH (Kiel y Morrison, 2008). A pesar de esta reciente reevaluación del papel de los osteoblastos como parte del nicho hematopoyético, es ampliamente aceptado que

el microambiente medular generado por los osteoblastos participa en el desarrollo hematopoyético. Este microambiente se denomina: nicho osteoblástico (Fig. 3).



**Figura 3. Localización de las CSH en la MO: interacciones de las CSH con las células estromales y los nichos vascular y endosteal.**

En la MO del hueso trabecular las CSM y células del estroma contribuyen a la formación del nicho hematopoyético. Se observan los nichos endosteal y vascular. Se representan las CSM características por la expresión de Nestina (Nestin<sup>+</sup>). Modificado de Uchelli y cols, 2008.

#### **1.2.4 Interacción de las CSH con las células endoteliales**

Recientemente se ha hablado de la existencia de un nicho vascular ya que las células endoteliales pueden mantener la hematopoyesis *in vitro* (Chute y cols, 2002; Liu y cols, 2003) además de la localización perivascular de CSH *in vivo* (Kiel y cols, 2005). La evidencia de que factores que regulan la angiogénesis a su vez regulan la hematopoyesis (como Tie2 o Angiopoietina-1) ha sustentado esta hipótesis (Kopp y cols, 2005; Kobayashi y cols, 2010; Butler y cols, 2010). El proceso de regulación de la retención de las CSH y progenitores hematopoyéticos dentro de la MO es un fenómeno dinámico regulado por diferentes factores celulares y acelulares que por su complejidad son de difícil evaluación (Kiel y cols, 2008). La dicotomía aparente entre los nichos endosteales y osteoblásticos

se ha amortiguado recientemente con la evidencia de la contigüidad entre ambos nichos que se observa en la tabla ósea craneal donde el endosteo es perivascular y las CSH se alojan en estos espacios (Lo Celso y cols, 2009).

### **1.2.5 Interacción de las CSH con células estromales y CSM.**

Las células estromales interactúan con las CSH y progenitores hematopoyéticos en la MO. El descubrimiento de esta importante interacción y sus implicaciones (Dexter y cols, 1977) resultó ser el fundamento experimental para la postulación de la teoría del nicho celular (Schofield, 1978). Las CSM se describieron inicialmente por Friedenstein en 1970 como una población rara de la MO capaz de formar colonias fibroblastoides (Friedenstein y cols, 1970). La frecuencia de esta población varía entre 1 y 10 CSM por cada 100.000 células recuperadas de MO (Castro-Malaspina y cols, 1980). En la literatura se han dado múltiples denominaciones para las células de la MO que se aíslan por adherencia al plástico y tienen morfología fibroblastoide (Jones y McGonagle, 2008). Esto ha llevado a cierta confusión sobre si los aislados reportados corresponden a la misma población (Tolar y cols, 2010). De hecho su acrónimo en inglés MSC puede definirse como célula estromal mesenquimal o célula *stem* mesenquimal (*Mesenchymal Stem/Stromal Cells*) (Tolar y cols, 2010). Con el propósito de homogenizar su mención en la literatura, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, del inglés *International Society for Cellular Therapy*) reservó el nombre de células “*stem*” mesenquimales estromales (CSM) para las células desprovistas de marcadores hematopoyéticos (CD34 y CD45) que expresan marcadores como CD105, CD90, CD73, CD13, CD106 (VCAM-1) y que tienen un potencial heterogéneo de diferenciación hacia linajes mesenquimales: específicamente adipogénico, osteogénico y condrogénico (Dominici y cols, 2006; Majumdar y cols, 1998, Pittenger y cols, 1999). La heterogeneidad de la población de células estromales de MO se ve reflejada en su capacidad de diferenciación (no todas estas células se diferencian) o en su capacidad de mantener progenitores hematopoyéticos (Wineman y cols, 1996; Wagner y cols, 2007). La capacidad de las CSM de mantener progenitores hematopoyéticos se revela

desde la fase embrionaria ya que las CSM se encuentran en la región AGM durante la aparición de los progenitores hematopoyéticos (Mendes y cols, 2005). Se ha demostrado que las CSM provenientes de MO son las más apropiadas para este el mantenimiento de progenitores hematopoyéticos (Wineman y cols, 1996). Recientemente, se identificó *in vivo* una subpoblación de CSM que tiene un papel crucial en la formación del nicho hematopoyético y que expresa una molécula típicamente neurogénica llamada Nestina (Méndez-Ferrer y cols, 2010). En este estudio se demuestra que esta subpoblación de CSM atrae las CSH y expresa altas cantidades de SDF-1, SCF y VCAM-1 (Méndez-Ferrer y cols, 2010) (Fig. 3). La expresión de VCAM-1 en células estromales es fundamental para el mantenimiento de CSH/PHM pues estos progenitores disminuyen luego del bloqueo de VCAM-1 en co-cultivos *ex vivo* (Teixidó y cols, 1992; Wang y cols, 1998). Las CSM en cultivo mantienen las CSH y PHM a través de la expresión de moléculas de adhesión, secreción de citoquinas y proteínas de la matriz extracelular (Van Overstraeten-Schlögel N y cols, 2006). Por esta razón se han utilizado no solo como coadyuvantes en trasplantes hematológicos (Le Blanc y cols, 2007) sino también como capa alimentadora en la expansión de CSH y PHM (Robinson y cols, 2006; Robinson y cols, 2011). Las CSM son actualmente “una revolución” en la medicina regenerativa por su versatilidad incluyendo la que tiene que ver con su papel modulador en el nicho hematopoyético (Bernardo y cols, 2011).

### **1.3 CSH como sustrato de trasplante hematológico**

La importancia terapéutica de las CSH se reconoció inicialmente en estudios donde se evaluó la letalidad de las irradiaciones en ratones y se demostró que tanto el blindaje del bazo como las inyecciones de MO protegían a los ratones irradiados (Jacobson y cols, 1949; Lorentz y cols, 1951). Estos hallazgos permitieron fundamentar la realización del primer trasplante de MO en humanos, que se hizo en una paciente de 4 años, la cual sobrevivió a la irradiación pero no al proceso oncológico que remitió meses después (Thomas y cols, 1957). Thomas y cols, continuaron por más de una década con la investigación de la

biología de los trasplantes y la histocompatibilidad complementando sus estudios con un modelo de perros irradiados (Epstein y cols, 1968), hasta que se consiguió con éxito el primer trasplante alogénico en humanos (Gatti y cols, 1968). A partir de este momento se abrió la posibilidad del trasplante de CSH de MO como terapia en múltiples enfermedades y la investigación sobre las condiciones indicadas para obtener un trasplante exitoso. Hasta ahora, la dosificación de los números totales de células nucleadas y de células CD34<sup>+</sup> en las unidades trasplantadas son los parámetros que se verifican para aumentar la probabilidad de éxito de un trasplante (Rubinstein, 2009). En el ámbito clínico de trasplantes, las diferencias de repoblación entre CSH y PHM mencionadas no son (por el momento) un problema terapéutico a resolver. Por el contrario la presencia de PHM, por sus características proliferativas revierten en la rapidez de recuperación de las formas sanguíneas maduras (Lanza y cols, 2001) y en consecuencia reducen la morbi-mortalidad temprana secundaria a infecciones o hemorragias (Yoo y cols, 2004). También se ha observado que a pesar del carácter transitorio de la reconstitución de la MO descrito en PHM, hay evidencia de que subpoblaciones de PHM pueden restablecer la función linfóide en pacientes con inmunodeficiencia combinada severa (Muller y cols, 2000) lo que permite su uso en reemplazos completos del sistema hematopoyético.

### **1.3.1 Trasplantes hematológicos: MO vs SCU**

El trasplante alogénico de CSH y PHM es el tratamiento más usado en enfermedades hereditarias hematológicas, no hematológicas, de origen oncológico y no oncológico. Durante 20 años la MO se usó como fuente única de progenitores hematopoyéticos, hasta que se reconoció la presencia de estos en sangre de cordón umbilical (SCU). La SCU se trasplantó exitosamente por primera vez a un niño con anemia de Fanconi (Gluckman y cols, 1989). Desde ese momento la SCU se ha usado como fuente alternativa de CSH para trasplantes (Broxmeyer y cols, 1989; Gluckman y cols, 1992) adquiriendo importancia por sus considerables y múltiples ventajas con respecto al injerto de MO, como su fácil obtención sin riesgo quirúrgico para el donante y la mayor

tolerancia a la disparidad de HLA, entre otras (Tabla 3) (Hows y cols, 1992; Mayani y cols, 1998; Kurtzberg, 1996).

**Tabla 3. Ventajas relativas del reemplazo hematológico con SCU.**

**Ventajas relativas del uso de SCU en trasplantes**

1. Obtención técnicamente sencilla.
2. Ningún riesgo quirúrgico para el donante.
3. Mayor tolerancia a la disparidad de HLA.
4. Mayor proporción relativa de progenitores primitivos.
5. Disponibilidad y rapidez en consecución de unidades.

La mayor desventaja de la SCU con respecto a la de MO es que el número total de CSH recuperadas por unidad de SCU es aproximadamente 1/10 de lo que se encuentra en cada unidad de MO. Esto puede afectar el resultado final de los trasplantes ya que el éxito de los mismos depende de la dosificación de CSH trasplantadas por kilogramo de peso (Weaver y cols, 1995; Johnsen y cols, 1999). Por esta razón, hasta ahora la mayoría de los trasplantes de SCU se ha realizado con éxito en población pediátrica (Sanz, 2004). Sin embargo su uso se ha extendido a adultos que no tienen un donante de MO HLA compatible (30% de todos los casos en Estados Unidos) en los que su deterioro es inminente en ausencia de trasplante (Sanz, 2004; Laughlin y cols, 2004; Rocha y cols, 2004). El amplio espectro de pacientes que pueden verse beneficiados sumado a la equivalencia en la efectividad con el de MO y las tasas de supervivencia de los mismos (Rocha y cols, 2001; Shi-Xia y cols, 2009) subraya la importancia terapéutica que ha adquirido el reemplazo hematológico con SCU. Desde el descubrimiento del llamado factor de crecimiento para células stem (SCF), se abrió la posibilidad de ampliar los números de CSH y PHM en aras de aumentar la efectividad de los trasplantes. Por esta razón hubo gran entusiasmo en usar este factor en combinación con otras citoquinas para lograr lo que se denominó la “expansión” de CSH. A continuación se describirán algunos de los hallazgos relacionados con los efectos de la expansión de CSH en los trasplantes.

### **1.3.2 Expansión de CSH con citoquinas y trasplante hematológico**

Como se anticipó, a partir del descubrimiento del SCF múltiples factores de crecimiento se probaron para aumentar los números de CSH y progenitores hematopoyéticos (Hofmeister y cols, 2007). Entre estos factores se cuentan el TPO, Flt-3L, las interleuquinas -1, -3 y -6, el factor estimulante de colonias granulocito (G-CSF) y el factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) (Hofmeister y cols, 2007). De las anteriores, las llamadas citoquinas de acción temprana (TPO, SCF y Flt3L) mantienen y amplifican progenitores hematopoyéticos primitivos potenciando mutuamente sus efectos (Herrera y cols, 2001; Hofmeister y cols, 2007). No tardó entonces la evaluación de ensayos clínicos de fase I, para probar que la administración de CSH expandidas en suspensión con citoquinas no resultaba tóxica ni incrementaba el riesgo inherente al trasplante (Alcorn y cols, 1996). Sin embargo, el estudio de fase II no proporcionó los resultados esperados, ya que todos los pacientes transfundidos con unidades expandidas debieron ser re-infundidos con unidades no expandidas para aumentar el conteo de neutrófilos post-trasplante (Holyoake y cols, 1997). Tampoco se dieron mejores resultados al combinar unidades expandidas con no expandidas, a pesar del aumento sustancial de los conteos celulares de los injertos (Jaroskac y cols, 2003). Una revisión reciente demuestra que los trasplantes en humanos con unidades de SCU expandidas con citoquinas han fallado debido a que estas unidades tardan en reconstituir la hematopoyesis de los pacientes transfundidos (Kelly y cols, 2009).

Estos hallazgos combinados con la evidencia de la pérdida de la expresión de marcadores hematopoyéticos (CD34 principalmente) durante el cultivo de expansión permitían especular que el fracaso de los trasplantes con células expandidas es el resultado de la falla en la repoblación por la diferenciación de estas células (Srour y cols, 1999). A pesar de ser una posibilidad bastante aceptada, nuevas evidencias han apuntado a que el problema pueda ser otro distinto de la diferenciación. Recientemente se observó que al co-trasplantar células CD133<sup>+</sup> expandidas y no expandidas, a pesar de preservar el marcador de primitividad CD133<sup>+</sup>, solo las células no expandidas producen repoblación de la MO a largo plazo (Kelly y cols, 2009). Estos hallazgos confirman lo que se

observó en ratones xenotrasplantados en donde se muestra que las CSH humanas expandidas tienen capacidad de generar todos los linajes sanguíneos pero tardan en repoblar la MO (Güenechea y cols, 1999; Möbest y cols, 1999).

Algunos estudios han demostrado que las CSH expandidas no se localizan eficientemente en la MO (Ahmed y cols, 2004; Dooner y cols, 2004; Cerny y cols, 2002). En uno de estos estudios, se compara el trasplante de células CD34<sup>+</sup> expandidas y no expandidas (usando diferentes muestras y diluciones) encontrando menores números de CSH expandidas en la MO después de 24 h de su inoculación (Ahmed y cols, 2004). El anterior estudio mejora las condiciones experimentales del de Herrera y cols, en donde se observa (mostrando un solo ensayo) que la expansión no afecta la colonización de la MO (Herrera y cols, 2001). Ahmed y cols, encuentran además que cuando se trasplantan CSH expandidas la concentración de estas células en otros tejidos (como los pulmones) está aumentada (Ahmed y cols, 2004). Este hallazgo también fue reportado por otros investigadores que muestran que las células expandidas y trasplantadas persisten en el pulmón hasta por ocho semanas (Cerny y cols, 2002; Dooner y cols, 2004). Experimentos de inyección intramedular de CSH expandidas muestran que estas repueblan la MO inyectada, pero son incapaces de circular y migrar a otros lugares de hematopoyesis, como si lo hacen las células no expandidas (Yamamura y cols, 2008).

Gran cantidad de evidencia demuestra que el cultivo de células CD34<sup>+</sup> con citoquinas de acción temprana modifica las propiedades de adhesión, migración y motilidad de estas células (Ramírez y cols, 2001; Giet y cols, 2001; Gothot y cols, 2003; Dravid y cols, 2002; Giebel y cols, 2004; Bonig y cols, 2006; Yamamura y cols, 2008). Estos estudios, realizados por diferentes grupos, revelan cambios fundamentales en la expresión y activación de moléculas como VLA-4, VLA-5, LFA-1 y CXCR4, que como se ha ilustrado son cruciales en la localización adecuada de las CSH dentro de la MO.

Se ha demostrado con progenitores hematopoyéticos murinos y humanos que la expansión disminuye selectivamente la migración mediada por la interacción VLA-

4/VCAM-1 (Bonig y cols, 2006; Foguene y cols, 2009). Por otra parte, el cultivo de expansión con citoquinas aumenta la motilidad de las CSH, polarizándolas por acción de la vía fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) (Giebel y cols, 2004). Las CSH expandidas aumentan la quimiotaxis mediada por la señal de proteínas G inducida por la estimulación del receptor CXCR4 (Bonig y cols, 2006). Se ha postulado que la expansión de progenitores hematopoyéticos con citoquinas induce un cambio en el uso de las vías moleculares para la anidación de las CSH en la MO: en las células frescas es preponderante la interacción VLA-4/VCAM-1, mientras que en las expandidas son las vías quimiotácticas las que predominan (Bonig y cols, 2006). Recientemente, Foguene y cols, demostraron que las células CD34<sup>+</sup> aisladas de SCU expandidas con citoquinas desligan su proceso de localización en la MO de las señales mediadas por VLA-4 y CXCR4 (Foguene y cols, 2009). La evidencia anteriormente descrita demuestra que la expansión de CSH en cultivo con citoquinas afecta las vías que regulan la circulación y el tránsito de las CSH que permiten que estas células aniden sus nichos naturales.

### **1.3.3 Expansión de CSH en co-cultivo con CSM y trasplante hematológico**

En los últimos años se ha comprobado con suficiencia que la expansión de CSH y PHM usando citoquinas de acción temprana es mucho más eficiente usando CSM o las llamadas células estromales de MO como capa alimentadora (Huang y cols, 2007; Fei y cols, 2007, Robinson y cols, 2006; Walenda y cols, 2009, Walenda y cols, 2011). El resultado de los trasplantes de CSH después de la expansión en co-cultivo con CSM es significativamente mejor que su control sin CSM (Huang y cols, 2007; Walenda y cols, 2011). Este efecto coadyuvante en los xenotransplantes hematopoyéticos se ha atribuido a una mejor preservación de un fenotipo inmaduro en las CSH (Fei y cols, 2007, Walenda y cols, 2011) pero también al incremento en la anidación de CSH en MO y bazo (Chan y cols, 2007). Por otra parte la co-inyección de CSM ha mostrado utilidad clínica como coadyuvante en trasplantes de CSH (Koç y cols, 2000; Lazarus y cols, 2005; Le Blanc y cols, 2007) así como en xenotransplantes (Noort y cols, 2002; Lee y cols,

2008; Delalat y cols, 2009). Los resultados prometedores de los xenotransplantes de CSH pre-cultivadas con CSM y expandidas con citoquinas dieron pie para probar esta estrategia en estudios clínicos. Actualmente un estudio, que evalúa la seguridad y eficacia de trasplantar CSH precultivadas con CSM y citoquinas de acción temprana (adicionando G-CSF), está en curso (desde el año 2007) presentando resultados parciales muy alentadores (Robinson y cols, 2011).

El contraste de los resultados de los trasplantes de CSH que comparan tratamientos de expansión con citoquinas solas o sobre una capa alimentadora de CSM (Kelly y cols, 2009), permite presumir que existen cambios celulares que promueven la repoblación medular de las CSH. La evidencia de un deterioro de las capacidades migratorias y adhesivas en moléculas cruciales que afectan la anidación de las CSH a la MO sugiere un mecanismo subyacente de restauración.

En este trabajo se plantea la hipótesis de que las alteraciones en las capacidades migratorias, adhesivas y de motilidad celular inducidas en las CSH por el cultivo de expansión con citoquinas, a su vez pueden ser moduladas por el co-cultivo con CSM.

Como primera fase de la aproximación experimental se optimizaron los procedimientos de aislamiento inmunomagnético de células CD34<sup>+</sup> de SCU y de CSM de MO. En esta fase del estudio se estableció un protocolo de selección costo-efectivo de muestras de SCU para el aislamiento de los números de células CD34<sup>+</sup> necesarios para su evaluación experimental (Perdomo-Arciniegas y Vernot, 2012, Artículo N°1). Se normalizaron las condiciones del cultivo de expansión con citoquinas de las CSH evaluando los marcadores CD34<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>, Gata-2, Notch-1 y Bmi-1. La normalización de la expansión de células CD34<sup>+</sup> se complementó con ensayos de proliferación medidos por la dilución de CFSE (carboxifluoresceína succinimidil ester) y ensayos de clonogenicidad primaria atestiguando la presencia de células divididas con una mínima diferenciación.

Luego de este paso se estableció el modelo de co-cultivo entre CSH y CSM con citoquinas de acción temprana y se valoró comparativamente la migración y adhesión in vitro mediada por VCAM-1, FBN, ICAM-1 y por el eje quimiotáctico SDF-1/CXCR4. La expresión diferencial de moléculas de adhesión se estableció por citometría de flujo y qRT-PCR. Además se establecieron los factores que influyen la expresión y localización subcelular diferencial de LFA-1 en CSH co-cultivadas y no co-cultivadas. Se valoró la motilidad en tiempo real de las células co-cultivadas y las no co-cultivadas con CSM además de algunas de las vías de señalización intracelular involucradas en ese proceso.

Los resultados de este trabajo indican que el co-cultivo con CSM de células CD34<sup>+</sup> en expansión modula las respuestas de movilidad y adhesión a agentes quimiotácticos favoreciendo una migración más específica mediada por VCAM-1 (Perdomo-Arciniegas y Vernot, 2011, Artículo N° 2). En estas células se encontró que prevalece la migración mediada por VCAM-1 sobre los estímulos quimiotácticos. La señalización a través de LFA-1, la vía PI3K/Akt, Bmi-1 y la menor expresión de CXCR4 parecen estar involucradas en esta modulación.

## **2. OBJETIVOS**

Establecer los efectos del co-cultivo con células *stem* mesenquimales (CSM) en las propiedades migratorias y adhesivas de células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas de acción temprana.

### **2.1 Objetivos específicos**

1. Optimizar las condiciones de aislamiento de células CD34<sup>+</sup> de SCU y de células *stem* mesenquimales (CSM) de MO humana.
2. Establecer el tiempo de cultivo de células CD34<sup>+</sup> con citoquinas de acción temprana para obtener expansión con mínima diferenciación.
3. Establecer las condiciones del co-cultivo de expansión de células CD34<sup>+</sup> y CSM determinando el grado de diferenciación y proliferación de forma comparativa con las células CD34<sup>+</sup> expandidas solo con citoquinas.
4. Comparar la migración y adhesión de células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas en presencia o ausencia de CSM.
5. Establecer la expresión diferencial de moléculas de adhesión entre células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas en presencia o ausencia de CSM.
6. Determinar los factores que influyen la expresión diferencial de moléculas de adhesión entre células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas en presencia o ausencia de CSM.
7. Comparar la motilidad en tiempo real de células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas en presencia o ausencia de CSM.
8. Determinar la actividad de las vías Akt y Erk en células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas en presencia o ausencia de CSM

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Recolección de muestras de SCU.**

La recolección de SCU se realizó mediante el procedimiento aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, previo a la firma del consentimiento informado de la madre (Anexo 1). Se seleccionaron gestantes con embarazo único, a término (más de 36 semanas) y pruebas serológicas negativas para Virus de Inmunodeficiencia Humana, Hepatitis B, Sífilis y Toxoplasmosis. Se seleccionaron los donantes nacidos por parto vaginal, excluyendo cesáreas. El parto se atendió de acuerdo con las prácticas clínicas cotidianas del Instituto Materno Infantil, incluyendo el pinzamiento del CU después del cese de sus pulsaciones. En más del 93% de los partos incluidos se realizó un pinzamiento tardío del CU (> 3 min). Las muestras de SCU se recogieron antes del alumbramiento por personal entrenado. Previo a la recolección de la muestra, se realizó antisepsia con yodopovidona en el sitio de punción. La muestra se recolectó de la vena del CU por medio de un sistema cerrado con tubos venojet estériles heparinizados (tapa verde, BD, Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA). Las muestras se procesaron para aislar la fracción de células de baja densidad (FCBD) en un tiempo menor a las 12 horas. Contando la estandarización de los procedimientos se procesaron 190 muestras.

#### **3.2 Recolección y almacenamiento de datos clínicos.**

Para cada una de las muestras se recogieron los siguientes datos clínicos tanto de la gestante como del neonato: edad materna, edad gestacional (cálculo obstétrico), fórmula obstétrica (número de gestaciones y partos anteriores), hora del parto, sexo, peso y talla del neonato. Adicionalmente se registró si se hace un pinzamiento del CU diferente al practicado normalmente (>3 min). El almacenamiento de estos datos se realizó en una matriz del programa Microsoft Access (Microsoft Corporation).

### 3.3 Aislamiento de la fracción de células de baja densidad (FCBD) de SCU

Las muestras de SCU se separaron por centrifugación a  $800 \times g$  por 30 minutos retirando cuidadosamente la capa de leucocitos de la interfase (*buffy coat*). Para el aislamiento de la FCBD, se sirvieron 24 ml de medio RPMI incompleto (RPMI-1640 (GIBCOBRL, Grand Island, NY, USA) suplementado con 25 mM HEPES (Sigma, St Louis, MO, USA), 32 mM bicarbonato de sodio (Sigma, St Louis, MO, USA), 0,11 g/L ácido pirúvico (Sigma, St Louis, MO, USA) y vitaminas (GIBCOBRL, Grand Island, NY, USA), pH 7,4) en un tubo estéril de 50 ml. El *buffy coat* colectado se resuspendió en el RPMI incompleto. Esta suspensión se sirvió lentamente en tubos de vidrio estériles (tapa roja, BD, Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA) que contenían cada uno 2 ml de Ficoll-Hypaque (densidad 1.077 g/ml, Histopaque, Sigma, St Louis, MO, USA) completando en cada tubo 7 ml. Luego los tubos se centrifugaron a  $500 \times g$  durante 30 min. La interfase de la FCBD que contenía un alto porcentaje de eritrocitos (Fig. 4), se recuperó con pipetas de transferencia estériles dispensándola en un tubo con RPMI incompleto. Posteriormente la suspensión celular se lavó 3 veces en RPMI incompleto (centrifugando a  $500 \times g$  durante 7 min). La FCBD se resuspendió en 10 ml de PBS (*Phosphate Buffer Solution*). El conteo celular automatizado se realizó con el hematocitómetro Sysmex KX-21 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) (Fig. 4). Se determinó la viabilidad celular mediante la exclusión del colorante azul de Tripán.

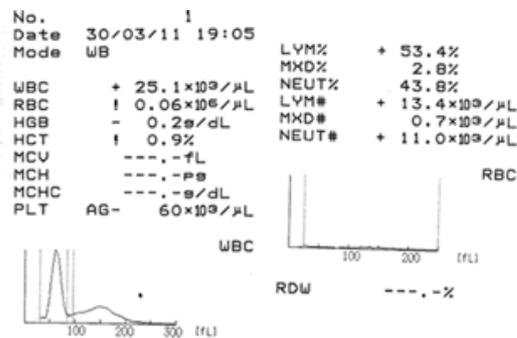


Figura 4. Conteo automatizado de la FCBD.

Parámetros que se tuvieron en cuenta del reporte del hematocitómetro. WBC: número de leucocitos. RBC: número de eritrocitos. LVM%: Porcentaje de linfocitos. LVM#: número de linfocitos.

### **3.4 Separación inmunomagnética de células CD34<sup>+</sup> de SCU**

Por cada FCBD se calculó el promedio entre el número de leucocitos (WBC) (Fig. 4) y el número de linfocitos (LYM#) (Fig. 4). Con base en este promedio multiplicado por 10 (ml de volumen de PBS), se calculó el volumen a añadir de los componentes del *kit* de purificación de células CD34<sup>+</sup> (CD34 isolation kit, Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) como se describe a continuación. La FCBD se centrifugó a 500 x g por 7 min y se descartó completamente el sobrenadante. Se adicionaron 100 µl de “*buffer* de bloqueo” (PBS/ 2 mM EDTA / 0,5% BSA) frío y 100 µl de solución bloqueo (anticuerpo anti-Fc, *CD34 isolation kit*, Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) por cada 1 x 10<sup>8</sup> células. Esta suspensión celular se incubó durante 15 min a 4°C. Se adicionaron 100 µl de solución de perlas magnéticas anti-CD34<sup>+</sup> (clon QBEND10, epítotope de clase I) del *kit* por cada 1 x 10<sup>8</sup> células. La mezcla celular con las perlas magnéticas se incubó durante 50 min a 4°C y se adicionó a una columna LS (Miltenyi Biotec) acoplada al magneto (MidiMACS™, Miltenyi) previamente lavada con 5 ml de “*buffer* de bloqueo”. Se vertió la muestra en la columna y se lavó con 40 ml de “*buffer* de bloqueo” frío, el volumen resultado de la elución de esta columna (que contiene las células CD34<sup>+</sup>) se recogió en un tubo de 50 ml de capacidad. Para recuperar las células CD34<sup>+</sup> se retiró la columna del magneto y sobre un tubo de 15 ml se vertieron 10 ml de “*buffer* de bloqueo”. Finalmente se aplicó el émbolo obteniendo aproximadamente una suspensión de 10 - 14 ml que contiene las células CD34<sup>+</sup>. La suspensión de células CD34<sup>+</sup> se lavó 3 veces en RPMI 1640. El conteo celular se realizó en cámara de *Neubauer*, determinando el porcentaje de viabilidad mediante la exclusión del colorante azul de Tripán. Se determinó la pureza por citometría de flujo marcando con un anticuerpo contra CD34 marcado con alofococianina (APC) (Clon AC136, Miltenyi, epítotope de clase III).

### **3.5 Aislamiento de células stem mesenquimales**

Las CSM se aislaron de muestras de MO de pacientes sometidos a cirugía ortopédica en el Hospital de la Misericordia de Bogotá D.C., previo

consentimiento informado del paciente o de su acudiente en el caso de menores de edad (Anexo 2). Todos los procedimientos se aprobaron por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y del Hospital de la Misericordia. Se recibió del médico ortopedista tratante un volumen de MO aproximado entre 1 y 5 ml, recuperado de las osteotomías el cual fue colectado en un tubo estéril de 50 ml que contenía 200  $\mu$ l de PBS más 0,03 M EDTA pH 8.5 (Sigma). En algunos casos se recibieron también espículas de hueso de las osteotomías, las cuales se maceraron y filtraron (con gasa estéril) para el aislamiento de CSM. De la suspensión celular resultante se aisló la FCBD de la misma forma que en SCU (ver atrás). El conteo celular automatizado se hizo por medio del Sysmex KX-21 (Sysmex Corporation). Se determinó la viabilidad mediante la exclusión del colorante azul de Tripán en cámara de Neubauer. Las células aisladas en la FCBD se sembraron en una caja de 75 cm<sup>2</sup> (USAScientific, Ocala, FL, USA) a una densidad máxima de  $7 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en 14 ml de IMDM suplementado con Glutamax (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, USA), piruvato de sodio 1% (Sigma), 1% aminoácidos no esenciales (Sigma) y 10% SFB (Microgen Ltda, Colombia) (IMDM completo). Se incubaron durante dos días a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad del 95%, se retiró el sobrenadante y se añadió nuevamente IMDM completo. Se verificó la presencia de células adherentes con apariencia fibroblastoide y se cuantificó la confluencia relativa. Cada tercer o cuarto día se reemplazó completamente el medio retirando los restos de células no adherentes. Al alcanzar una confluencia de CSM de más del 80% las células se despegaron de la caja para realizar el primer pase. Para esto, las células se incubaron durante 5 min a 37°C con 7 ml de una solución de PBS suplementada con 0,25% de tripsina de páncreas bovino (Sigma) y EDTA (Gibco) a 1 mM. Para inactivar la tripsina se añadieron 7 ml de 20% SFB/PBS. Se recuperó la suspensión celular en un tubo estéril de 15 ml (USAScientific, Ocala, FL, USA) y se centrifugó a 500 x g durante 7 min. Se descartó el sobrenadante y se añadió IMDM completo. La suspensión celular se lavó tres veces y se contó en cámara de Neubauer para luego sembrar aproximadamente  $3 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>.

### **3.6 Congelamiento de CSM**

Alrededor de  $5 \times 10^5$  CSM de segundo pase se congelaron en medio IMDM suplementado con Glutamax (Gibco), 30% SFB (Microgen Ltda, BOG, Colombia) y 10% de dimetilsulfóxido (Sigma) en crioviales de 2 ml (Corning). Los viales se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 2 h, a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante la noche y posteriormente se transfirieron a nitrógeno líquido. Todas las muestras congeladas se usaron con menos de un año de almacenamiento.

### **3.7 Ensayos de multipotencialidad de CSM**

Para determinar la capacidad osteogénica de las CSM, en placas de 24 pozos (USBiological) se sembraron  $1 \times 10^4$  células/pozo suspendidas en 1 ml de medio osteogénico. Como ha sido reportado antes (Pittenger y cols, 1999), el medio osteogénico está definido como IMDM suplementado con Glutamax (Gibco), 10% de SFB (Micro gen Ltda), 1 mM de piruvato de sodio (Sigma), 1 X aminoácidos no esenciales (Sigma), 1 X penicilina/ estreptomycin/ anfotericina B (Gibco), 50  $\mu\text{M}$  de ácido ascórbico (Sigma), 10 mM de  $\beta$ -glicerofosfato (MPBiomedical), 200 nM de dexametasona (Sigma). Cada tercer o cuarto día el medio osteogénico se retiró y se renovó con 1 ml de medio nuevo hasta completar 21 días. Al final del cultivo se retiró el medio y se fijaron las células con paraformaldehído al 4% durante 2 min. Se lavó con TBS tween al 0,05% (TBST). Se cubrió con solución activadora (0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl, pH 9,5) durante 10 min a temperatura ambiente (TA). Para la tinción de fosfatasa alcalina se añadió a cada pozo 1 ml de solución activadora con 50 mg/ml NBT y 50 mg/ml de BCIP (Promega) y se incubó entre 5 a 10 min a TA. Posteriormente se detuvo la reacción lavando con TBS dos veces.

Para determinar la capacidad adipogénica de las CSM,  $2 \times 10^4$  células/pozo se sembraron en placas de 24 pozos (USBiological), en medio adipogénico definido como IMDM suplementado con Glutamax (Gibco), 20% de SFB (Micro gen Ltda), 1 mM de piruvato de sodio (Sigma), 1 X aminoácidos no esenciales (Sigma), 1 X

penicilina/ estreptomycin/ anfotericina B (Gibco), 500  $\mu$ M de isobutil-metilxantina (Sigma), 200  $\mu$ M de indometacina (Sigma), 100 ng/ml de insulina (Sigma). El medio adipogénico se retiró y renovó cada tercer o cuarto día. Al cabo de 21 días de cultivo se retiró el medio del pozo y las células se fijaron con paraformaldehído al 10% durante 30 min a TA. Se retiró el PFA y se lavó con agua destilada (1 vez). Posteriormente las células se permeabilizaron con 60% de isopropanol (Merck) por 5 min a TA. Se añadió a cada pozo una solución de aceite rojo al 0,15% (Sigma) disuelto en isopropanol al 60%, con la que se incubó durante 15 min a TA. Esta solución se retiró y se lavó con agua destilada.

Para determinar la capacidad condrogénica de las CSM,  $3 \times 10^5$  células/pozo se siembran en placas de 24 pozos (USBiological) suspendidas en medio condrogénico definido como IMDM suplementado con Glutamax (Gibco), 1 mM de piruvato de sodio (Sigma), 1 X aminoácidos no esenciales (Sigma), 1 X penicilina/estreptomycin/ anfotericina B (Gibco), 50  $\mu$ M de ácido ascórbico (Sigma), 100 nM de dexametasona (Sigma) 10 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1) (Sigma) y 5 ng/ml de FGF- $\beta$  (fibroblast growth factor- $\beta$ ) (Sigma). Se retiró el medio condrogénico, renovándolo cada tercer o cuarto día. Al cabo de 21 días de cultivo se retiró el medio del pozo y se incubaron las células con PFA al 4% 3 min a TA. Se retiró el PFA y se lavó con agua destilada (1 vez). Se añadió en los pozos etanol (Merck) al 70%, se incubó un minuto a TA y se lavó con agua destilada. Se repitió el anterior procedimiento una vez y se añadió etanol al 95%. Se incubó por 5 min a TA, se retira el etanol y se añadió una solución de Safranina-O (Sigma) o de Toluidina-O (Sigma) al 1%, incubando durante 15 min a TA. Esta solución se retiró y se lavó con agua destilada.

### **3.8 Expansión de células CD34<sup>+</sup> con citoquinas de acción temprana.**

Las células frescas CD34<sup>+</sup> se sembraron en cajas de 24 pozos, a una densidad aproximada de  $1 \times 10^5$  células por pozo y por ml de medio completo (RPMI 1640 más SFB al 10%). Las células se cultivaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio completo suplementado con citoquinas de acción temprana SCF a 50 ng/ml, TPO

a 50 ng/ml y Flt3L a 50 ng/ml durante 3, 5 y 14 días. Cada cuarto día el volumen correspondiente a un pozo se dividió en dos pozos agregando nuevo medio de cultivo para completar el volumen inicial.

### **3.9 Condiciones de co-cultivo de CSM y células CD34<sup>+</sup> o células REH**

Alrededor de  $3 \times 10^4$  CSM (entre tercer y quinto pase) por pozo se sembraron en placas de 24 pozos y se cultivaron en IMDM más Glutamax (Gibco) con SFB al 20% a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar una confluencia del 90%. Posteriormente células CD34<sup>+</sup> recién aisladas de SCU se cultivaron sobre las CSM a una densidad entre  $1- 1,5 \times 10^5$  célula/pozo en medio RPMI 1640 completo.

En algunos ensayos de co-cultivo se usaron células REH (leucemia linfoblástica aguda, línea celular pro-B, ATCC) que se cultivaron sobre las CSM a una densidad entre  $1- 1,5 \times 10^5$  célula/pozo en medio RPMI 1640 completo durante tres días. Como control se usaron células REH en medio RPMI completo sin la presencia de CSM.

### **3.10 Marcación de células CD34<sup>+</sup> con CFSE**

Células CD34<sup>+</sup> recién aisladas de SCU se incubaron durante 10 min a 37°C en 500 µl de buffer 0,1% BSA/PBS con carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester (CFSE) (CellTrace CFSE Cell Proliferation kit, Molecular Probes, Invitrogen) a una concentración final de 5 µM. Luego se añadieron 10 ml de RPMI completo (suplementado con SFB al 10%) y se incubó durante 5 min en hielo. Se lavó con RPMI, centrifugando tres veces a  $400 \times g$  y se resuspendió en RPMI completo. Se incubó por otros 30 min a 37°C con el medio completo para retirar el excedente de CFSE. En algunos experimentos el pico de células no divididas se determinó preincubando las células durante 3 h con mitomicina C (Sigma) a una concentración de 10 µg/ml. Se evaluó la viabilidad de los cultivos por medio del recuento en cámara de Neubauer con 0,2% de azul de Tripán.

### **3.11 Definición de las condiciones de cultivo**

Células CD34<sup>+</sup> recién aisladas de SCU marcadas o no con CFSE se sembraron en placas de cultivo 24 pozos a una densidad entre 1- 1,5 x 10<sup>5</sup> células/pozo en el medio descrito RPMI 1640 completo a 37°C y 5% CO<sup>2</sup>, en tres condiciones principales:

- 1- Co-cultivo con CSM sin citoquinas (HM)
- 2- Co-cultivo con CSM con citoquinas (HMC)
- 3- Cultivo libre de CSM con citoquinas (HC)

Las concentraciones de citoquinas son las que se describen en el punto 3.8 de este trabajo. En algunos experimentos se utilizó un sistema de co-cultivo sin contacto intercelular con CSM sembradas en placas de 24 pozos, añadiendo las células CD34<sup>+</sup> en la cámara superior del sistema transwell (poro de 0,4 µm) (HMC, *transwell* 0,4 µm) (6.5 mm diameter, Corning Costar, Cambridge, MA, USA).

### **3.12 Condiciones de cosecha de las células CD34<sup>+</sup> co-cultivadas con CSM**

En el caso de células CD34<sup>+</sup> previamente marcadas con CFSE, todas las células se cosecharon por pipeteo repetitivo sistemático recuperando el medio servido en un tubo estéril de 15 ml (USA Scientific). Adicionalmente se hicieron tres lavados con 1 ml de PBS, verificando a través del microscopio invertido que en los pozos cosechados las células se retiraran en su totalidad.

Para los análisis de PCR en tiempo real, clonogenicidad primaria, migración y adhesión celular en los que las células CD34<sup>+</sup> no se marcaron con CFSE y estaban en co-cultivo con CSM, las células no adherentes se cosecharon dejando adheridas las CSM. Se retiró suavemente el medio con células en suspensión, lavando tres veces cada pozo con 1 ml de PBS (sin mezclar con la pipeta). Para retirar las células adherentes se hizo un lavado final con PBS /1mM EDTA. En

algunos casos la fracción de CSM se cosechó con PBS más 0,25% de tripsina y 1mM de EDTA.

### **3.13 Determinación de la expresión de moléculas por citometría de flujo**

Después de los tratamientos señalados  $6 - 8 \times 10^4$  células se resuspendieron en 100  $\mu$ l de PBS con 2% BSA y se transfirieron a un tubo de polipropileno con la cantidad de anticuerpo titulada previamente como óptima en cada ensayo. Los anticuerpos monoclonales usados fueron anti-CD34PE (581, Caltag), anti-CD34APC (AC136, Miltenyi Biotec), antiCD11aPE (MEM25, Caltag), antiCD11aAPC (H111, BD), anti-CD44PE (MEM85, Caltag) anti-CD54FITC o antiCD54PE (MEM111, Caltag), anti-CD49dAPC (MZ1824A9, Miltenyi Biotec), anti-CD133 (AC133, Miltenyi Biotec), anti-CD106PE (Clon STA, AbD Serotec, Raleigh, NC, USA) o (5110C9, BD), CD105 FITC (AbD Serotec), CD90-FITC (BD Pharmingen), CD73-PE (BD Pharmingen), HLA-I-FITC (Caltag, Invitrogen), CD13-PE (BD Pharmingen), CD34-APC (Miltenyi), CD45 PerCP (BD Pharmingen), HLA-DR FITC (Caltag, Invitrogen), anti-CXCR4PE (12G5, Caltag), CD49e-PE (BD). Los anticuerpos indirectos usados fueron anti-CD49e (SAM-1, Zymed, Invitrogen) y anti-CD18 (MEM148, Abcam). Se incubaron durante 30 min en la oscuridad y se realizaron dos lavados con PBS. En el caso de marcación indirecta anti-isotipo marcado anti-mouse IgGAPC o IgGFITC (Caltag). Para los ensayos de endocitosis de CXCR4 y de inactivación de LFA-1 (clon H111) se realizó una incubación adicional con 100 ng/ml de SDF-1 a 37°C durante 30 min o 1 h antes del marcaje con el anticuerpo mencionado. Las adquisiciones se realizaron usando un citómetro FACScalibur (BD) o FACS Aria II (BD, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). Para el análisis de los datos se usaron los programas WinMDI2.9 (Phoenix, AZ, USA) o FACS Diva software (BD). Se seleccionaron las células CFSE<sup>+</sup> para el análisis de la expresión de CD34, CD133, CXCR4 y moléculas de adhesión en CSH. Anticuerpos de control de isotipo se usaron como control negativo para ajustar los cuadrantes.

### **3.14 Separación celular por citometría de flujo (sorting)**

La separación celular se realizó en un citómetro FACS Aria II (BD). Previo a la separación se estableció el umbral de adquisición (*threshold*) de las células con base en el volumen celular (*forward scatter*). Se adquirió la muestra y con base en el diagrama de *forward scatter vs side scatter* se dibujó la región correspondiente a las células. Posteriormente con base en la adquisición y el diagrama de células marcadas y sin marcar se establecieron las ventanas de positividad (CD133-PE) y negatividad del marcador, respectivamente. Usando una nozzle de 70  $\mu\text{m}$ , ajustando los parámetros del *stream* (Gap 6) y *dropdelay* se hizo una separación celular a dos vías, de las poblaciones CD133<sup>+</sup> y CD133<sup>-</sup> de células expandidas por 14 días con citoquinas de acción temprana de acuerdo con el marcaje realizado previamente con el anticuerpo anti-CD133 PE.

### **3.15 Cuantificación de citoquinas con perlas específicas (CBA)**

Se cuantificaron las citoquinas presentes en los medios de cultivo de las condiciones HM, HMC, HC y de CSM (M) recuperados después de tres días de incubación en las condiciones mencionadas. En algunos casos se realizaron diluciones de estos medios. Las citoquinas IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF, IL-12p70, IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$  se cuantificaron usando los protocolos de los kits para detección de citoquinas inflamatorias (Human Inflammatory Cytokine Kit, BD) y citoquinas de tipo Th1 y Th2 (Human Th1/Th2 Cytokine Kit II, BD). El protocolo sugerido por el fabricante se modificó levemente ajustando el volumen dispensado de cada sobrenadante a 10 o 20  $\mu\text{l}$ . Se cuantificaron las citoquinas mencionadas de los sobrenadantes de los cultivos de CSM y de los co-cultivos de estas células con células CD34<sup>+</sup> que se mencionan adelante. Se omitieron los resultados obtenidos de la medición de IL-1 $\beta$  e IL-12p70 dado que la detección fue menor a la sensibilidad del ensayo (<10 ng/ml). Los cálculos de las concentraciones de citoquinas se hicieron con base en la preparación de estándares según lo recomendado por el fabricante y el análisis con el programa BD<sup>TM</sup> cytometric bead array software (BD).

### 3.16 Ensayos de clonogenicidad primaria

Entre 200 y 250 células CD34<sup>+</sup> aisladas de SCU recién aisladas, expandidas o separadas por citometría de flujo se resuspendieron en 50 µl de IMDM más Glutamax (Gibco) suplementado con 2% de SFB (Micro gen) por cada 500 µl de medio *MACS® HSC-CFU complete with Epo* (#130-091-287, Miltenyi Biotec). Se vertió la suspensión en placas de *Petri* de 35 mm (Corning) como lo recomienda el fabricante. En algunos casos se sembró la suspensión celular en medio *MACS® HSC-CFU complete with Epo* en placas de 24 pozos (500 µl/pozo), sembrando tres pozos por muestra. Las placas de *Petri* o de 24 pozos se incubaron durante 7 días (ensayos rápidos) o 14 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se tomaron fotografías de la totalidad de la placa o pozo con una cámara Cannon Power-Shot-A640 adaptada a un microscopio invertido con objetivo de 4 X (Axiovert C40, Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) siguiendo sistemáticamente los cuadros formados (2 x 2 mm) por una rejilla metálica. Las fotografías se analizaron con el programa ImageJ (NIH) haciendo un conteo de las colonias formadas (>50 células) y clasificándolas de acuerdo al tipo de colonia. Algunas de estas colonias se tiñeron con *Giemsa* de acuerdo al protocolo habitual.

### 3.17 Diseño de *primers* SybrGreen y sondas Taqman®

Se diseñaron y sintetizaron los *primers* para la amplificación de las moléculas: HoxB4, Pbx-1, Bmi-1, Gata-2, Notch-1 y los respectivos genes “house-keeping” GAPDH y 18S ARNr usando el programa *Primer Express Software 3.0* (Applied Biosystems, Foster City, CA) seleccionando secuencias que abarcaran regiones intrónicas de cada uno de los genes.

**Tabla 4. *Primers* diseñados para cuantificación relativa de ARNm (*SybrGreen*).**

	<i>Primer sentido (5'-3')</i>	<i>Primer reverso (5'-3')</i>	Producto
<b>Bmi-1</b>	GCTGGCTGCGATTCATTTT	CCTCCACAAAGCACACACATCA	180 pb
<b>Notch-1</b>	AATGTGGATGCCGAGTTGT	GATGTCCCGGTTGGCAAAG	150 pb
<b>HoxB-4</b>	TACCCCTGGATGCGCAAA	CAGGTAGCGGTTGAGTGAAATTC	138 pb
<b>Gata-2</b>	GCAGAACCGACCACTCATCA	CCACAGGCGTTGCAGACA	141 pb
<b>18 S ARNr</b>	GATGGGCGGCGAAAATA	GTACTGGCGTGGATTCTGCATA	171 pb
<b>Gapdh</b>	ACAGTCAGCCGCATCTTCTTTT	GTGACCAGGCGCCAATA	111 pb

Para las reacciones con la tecnología TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) se usaron los *TaqMan*® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) con la mezcla de *primers* y sonda para la amplificación de CD11a (Hs00158218), CD49d (Hs00168433), (CD44 Hs01075861). Se usó como gen “*house-keeping*” o de normalización de las amplificaciones del sistema Taqman, la proteína de unión a la caja TATA (TBP) dada la baja variabilidad reportada de expresión en los distintos sistemas (Applied Biosystems, Foster City, CA) y en el sistema comparado. El volumen de esta mezcla se estandarizó con el propósito de reducir los volúmenes de uso.

### **3.18 Aislamiento y cuantificación de ARN total**

Se aisló el ARN total de células frescas y cultivadas utilizando el método de TRIzol (Invitrogen). Terminado el aislamiento el ARN se resuspendió en agua ultrapura (30- 50 µl) y se almacenó a -70°C. El ARN total se cuantificó utilizando el método fluorométrico de Qubit (Invitrogen) y usando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Se verificó la integridad de los ARN aislados realizando una electroforesis del ARN en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (60 min, 100 V) y tinción con bromuro de etidio (5 µg/ml) por 30 min. El gel se visualizó con transiluminador UV confirmando la presencia de las bandas del ARN ribosomal 28S:18S en una relación aproximada de 2:1 (Genesnap/Genetools, Syngene, USA). La pureza de los ARNs en relación a la presencia de proteínas se obtuvo con el cociente de las absorbancias a las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm (A260/A280) obtenidas por espectrofotometría aceptando un valor mayor a 1,8.

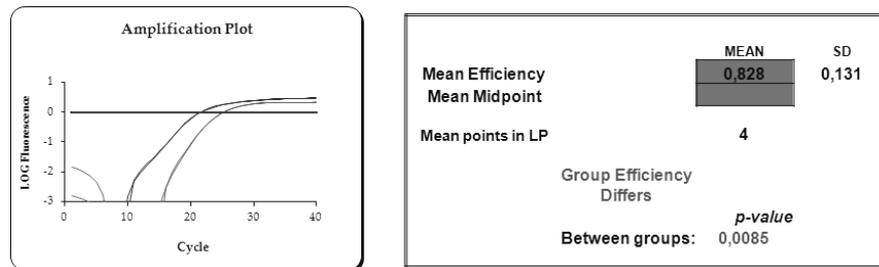
### **3.19 Síntesis de cADN**

Entre 80 y 100 ng de ARN total se usaron para cada reacción de síntesis de ADN complementario (cADN) siguiendo las instrucciones del *kit High Capacity cDNA reverse transcription kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se mezcló el ARN total, el agua libre de nucleasas y *random primers* incubando 65°C durante 5 min.

Después de enfriar la mezcla en hielo, se añadió el resto de los componentes del *kit* en un volumen final de 20 µl con las concentraciones de dNTPs, transcriptasa reversa e inhibidor de ARNasas recomendadas por el fabricante. Para llevar a cabo la reacción se programó un perfil de reacción así: 25°C 10 min, 37°C 120 min, 85°C 5 s. Después de la reacción, el cADN se guardó a -20°C hasta su uso.

### **3.20 PCR cuantitativo (SybrGreen)**

El PCR cuantitativo (qRT-PCR) se realizó utilizando el *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) según las instrucciones del fabricante, ajustando el volumen de reacción a 12,5 µl. Las concentraciones de *primers* (Tabla 4) y de cADN se estandarizaron encontrando unas concentraciones óptimas de 200 nM y 20 ng por reacción, respectivamente. Se realizaron triplicados por cada gen probado, usando como controles reacciones sin plantilla de cADN (*Non template controls*). Para descartar la amplificación genómica se realizaron controles sin retrotranscripción en las reacciones de PCR de cada gen y muestra analizada. Usando el equipo 7500 de *Applied Biosystems* se programó un perfil de reacción así: 50°C 2 min, 95°C 10 min y 40 ciclos de 95°C 15 s, 60°C 60 s. Los datos de fluorescencia se colectaron en cada ciclo en la temperatura de 60°C. Después de completada la amplificación se hizo la curva de disociación para verificar la presencia de un solo producto, descartando aquellos que no mostraran un pico único. En ocasiones, terminada la reacción se realizó electroforesis de los productos en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (60 min, 100 V) y tinción con bromuro de etidio. Los datos guardados en archivos del formato ABI Prism 7000 SDS software se exportaron como fluorescencia cruda a archivos de texto para ser analizados con la aplicación de Excel DART-PCR, versión 1.0 (Peirson y cols, 2003). Las eficiencias y los valores de Ct (*threshold cycle*) de las curvas obtenidas se analizaron con la aplicación de Excel DART-PCR, versión 1.0 (Peirson y cols, 2003) (Fig. 5).



**Figura 5. Análisis de curvas de amplificación (qRT-PCR) en el programa DART-PCR.**

El panel de la izquierda muestra las curvas de logaritmo de fluorescencia vs ciclo de amplificación de duplicados de la amplificación de 2 genes con eficiencias de amplificación distintas. El panel de la derecha el análisis estadístico que demuestra la diferencia entre las eficiencias.

Para obtener los valores relativos de expresión de los genes escogidos se promedió la relación de fluorescencia umbral del gen de interés y fluorescencia umbral del control interno para cada una de las muestras y réplicas. La cuantificación relativa se hizo con respecto al valor obtenido en la muestra de referencia (calibrador) En algunas ocasiones la muestra de calibración fue la de las células frescas CD34<sup>+</sup> (d0) y en otras el día 14 de cultivo de expansión con citoquinas (d14). El control interno se escogió con los parámetros aceptados como se mencionará más adelante dentro de los resultados.

### 3.21 PCR cuantitativo (sondas *Taqman*®)

El PCR cuantitativo se realizó utilizando *TaqMan*® *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante ajustando el volumen total de reacción a 12,5 µl. Se estandarizaron las concentraciones óptimas de *primers*, de sonda y de cADN encontrando respectivamente 450 nM, 125 nM y 20 ng por reacción. Se realizaron triplicados por cada gen probado usando como controles reacciones sin plantilla de cADN. Usando el equipo 7500 de *Applied Biosystems* se programó un perfil de reacción así: 50°C 2 min, 95°C 10 min y 40 ciclos de 95°C 15 s, 60°C 60 s. Los niveles de expresión de CD49d, CD44 y CD11a se definieron a través de la normalizaron con la expresión del gen de TBP mencionado arriba. Los niveles de expresión de CD11a, CD44 y CD49d se calcularon relativamente por el método comparativo del ciclo umbral o  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Schmittgen y cols, 2008), con base en la expresión de

estas moléculas en las células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas (condición definida como HC).

### **3.22 Ensayos de migración**

Todos los ensayos de migración se realizaron en cámaras *transwell* (6,5 mm de diámetro, poro de 5 µm, Corning Costar). Las cámaras superiores del sistema se recubrieron por 2 h a 37°C con 50 µl de una solución de PBS más el ligando respectivo (VCAM-1-Fc (Preprotech, RockyHill, NJ, USA), fibronectina plasmática humana (FBN) (Gibco, Invitrogen Corporation) o ICAM-1-Fc (Sigma)) a una concentración de 10 µg/ml. Después de la remoción de la solución del ligando y lavado de las cámaras superiores, estas se incubaron nuevamente por 30 min a 37°C con una solución de bloqueo o *buffer* de migración (RPMI 1640 con BSA al 2%). Entre 3 - 4 x 10<sup>4</sup> células frescas o expandidas con citoquinas (en presencia o ausencia de CSM) se adicionan al inserto mencionado. La cámara inferior del *transwell* se llenó con 600 µl de *buffer* de migración. En los casos de ensayos de quimiotaxis se usó SDF-1 (rhSDF-1α, Miltenyi Biotec) a una concentración de 100 ng/ml o medio condicionado de CSM (de la condición de cultivo HMC). En algunos experimentos el anticuerpo monoclonal MEM148 se adicionó a una concentración de 10 µg/ml en el *buffer* de migración de la cámara superior. Después de 4 o 24 h de incubación a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, se retiró el inserto superior y se colectaron las células que migraron a la cámara inferior en tubos de polipropileno (BD). Se realizaron los conteos a través de citometría de flujo (FACS Aria II, BD), determinando el número de eventos durante en 2 min en el flujo constante máximo del equipo (flujo de 11) (Se hicieron adquisiciones por duplicado de cada experimento). Se usó la migración de células en insertos no cubiertos (migración basal) para hacer la relación con la migración inducida por los ligandos. Además se determinaron los porcentajes de las células que migran (con cada ligando) contando el número de células presentes en la cámara inferior multiplicado por 100 y dividido sobre el total de células sembradas. Los datos de los porcentajes de células que migraron de cuatro muestras de SCU diferentes, se usaron para realizar análisis estadísticos pareados.

### **3.23 Ensayos de adhesión**

Para determinar la adhesión a ICAM-1, se escogió la línea celular endotelial híbrida EAhy926 que expresa de manera constitutiva e inducible ICAM-1 (Lidington y cols, 1999). Las células EAhy926 se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad celular de  $2 \times 10^4$  células/pozo. Al alcanzar una confluencia de más del 90% las células se activaron con 10 ng/ml de TNF $\alpha$  durante toda la noche. Antes de realizar los ensayos de adhesión el medio activador se retiró y células se lavaron con PBS (2 veces). La expresión constitutiva e inducida de ICAM-1 se verificó por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia en las células EAhy926 usando el anticuerpo anti-CD54-FITC (MEM111, Caltag). Para los ensayos de adhesión a FBN, se sembraron 25  $\mu$ g/ml de FBN plasmática humana (Gibco, Invitrogen Corporation) disuelta en solución de bloqueo en placas de 96 pozos y esta se incubó durante la noche a 4°C. Las células cosechadas de cada condición de cultivo se marcaron con CFSE y se sembraron en los pozos de las placas de 96 pozos por triplicado a una densidad celular de  $1-2 \times 10^4$  células/pozo. Después de 4 h de incubación a 37°C y 5 % de CO $_2$ , los pozos se lavaron cuidadosamente con PBS cuatro veces. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia de CFSE de cada pozo por medio de un lector de placas Flx800 Biotek (Biotek, Winooski, VT, USA) programando la lectura con el filtro de excitación de 485 nm (+/- 20) y de emisión de 528 nm (+/- 20). Los datos se analizaron con ayuda del programa *Gen5 data analysis software* (Biotek, Winooski, VT, USA). El medio condicionado para estimular la adhesión a FBN se adicionó antes del paso de incubación en algunos de los ensayos. También se uso un anticuerpo bloqueador de VLA-5 (clon SAM-1) a 10  $\mu$ g/ml en algunos de estos ensayos. La intensidad de fluorescencia total tomada antes de la realización de los lavados se tomó como el 100% de la adhesión. Cada experimento se realizó por triplicado usando dos diferentes muestras de SCU. Para los ensayos de adhesión entre CSM y CSH,  $5 \times 10^4$  células CD34 $^+$  cosechadas de los distintos tratamientos se sembraron sobre CSM (en las que se confirmó la expresión de VCAM-1), que habían sido previamente sembradas en placas de 24 pozos y habían alcanzado una confluencia completa. Después de 4 horas de incubación a

37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>, cada pozo se lavó cuatro veces con 1 ml retirando las células no adherentes. Se tomaron fotografías de campos sucesivos de cada pozo usando una cámara digital (Cannon Power-Shot-A640, 10MP) adaptada a un microscopio invertido (Axiovert C40, Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) con un objetivo de 20 X. Las CSH que se quedaron adheridas a las CSM se analizaron de las imágenes tomadas usando la herramienta de conteo del programa ImageJ.

### **3.24 Detección de fosfoproteínas por citometría de flujo (*phosphoflow*)**

Alrededor de  $1 \times 10^5$  células de los tratamientos HC y HMC se fijaron en su medio inicial adicionando igual volumen de paraformaldehído al 4% (precalentado a 37°C). De igual manera, se fijaron las células REH previamente cultivadas en presencia o ausencia de CSM durante tres días y estimuladas o no con PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate) a 10 ng/ml durante 15 min a 37°C. Posteriormente, las células CD34<sup>+</sup> y REH se incubaron durante 10 min a TA y se centrifugaron 5 min a 500 x g. Luego de descartar el sobrenadante, el *pellet* celular se resuspendió con *vortex* hasta obtener una suspensión. Se añadió lentamente 1 ml de metanol al 100% y se incubó 15 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante luego de centrifugar 5 min a 500 x g y se añadió *buffer* de bloqueo (BSA 2%/PBS). Luego del lavado las células se resuspendieron en 100 µl de y se añadieron los anticuerpos anti-Akt pSer473-AlexaFluor647 (clon M89-61, BD) y anti ErK pThr202/Tyr204-FITC (clon 20A, BD) a los tubos correspondientes. Se marcó durante 20 min a TA en la oscuridad y se lavó 1 vez con 15 volúmenes de *buffer* de bloqueo. Se dejó la suspensión en 300 µl de *buffer* de bloqueo y se adquirieron las muestras inmediatamente en el citómetro FACS Ariall (BD). Se determinaron los datos de intensidad media de fluorescencia (IMF) para cada uno de los tratamientos y su control sin marcación.

### **3.25 Microscopía óptica de fluorescencia y confocal**

Fotografías de las células cultivadas se tomaron con una cámara Cannon Power-Shot-A640 adaptada a un microscopio invertido (Axiovert C40, Carl Zeiss,

Thornwood, NY, USA). Las fotografías se analizaron con el programa ImageJ (NIH) haciendo un conteo de las células elongadas o redondeadas. Se contaron al menos 1000 células por cada tratamiento. La localización subcelular del LFA-1 activo e inactivo se detectó usando los anticuerpos indicados en los resultados en células no fijadas usando un microscopio confocal (Nikon Eclipse Ti-U, Japan) con instalación para fluorescencia e imagen reflectiva. Las imágenes se obtuvieron y se analizaron por medio de los programas NIS-Elements Advanced Research and EZ-C1 software (Nikon), respectivamente.

### **3.26 Video-microscopía en tiempo real**

Alrededor de  $2 \times 10^5$  de células de las condiciones HC o HMC se sembraron en placas de 24 pozos con CSM y medio condicionado (confluencia <90%) precalentado a 37°C. Se tomaron imágenes secuenciales desde su siembra usando el objetivo de 20 X de un microscopio confocal Nikon TI-U (Japan) con instalación para imagen reflectiva. Los videos que se tomaron por lapsos de 20 seg tuvieron una duración total de 45 min. Los datos se procesaron usando los programas NIS-Elements Advanced Research software haciendo el análisis manual de motilidad usando la herramienta de seguimiento (*tracking*) celular.

### **3.27 Análisis estadístico de los datos**

Para la optimización de la selección de muestras de SCU con base en el número de células CD34<sup>+</sup> se calculó la estadística descriptiva para todas las variables. Se usó un análisis de regresión multivariada para determinar la asociación entre las variables independientes (prelaboratorio y laboratorio) y las variables dependientes (números totales de células aisladas, pureza y número de células CD34 corregidas). En este análisis una  $p < 0,05$  se consideró significativa. La multicolinealidad se evaluó independientemente para los valores pre-laboratorio y de laboratorio calculando el valor de inflación de la varianza, obteniendo un valor menor de 2. Para determinar los mejores criterios de selección para cada variable predictiva se construyeron curvas ROC (*Receiver Operator Characteristics*). Para

realizar los anteriores análisis se utilizó el programa STATA MP/10 (Stata Corp., College Station, TX, USA).

Para determinar la normalidad de los grupos de datos se aplicó el test de Shapiro-Wilks. En el caso de las comparaciones entre migración adhesión y expresión de moléculas de adhesión entre HC y HMC se usó un test de rangos pareados de Wilcoxon. El test de ji cuadrado se utilizó para comparar la proporción de células elongadas y redondeadas. El análisis de varianza de Friedman se usó para analizar los datos de expresión de CD34 realizando un test post-hoc de comparación múltiple de Dunn. En los análisis de los datos de la expresión de los genes Bmi-1, Notch-1, Gata-2 se realizó la prueba de Kruskal-Wallis. Para estos análisis se usó el software GraphPad Prism version 4 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Estandarización y optimización del aislamiento de células CD34<sup>+</sup>**

La estandarización y optimización del aislamiento de células primarias CD34<sup>+</sup> es fundamental no solo para lograr mayor confiabilidad y reproducibilidad de los datos obtenidos sino para garantizar el uso racional de las muestras colectadas y los costosos insumos de laboratorio requeridos. Por tanto se estandarizó la recolección de las muestras y la purificación inmunomagnética de células CD34<sup>+</sup> para luego optimizar el muestreo de SCU.

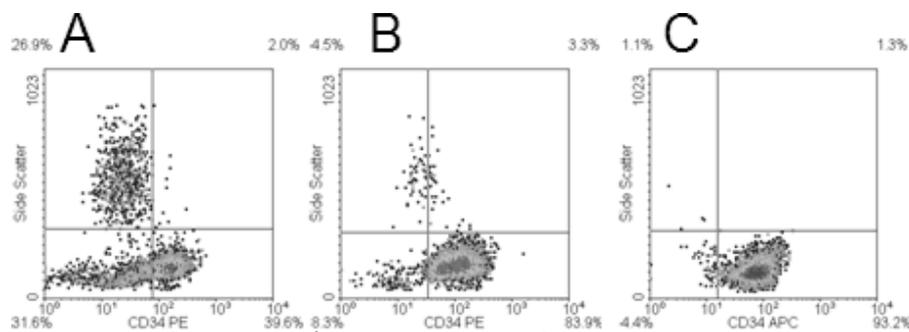
#### **4.1.1 Recolección de las muestras de SCU**

Se implementó la recolección de cada muestra de SCU en varios tubos estériles con sistema de vacío, heparina liofilizada y capacidad de 10 ml. Este método permitió la recolección volúmenes reducidos de sangre preservando una relación proporcional entre el volumen de muestra y la cantidad de anticoagulante. Este sistema de recolección se postuló como alternativa a la habitualmente usada recolección en bolsa con volumen fijo de preservante más anticoagulante (Citrate/Phosphate/Dextrose/Adenosine, CPDA) (Hassal y cols, 2010) ya que colectando en este tipo de bolsa se encontró una desproporción entre el volumen de CPDA y el volumen muestra recolectada. La desproporción mencionada puede resultar en mayores pérdidas de la viabilidad celular en las muestras de menor volumen. Además, no hubo necesidad de usar preservantes ni crioprotectores dado que el aislamiento de células mononucleares a partir de sangre total se limitó a las siguientes doce horas (12 h) posteriores a la recolección.

#### **4.1.2 Purificación de células CD34<sup>+</sup> con perlas inmunomagnéticas.**

En segundo lugar se modificó el protocolo de purificación con perlas inmunomagnéticas sugerido por el fabricante, usando dos columnas en lugar de una y aumentado los volúmenes de elución de las mismas desde 3 ml a 40 ml

(ver materiales y métodos). Se demostró que el uso de dos columnas consecutivas para la purificación de células mejora las purezas de células CD34 (Fig. 6). En la figura 8 se observan las gráficas de citometría de las células marcadas con el anticuerpo anti-CD34 después de la purificación. Se evidenció que el porcentaje de células CD34<sup>+</sup> obtenidas después de la purificación con una sola columna (~40%) (Fig. 6A) fue menor comparado con lo obtenido con dos columnas (>80%) (Fig. 6B y C).



**Figura 6. Purezas de células CD34<sup>+</sup> obtenidas después del aislamiento inmunomagnético.** Se muestra la purificación usando una (A) y dos columnas (B y C). Se muestran las gráficas de citometría de flujo. Los cuadrantes se ajustaron de acuerdo con las graficas de marcación de estas células con anticuerpos de isotipo acoplados a PE o APC según el caso.

El aislamiento de células CD34 de SCU con una sola columna de separación y los volúmenes de elución sugeridos resultaron en purezas con un promedio del 32% (+/- 13) (n=7). Lo que conllevó a usar consistentemente dos columnas para la purificación de una sola muestra. Al usar dos columnas para la purificación y aumentar los volúmenes de elución de las mismas se obtuvo un promedio de pureza del 77% (+/- 18) (n=59).

#### 4.1.3 Optimización de la selección de las muestras pre-purificación

Los costos de la purificación de células CD34<sup>+</sup> recaen sobre todo en el consumo de perlas inmunomagnéticas y columnas de retención. Desafortunadamente en ocasiones y aún usando dos columnas de purificación no se obtienen los números de células necesarios o las purezas requeridas para iniciar con los experimentos, por lo que se estableció un método de selección previa de las

muestras que hicieran costo-efectiva la purificación inmunomagnética. Para este análisis se tomaron como variables independientes la edad gestacional y peso del neonato, el volumen de la muestra, el número de leucocitos y eritrocitos aislados en la FCBD así como el porcentaje de linfocitos de esta misma fracción (Tabla 5). Estas variables se correlacionaron con el número total de células purificadas, la pureza y el número corregido de células CD34 (variables dependientes). En la tabla 5 se muestra la estadística descriptiva de las variables evaluadas. Las variables independientes se clasificaron como variables pre-laboratorio o de laboratorio, diferenciándolas por el procesamiento requerido para obtener la FCBD (Tabla 5).

**Tabla 5. Estadística descriptiva de variables usadas para optimización de muestreo de SCU.**  
*n*: número de muestras, Prom: Promedio, D.E.: desviación estándar, Min: valor mínimo, Max: valor máximo.

	Variables	<i>n</i>	Prom	D.E.	Min	Máx
Variables pre-laboratorio	Edad Gestacional (sem.)	56	38	12	36	41
	Peso del neonato (g)	57	3042	315	2415	3850
	Volumen de muestra (ml)	54	31	10	14	67
Variables de laboratorio	Leucocitos ( $1 \times 10^3$ )	59	170	94	27	449
	Eritrocitos ( $1 \times 10^6$ )	59	490	759	47	5600
	Linfocitos (%)	59	57	11	17	86
Variables dependientes	Número total de células aisladas ( $1 \times 10^3$ )	59	776	491	62	2275
	Pureza CD34 (%)	59	77	18	20	97
	Número corregido de células CD34 ( $1 \times 10^3$ )	59	629	450	22	2116

De las muestras de SCU recolectadas se tabularon los datos para 59 muestras que tuvieran todos los datos correspondientes a las variables dependientes y posteriormente se hizo un análisis de regresión multivariado para determinar cuáles de las variables independientes podrían predecir los números de células CD34<sup>+</sup> aisladas. El análisis de las variables pre-laboratorio reveló que solo los volúmenes de SCU estaban directamente correlacionados con los números totales de células aisladas ( $p=0,016$ ), así como con los números corregidos de células CD34<sup>+</sup> ( $p=0,05$ ) (Tabla 6). El análisis de las variables de laboratorio reveló que el número de leucocitos y de eritrocitos pudo predecir los números totales de

células purificadas así como los números corregidos de células CD34. De manera interesante, solo los porcentajes de linfocitos se correlacionaron directamente con la pureza de las células CD34<sup>+</sup> obtenidas después del aislamiento inmunomagnético. Es importante resaltar que el hallazgo de correlación entre el número de eritrocitos y la purificación células CD34, previene sobre la excesiva depleción de eritrocitos en los fraccionamientos celulares en los que se desea obtener células CD34<sup>+</sup> (Tabla 6).

**Tabla 6. Análisis de regresión lineal multivariado.**

Se muestran valores de p, y número de muestras (n). Los valores significativos de p se muestran en negrillas.

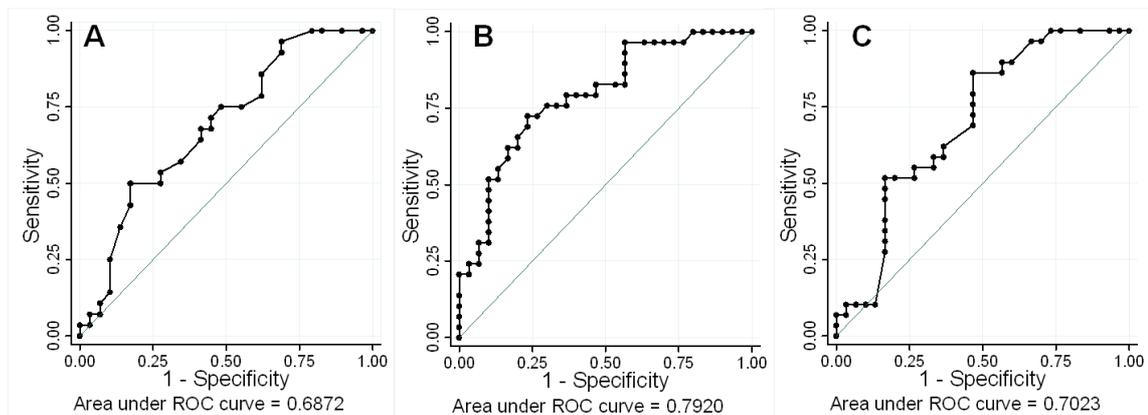
	Variables	Número total de células aisladas	Pureza de células CD34	Número corregido de células CD34
Variables pre-laboratorio	Edad Gestacional (sem.)	p=0,33 n=51	p=0,13 n=52	p=0,48 n=51
	Peso del neonato (g)	p=0,38 n=51	p=0,28 n=52	p=0,47 n=51
	Volumen de muestra (ml)	<b>p=0,016</b> n=51	p=0,84 n=52	<b>p=0,05</b> n=51
Variables de laboratorio	Leucocitos (1 x 10 <sup>3</sup> )	<b>p=0,000</b> n=59	p=0,13 n=59	<b>p=0,000</b> n=59
	Eritrocitos (1 x 10 <sup>6</sup> )	<b>p=0,018</b> n=59	p=0,39 n=59	<b>p=0,046</b> n=59
	Linfocitos (%)	p=0,37 n=59	<b>p=0,005</b> n=59	p=0,34 n=59

Después se estableció que el número mínimo de células CD34<sup>+</sup> necesarias para iniciar los cultivos era de  $5 \times 10^5$  células. Con base en este número se construyeron curvas ROC (*Receiver Operator Characteristics*) y se eligieron las cifras con mejores valores predictivos como puntos de corte para cada variable predictiva (Fig. 7). Se analizaron estas curvas en el caso de las variables: volumen de SCU y números de leucocitos y eritrocitos en la FCBD.

Se encontró un área bajo la curva ROC de 0,6872 cuando se analizó el volumen de SCU (intervalo de confianza del 95% entre 0,548 y 0,826). Por su parte las curvas ROC de los leucocitos y los eritrocitos tuvieron unas áreas bajo la curva mayores, respectivamente de 0,79 y 0,70 (intervalos de confianza del 95% de

0,677 -0,907 y 0,5662 - 0,8383 respectivamente). Lo que significa que el número de leucocitos es de las tres, la más apropiada para predecir el resultado del número de células CD34<sup>+</sup>.

Tomando en cuenta el reporte de especificidad y sensibilidad para cada punto analizado en la curva del volumen de muestra se escogió un punto de corte de 27 ml, el cual tuvo una sensibilidad del 75% y una especificidad del 55,7% para detectar las muestras con más de  $5 \times 10^5$  células CD34. Se propone entonces que con base en este parámetro de volumen se realice la selección de las muestras que se someterán al fraccionamiento por gradiente de densidad.



**Figura 7. Curvas ROC de las variables predictivas de la obtención de células CD34<sup>+</sup>.**

**A.** Volumen de SCU. **B.** Leucocitos. **C.** Eritrocitos. Se muestra el área bajo la curva de la curva construida para cada variable.

Con el objeto de seleccionar un parámetro que permita excluir las muestras que tienen menos de  $5 \times 10^5$  células CD34<sup>+</sup>, se escogieron los puntos de corte con mayor especificidad de las curvas ROC de los números de eritrocitos y leucocitos de la FCBD. Usando un número de eritrocitos de  $375 \times 10^6$  y uno de  $194 \times 10^6$  leucocitos las especificidades fueron respectivamente de 73% y 90%. Los valores predictivos positivos fueron respectivamente 2 y 5, siendo entonces el más efectivo, el número de leucocitos para el tamizaje.

Se realizó también el ejercicio de determinar el punto de corte de volumen y leucocitos para los ensayos en los que se requiriera un número mínimo de  $1 \times 10^6$

células CD34<sup>+</sup>. Lo cual aumenta el punto de corte del volumen mínimo a colectar a 35 ml y el de leucocitos a  $294 \times 10^6$  (sensibilidad 26%, especificidad 90%, valor predictivo positivo 3).

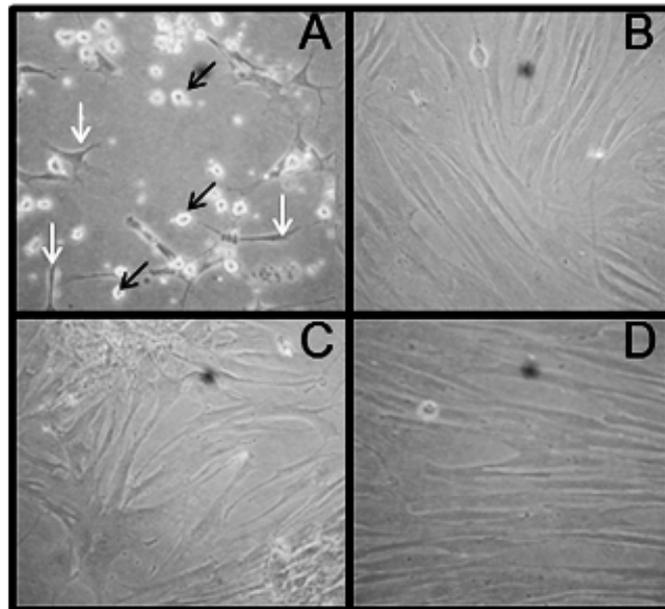
Como conclusiones de este primer grupo de resultados se pudo afirmar que la purificación de células CD34<sup>+</sup> de SCU fresca se optimiza con la colección de la SCU en tubos *venojet* heparinizados y el uso de dos columnas inmunomagnéticas, mejorando con esto último la pureza final de los aislados de células CD34<sup>+</sup>. Además se estableció que la selección de muestras de SCU se vuelve costo-efectiva (si se quieren aislar  $5 \times 10^5$  células CD34<sup>+</sup>) descartando las muestras con menos de 27 ml y examinando los valores de WBC y RBC obtenidos en el hematocitómetro. Se recomienda por separación inmunomagnética, descartar las muestras en las que la FCBD tengan menos de  $194 \times 10^6$  leucocitos y  $375 \times 10^6$  eritrocitos. Además como criterio complementario se recomienda examinar en la FCBD el porcentaje de linfocitos, el cual se correlaciona directamente con la pureza de la muestra (Tabla 6) y descartar aquellas con un porcentaje muy bajo (aprox. < 30%).

Con estos resultados, que han sido publicados en la revista *Molecular Medicine Reports* (Perdomo-Arciniegas y Vernot, 2012, Artículo N°1) se demuestra la optimización del procedimiento de aislamiento de células CD34<sup>+</sup> a partir de volúmenes reducidos de SCU. El desarrollo de estos experimentos y análisis facilita alcanzar el objetivo principal de este trabajo brindando un producto inicial de células primarias CD34<sup>+</sup> de alta calidad.

#### **4.2 Aislamiento y caracterización de CSM.**

A pesar de la muy baja frecuencia de CSM en MO (0,01% - 0,001%) (Castro-Malaspina y cols, 1980), el método de adherencia al plástico de células de MO permite un aislamiento de CSM altamente reproducible (Pittenger y cols, 1999). Se encontró que las células adherentes después de 24 h de la siembra de la FCBD de MO en frascos de 75 cm<sup>2</sup>, forman colonias de las que se obtiene

posteriormente una monocapa confluyente de células de morfología fibroblastoide (Figs. 8A y B). Con volúmenes de MO que variaron entre 1 y 7 ml, la recuperación promedio de células mononucleares de MO fue de  $24 \times 10^6$  células ( $2,5 - 68 \times 10^6$  células, D.E.=  $19 \times 10^6$  células, n=10). La efectividad del procedimiento de aislamiento de CSM por adherencia fue del 90%. Al alcanzar una confluencia completa (Figs. 8B y D) de CSM en frascos de  $75 \text{ cm}^2$  se podían recuperar un promedio de  $6,7 \times 10^5$  CSM/frasco (D.E.=  $1 \times 10^5$  CSM). Al cabo de 3 pases sucesivos, duplicando el número en cada pase, se podían obtener alrededor de  $2,7 \times 10^6$  CSM por muestra.

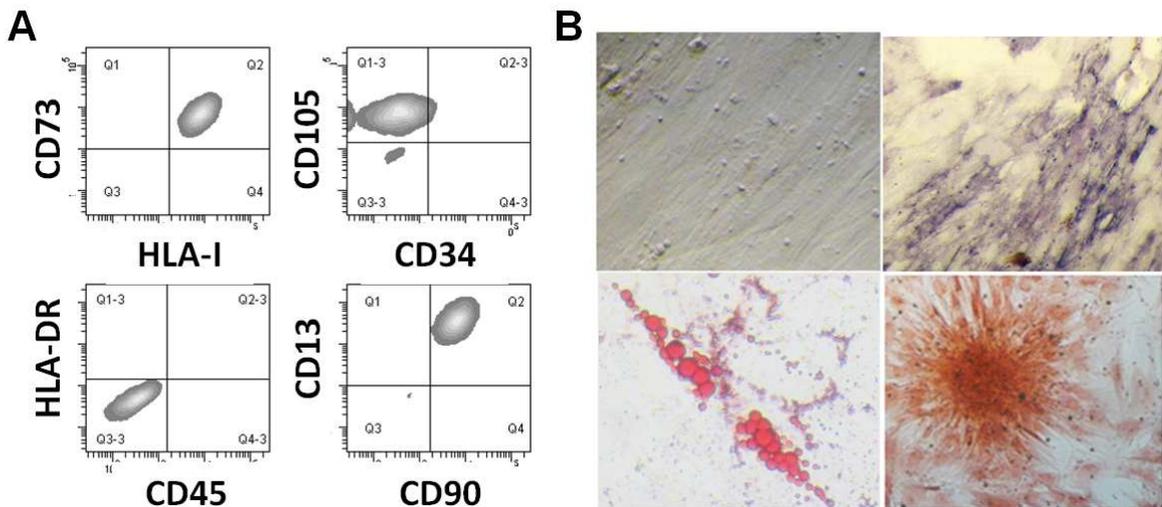


**Figura 8. Aislamiento y cultivo de CSM.**

**A.** Células mononucleares de MO después de 4 días de cultivo.(20X). Se observan células no adheridas redondeadas (flechas negras) y células adheridas con morfología fibroblastoide (flechas blancas). **B.** CSM 100% confluentes después del primer pase. **C.** CSM 90% confluentes después del segundo pase **D.** CSM 95% confluentes después del tercer pase.

Las CSM se caracterizaron en cuanto a su inmunofenotipo y su capacidad de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica (Figs. 9A y B). Estas células presentaron un inmunofenotipo  $\text{CD34}^-/\text{CD45}^-/\text{HLA-DR}^-/\text{HLA-I}^+/\text{CD90}^+/\text{CD105}^+/\text{CD73}^+/\text{CD13}^+$  (Fig. 9A) además de las capacidades de diferenciación osteogénica (Fig 9B, arriba derecha y Fig 10), adipogénica (Fig. 9B, abajo

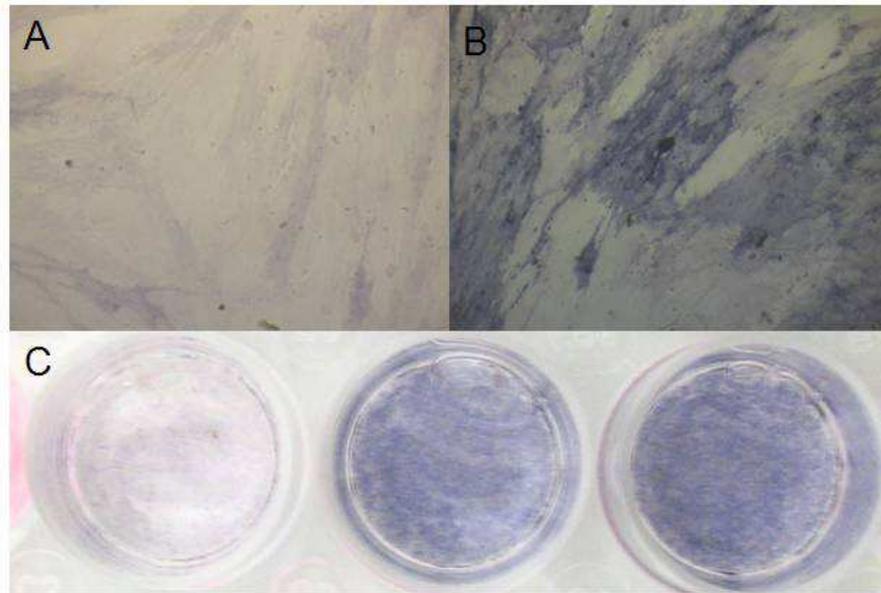
izquierda y Fig. 11) y condrogénica (Fig 9B, abajo derecha). Las características de las células que aislamos concuerdan con lo reportado para las CSM (Pittenger y cols, 1999) y lo aceptado por la Sociedad Internacional de Terapia Celular para la tipificación de CSM (Dominici y cols, 2006).



**Figura 9. Caracterización de las CSM por su inmunofenotipo y la valoración de sus propiedades de multipotencialidad.**

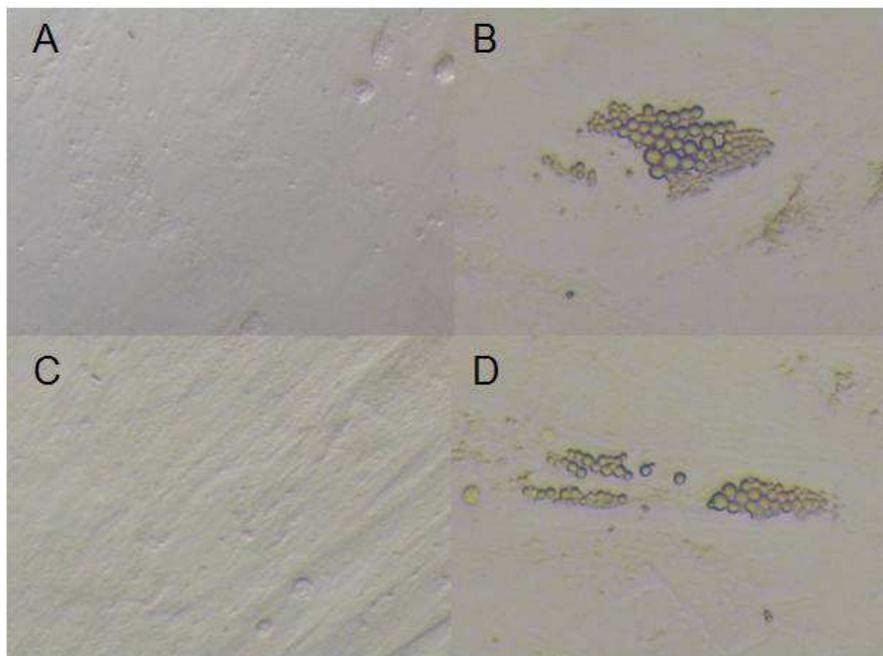
**A.** CSM de cuarto pase se marcaron con anti CD105-FITC, CD90-FITC, CD73-PE, HLA-I-FITC, CD13-PE, CD34-APC, CD45-PerCP, HLA-DR FITC. Las CSM presentan un inmunofenotipo CD34<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>/HLA-I<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD73<sup>+</sup>/CD13<sup>+</sup> **B.** CSM se incubaron con medio de inducción osteogénica, adipogénica y condrogénica durante 21 días como se describe en la sección de materiales y métodos. Se muestra el control de CSM sin inducción (panel izquierdo arriba) (20X), inducción osteogénica y revelado para fosfatasa alcalina (20X) (panel derecho arriba), inducción adipogénica y tinción con aceite rojo (panel izquierdo abajo) (40X), inducción condrogénica y tinción con safranina O (20X).

En conclusión los aislamientos de CSM a partir de MO muestran la alta reproducibilidad reportada anteriormente por otros autores (Castro-Malaspina y cols, 1980; Pittenger y cols, 1999).



**Figura 10. Diferenciación osteogénica de CSM.**

**A.** CSM cultivadas con IMDM completo durante 21 días (control negativo de inducción). (20X) **B.** CSM cultivadas con medio osteogénico durante 21 días. (20X) **C.** Fotografía de los pozos de CSM con inducción osteogénica (centro y derecha) y sin inducción osteogénica (izquierdo). Todos los pozos se trataron para detectar la actividad de fosfatasa alcalina.



**Figura 11. Diferenciación adipogénica de CSM.**

**A.** y **C.** CSM cultivadas con IMDM completo durante 21 días sin ninguna tinción (20X). **B.** y **D.** CSM cultivadas con medio adipogénico durante 21 días sin ninguna tinción (20X). Se observan las vacuolas lipídicas características de la diferenciación adipogénica (**B, D**).

### **4.3 Expansión de células CD34<sup>+</sup> con citoquinas de acción temprana**

#### **4.3.1 Expansión a mediano plazo de células CD34<sup>+</sup>, expresión de marcadores de CSH y ensayos de clonogenicidad**

Con la determinación de las condiciones óptimas de enriquecimiento de CSH de SCU y de CSM de MO para el establecimiento de los co-cultivos, se procedió a definir las condiciones de expansión de las células CD34<sup>+</sup> en cultivo líquido con citoquinas de acción temprana. La expansión de CSH con la adición de citoquinas de acción temprana permite el mantenimiento y el aumento de la población de CSH (Herrera y cols, 2001; Hofmeister y cols, 2007). Como es de esperarse esta expansión puede variar de acuerdo a las condiciones del cultivo y debe establecerse para cada condición en particular.

Con el propósito de establecer el factor de expansión de células CD34<sup>+</sup> incubadas en presencia de citoquinas de acción temprana se hizo la relación entre los números de células obtenidos al final del cultivo y los números de células sembrados inicialmente después de la purificación inmunomagnética. En la tabla 7 se observan los números de células CD34<sup>+</sup> obtenidos después de la purificación inmunomagnética de 5 muestras de SCU y los números de células obtenidos luego de 14 días de cultivo en presencia de la combinación de SCF, TPO y Flt3L (citoquinas de acción temprana). El factor de expansión celular de estas muestras en promedio fue 22 veces (+/- 16) (Tabla 7). Este tipo de expansión de células CD34<sup>+</sup> induce la disminución progresiva de la expresión del marcador CD34, lo que implica que la población se expande pero diferenciándose (Li y cols, 2007; Bennaceur-Griscelli y cols, 2001). Se encuentra evidencia en el mismo sentido para otro marcador de CSH, llamado prominina-1 o CD133 el cual se pierde con la expansión de estas células en cultivos líquidos con citoquinas (Robinson y cols, 2006). La dinámica de la pérdida o la retención de los marcadores de CSH varía dependiendo de las condiciones usadas en el cultivo. Por ejemplo, mientras que Li y cols, reportan una pérdida del marcador CD34 en el 78% de las células que inicialmente eran CD34<sup>+</sup> después de 7 días de cultivo con citoquinas de acción

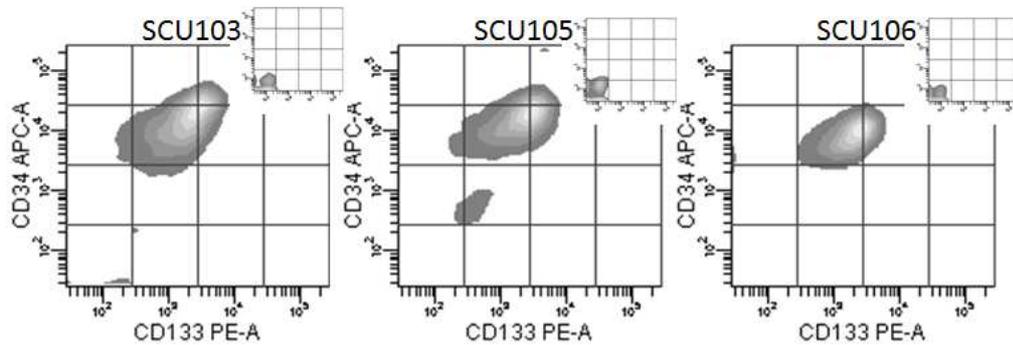
temprana (SCF, TPO y Flt3L) (Li y cols, 2007), Bennaceur-Griscelli y cols, reportan que solo un 50% de estas células pierden el marcador después de este mismo periodo y tratamiento (Bennaceur-Griscelli y cols, 2001). Por esto es necesario establecer tanto la expresión inicial de los marcadores mencionados cómo su pérdida o retención luego del cultivo, con el fin de determinar el grado de diferenciación. Nuestros resultados mostraron que alrededor de un 40% de las células continúa expresando el marcador CD34 (Tabla 7, % CD34) al día 14 de cultivo.

**Tabla 7. Expansión de células CD34<sup>+</sup> después de 14 días de cultivo con citoquinas de acción temprana.**

Se muestran los conteos iniciales (Día 0) de cada muestra de SCU y los números correspondientes de células obtenidos al día 14 de cultivo (Día 14). Se calculó el factor de expansión dividiendo el número de células obtenido al final del cultivo sobre el inicial (F. de expansión). Se muestra el porcentaje de células CD34<sup>+</sup> obtenido con la marcación del anticuerpo anti-CD34-PE en el día 14 de cultivo.

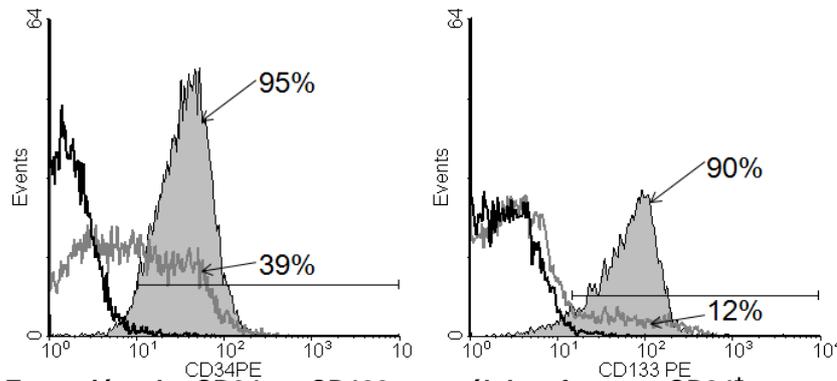
Muestra	#Células (Día 0)	#Células (Día 14)	F. de expansión	% CD34 <sup>+</sup>
SCU25	0,6 x 10 <sup>6</sup>	5,2 x 10 <sup>6</sup>	9	38
SCU26	0,5 x 10 <sup>6</sup>	6,3 x 10 <sup>6</sup>	12	38
SCU27	0,9 x 10 <sup>6</sup>	10,2 x 10 <sup>6</sup>	12	47
SCU29	0,6 x 10 <sup>6</sup>	15,7 x 10 <sup>6</sup>	26	50
SCU31	1,5 x 10 <sup>6</sup>	78 x 10 <sup>6</sup>	52	39
Promedio			22	42
Desv. Están.			16	5

En cuanto al patrón de expresión del marcador CD133, las células CD34<sup>+</sup> recién purificadas por aislamiento inmunomagnético no solamente co-expresan el marcador CD133, sino que la expresión de CD133 es directamente proporcional a la de CD34 y reproducible entre diferentes muestras (Fig. 12). Aunque al igual que el marcador CD34 la expresión de CD133 en células CD34<sup>+</sup> expandidas decae a los 14 días de cultivo con citoquinas, el porcentaje de células que expresan CD133 es mucho más bajo (12%) que el porcentaje de células que expresan CD34 (40%) (Fig. 13). De esta manera se confirma que con la combinación de citoquinas de acción temprana usada se induce una disminución en la expresión de los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD133 a los 14 días de cultivo que no es concurrente entre estos dos marcadores.



**Figura 12. Coexpresión de CD34 y CD133 en células frescas CD34<sup>+</sup>.**

Después del aislamiento inmunomagnético las células purificadas de 3 muestras diferentes de SCU se marcaron con anticuerpos anti-CD34-APC y anti-CD133PE. En el extremo superior derecho de cada gráfico se muestra el control de las células marcadas con los isotipos correspondientes.

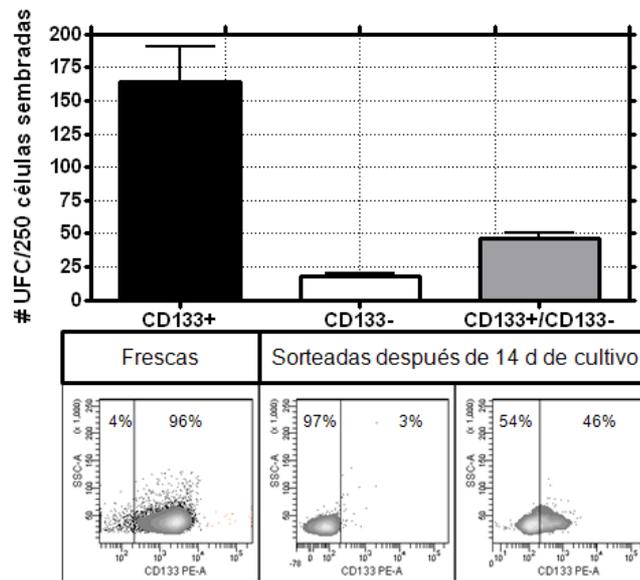


**Figura 13. Expresión de CD34 y CD133 en células frescas CD34<sup>+</sup> y expandidas con citoquinas de acción temprana durante 14 días.**

Se compara la marcación de células frescas CD34<sup>+</sup> (histograma relleno gris) y expandidas con citoquinas por 14 días (histograma línea gris oscura) de la misma muestra de SCU. Cada muestra se marcó independientemente con anticuerpos anti-CD34-PE (izquierda) y anti-CD133PE (derecha). Se muestra el control de las células marcadas con los isotipos correspondientes (Línea negra).

Como se mencionó anteriormente una de las propiedades fundamentales de las CSH y de los PHM es su capacidad clonogénica, la cual se puede cuantificar en ensayos de clonogenicidad primaria. Para determinar de qué manera la expresión de los marcadores CD34 y CD133 está relacionada con la disminución de esta capacidad se comparó el número de colonias formadas por las células CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> recién aisladas y después de 14 días de cultivo con citoquinas. En este último grupo las células se separaron por citometría de flujo con base en la expresión del marcador CD133<sup>+</sup>. La pureza de esta separación en las células

CD133<sup>-</sup> fue del 96% y de las células CD133<sup>+</sup> fue solo el 46% (Fig. 14, paneles inferiores), lo cual se debió en parte a la baja expresión de este marcador a los 14 días (Fig. 13). Ensayos de clonogenicidad primaria, sembrando números equivalentes de células frescas o expandidas 14 días y separadas en CD133<sup>+</sup> y CD133<sup>-</sup> mostraron que las células CD133<sup>-</sup> tienen una capacidad clonogénica aproximadamente seis veces menor con respecto a las células recién aisladas y que el enriquecimiento de un 46% en células CD133<sup>+</sup> duplica la capacidad clonogénica de las células enriquecidas (Fig. 14).

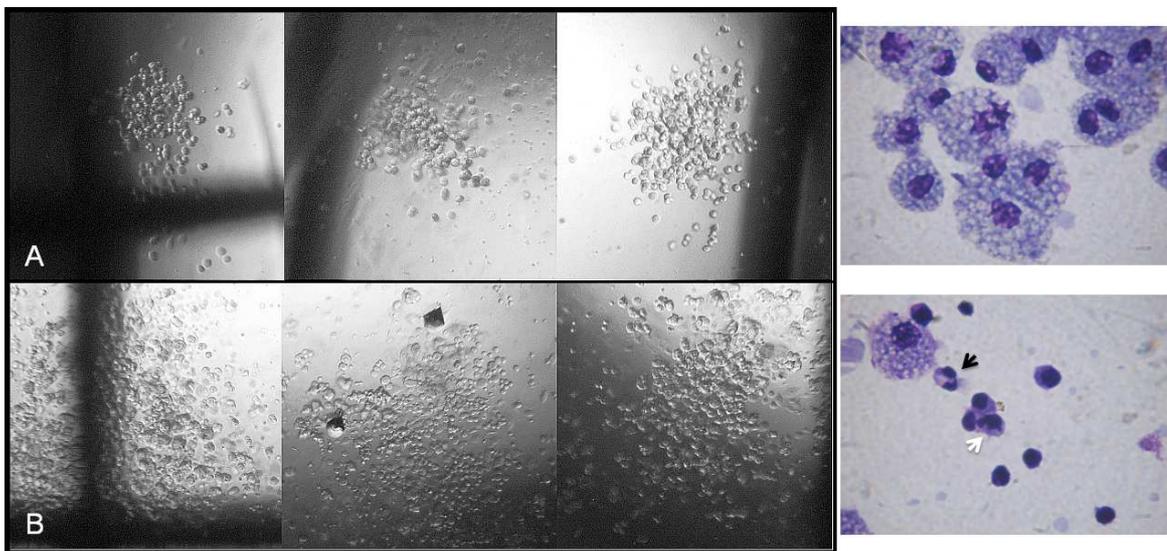


**Figura 14. Clonogenicidad primaria de células CD133<sup>+</sup> frescas, expandidas en cultivo con citoquinas de acción temprana por 14 días y separadas por citometría según la expresión de CD133<sup>+</sup> (sorting).**

Número de unidades formadoras de colonias (UFC) después de dos semanas de la siembra en metilcelulosa *MACS® HSC-CFU complete with Epo* de 250 células frescas CD133<sup>+</sup> o expandidas por 14 días con citoquinas de acción temprana y separadas con base en la expresión de CD133. Después de 14 días de cultivo las células separadas por citometría CD133<sup>-</sup> y CD133<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup> se sembraron en metilcelulosa *MACS® HSC-CFU complete with Epo*. Abajo de cada grupo se muestra el diagrama *post-sorting* de expresión de CD133. La pureza de las células CD133<sup>+</sup> sorteadas fue del 46% (CD133<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>).

La capacidad clonogénica de las células expandidas en cultivo por 14 días se limitó al desarrollo de colonias de tipo granulocito-macrófago (GM) y macrófago (Fig. 15). Adicionalmente, las colonias formadas por las células expandidas enriquecidas en CD133<sup>+</sup> fueron de tipo GM, mientras que las formadas por las

células CD133<sup>-</sup> fueron de tipo macrófago (Fig. 15, Giemsa). Esto indica que las células con mayor pérdida del CD133 tienen un deterioro mayor en su potencial de diferenciación. Por otra parte se evaluó si las colonias formadas corresponden a colonias de alto o bajo potencial proliferativo, que se determina por el tamaño de cada colonia (celularidad) (Ivanović y cols, 1999). Se observó que las células CD133<sup>-</sup> producen consistentemente colonias de menor tamaño (Fig. 15A) que las células con mayor proporción CD133<sup>+</sup> (Fig. 15B).



**Figura 15. Microfotografías de colonias formadas en metilcelulosa de las células expandidas en cultivo con citoquinas de acción temprana por 14 días y separadas con base en la expresión de CD133.**

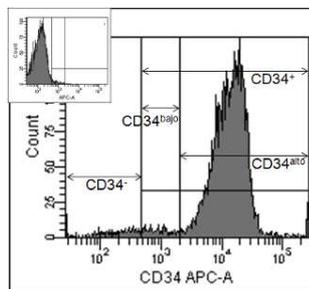
Las células CD34<sup>+</sup> aisladas se cultivaron con SCF, TPO y Flt3-L. Después de 14 días de cultivo las células se separaron en CD133<sup>-</sup> (A) y CD133<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup> (B) se sembraron en metilcelulosa MACS® HSC-CFU complete with Epo. Las fotografías de la derecha son tinciones de Giemsa de una colonia representativa (40X). La tinción con Giemsa de la fotografía de arriba muestra solamente macrófagos (derivadas de A). En la fotografía de abajo se observa un macrófago y se señala un neutrófilo en banda (flecha negra) y un monocito (flecha blanca) (derivadas de B).

En resumen, la expansión en cultivo de células CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> con citoquinas de acción temprana durante 14 días induce una proliferación celular con pérdidas de la expresión de los marcadores CD34, CD133 y de las capacidades clonogénicas y proliferativas de estas células. Esto indica que las células CD34<sup>+</sup> se expanden pero también se diferencian durante el cultivo a mediano plazo. Por lo que a este tiempo de cultivo la proporción de CSH o de PHM indiferenciados habrá disminuido con respecto a lo encontrado en células frescas CD34<sup>+</sup>.

#### **4.3.2 Dinámica de expresión de CD34 y CD133 en células CD34<sup>+</sup> expandidas a corto plazo**

En el sistema de expansión con citoquinas de acción temprana a los 14 días de cultivo, más de la mitad de las células perdieron el marcador CD34, más del 80% perdieron el CD133 (Fig. 13), además de disminuir su capacidad clonogénica y su multipotencialidad. Esto indica un alto grado de diferenciación celular que dificultaría la valoración de las capacidades adhesivas y migratorias de las células CD34<sup>+</sup> expandidas, por la presencia de poblaciones hematopoyéticas mezcladas. Por lo tanto se investigó la dinámica de la pérdida de los marcadores CD34 y CD133 con el objeto de determinar un punto en la expansión celular en el cual hubiese un mínimo grado de diferenciación.

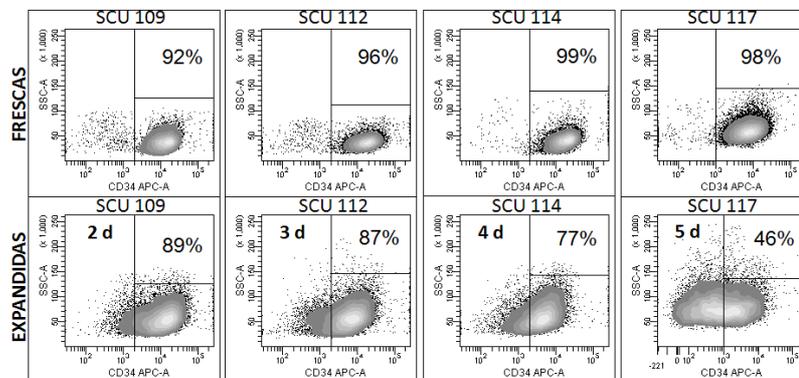
Se ha demostrado que la funcionalidad de las CSH varía de acuerdo a la densidad del marcador CD34 por célula. Por ejemplo las células CD34<sup>alto</sup> tienen una mayor capacidad clonogénica y de LTC-IC que las CD34<sup>bajo</sup> (Sutherland y cols, 1989). Dada la relación que existe entre la densidad del marcador CD34 y la funcionalidad de las CSH se establecieron dos umbrales de esta expresión: uno con base en el marcador de isotipo (Fig. 16, recuadro) y otro umbral con base en la intensidad de fluorescencia de las células recién aisladas, separando las células CD34<sup>bajo</sup> de las células CD34<sup>alto</sup> (Fig. 16). Se determinaron los porcentajes de células CD34<sup>alto</sup> después de diferentes días de cultivo con citoquinas de acción temprana, comparando con la expresión inicial de la misma muestra.



**Figura 16. Definición de umbrales de expresión del marcador CD34.**

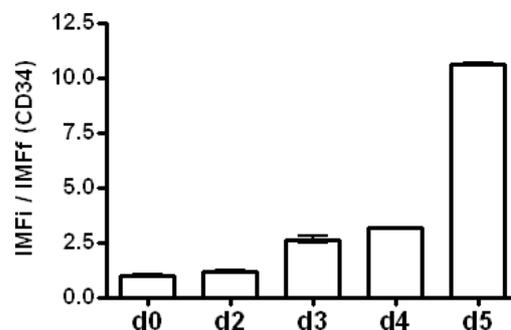
Las regiones que determinan las poblaciones de células CD34<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>bajo</sup> y CD34<sup>alto</sup> se determinaron en el diagrama de citometría principal, teniendo en cuenta la marcación de células frescas CD34<sup>+</sup> con el anticuerpo control de isotipo (diagrama pequeño arriba) y el anticuerpo anti-CD34-APC.

En la figura 17 se comparan los porcentajes pareados de células CD34<sup>alto</sup> de células CD34<sup>+</sup> frescas y expandidas en diferentes días de cultivo. Se observa una disminución leve del porcentaje de células CD34<sup>alto</sup> en los días 2, 3 y 4 de cultivo. Al quinto día de cultivo, el porcentaje de células CD34<sup>alto</sup> cae drásticamente a un 46% (Fig. 17). Se cuantificó la relación entre la intensidad media de fluorescencia (IMF) inicial y final (IMFi/IMFf) de la marcación con el anticuerpo anti-CD34, de las diferentes muestras expandidas por 2, 3, 4 y 5 días (Fig. 18). En los primeros cuatro días de expansión hay una disminución de la expresión de CD34 entre una y tres veces, mientras que al quinto día es de más de diez veces (Fig. 18).



**Figura 17. Porcentaje de células CD34<sup>alto</sup> de células frescas CD34<sup>+</sup> o expandidas con citoquinas de acción temprana en diferentes días de cultivo.**

Se presentan los diagramas de densidad de citometría de flujo (CD34 vs *side scatter*) de células frescas (diagramas de arriba) y que han sido expandidas con citoquinas (diagramas de abajo) durante 2 días (SCU109), 3 días (SCU 112), 4 días (SCU 114) y 5 días (SCU 117). El día en que se cosecharon las células expandidas se abrevia dentro del diagrama como 2 d, 3 d, 4 d y 5 d.



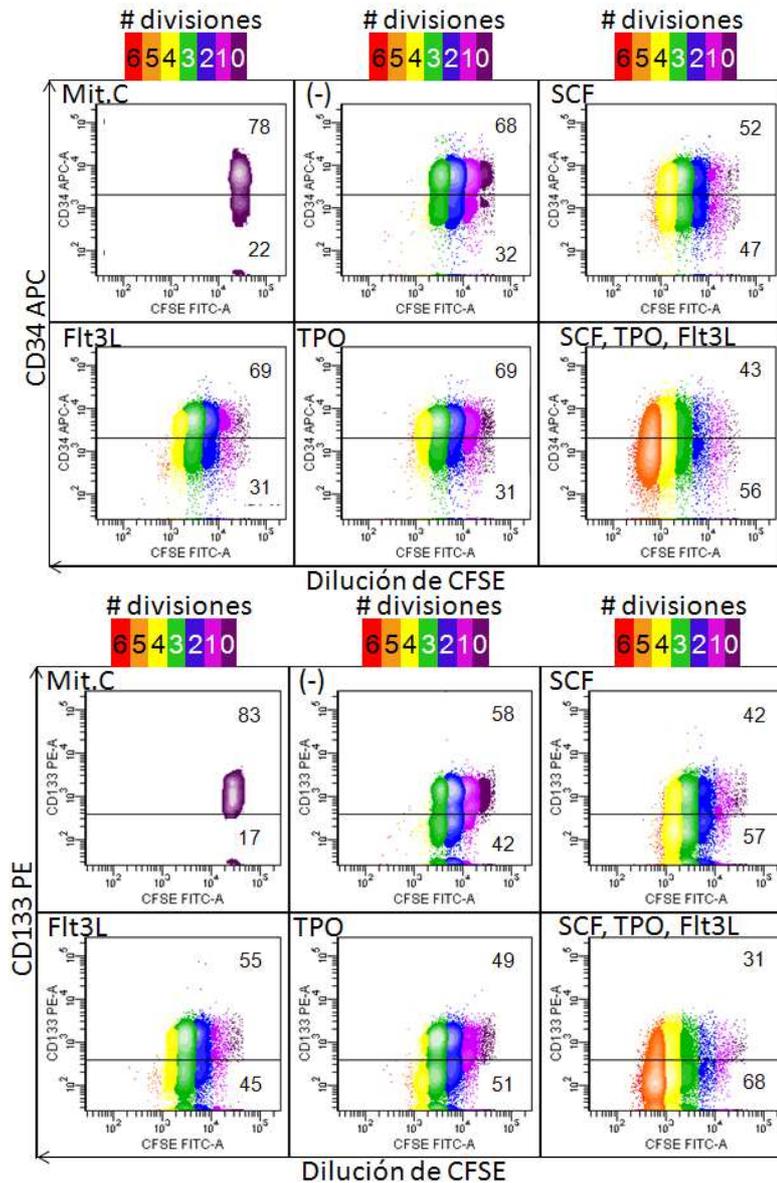
**Figura 18. Relación de la intensidad de expresión de CD34 al inicio y al final de la expansión de células CD34<sup>+</sup> en diferentes días de cultivo.**

Se determinó la intensidad media de fluorescencia (IMF) de marcación con el anticuerpo antiCD34APC en células CD34<sup>+</sup> recién aisladas (d0) y a los 2, 3, 4 y 5 días de cultivo de expansión con citoquinas de acción temprana. Se calculó la relación entre los promedios de intensidad media de fluorescencia (n=3) inicial (IMFi) y final (IMFf) en cada tiempo de cultivo.

La marcación intracelular con CFSE permite observar el número de mitosis de un grupo celular de acuerdo a la dilución de la fluorescencia repartida entre las células hijas. Esta estrategia permitió identificar la pérdida de los marcadores CD34 y CD133 con cada división celular. Las células CD34<sup>+</sup> marcadas con CFSE se estimularon con cada una de las citoquinas (SCF, TPO y Flt3L) o la combinación de las tres, teniendo como controles células previamente incubadas con mitomicina C y células incubadas sin citoquinas en medio completo.

Se estableció por citometría de flujo la expresión de CD34 y CD133 en estas células después de cinco días de estímulo. Se tabularon los porcentajes de células CD34<sup>alto</sup> y CD133<sup>+</sup> totales y de cada una de las divisiones celulares identificadas (Fig. 19, Fig. 20). En las figuras 19 y 20 se observa que el porcentaje de células CD34<sup>alto</sup> se puede mantener en las primeras divisiones celulares hasta que a partir de la cuarta división decae. En cuanto al marcador CD133, la mayor parte de su pérdida sucede en la primera y segunda divisiones celulares, se mantiene estable entre la segunda y la cuarta, volviendo a decaer después. El tratamiento individualizado con SCF, Flt3L y TPO aumenta la proliferación de las células cultivadas preservando con cada división la expresión CD34 (especialmente Flt3L y TPO) (Fig. 19, comparar cada citoquina con respecto al control (-)). Las células incubadas con las citoquinas combinadas proliferan más que con cada una individualmente (Fig. 19). Sin embargo como se observó anteriormente esto refleja una disminución drástica de la expresión del marcador CD34 (como se muestra en las Figs. 19 y 20, panel arriba). Estos resultados permiten establecer que la expresión de los marcadores de CSH CD34 y CD133 que es convergente en células frescas (Fig. 12) diverge con el cultivo de expansión de citoquinas combinadas. También se pudo observar que el marcador de selección CD34 se mantiene (o incluso aumenta) después de las primeras divisiones celulares mientras que el CD133 se pierde tempranamente con la división celular en todos los casos. Observando en conjunto los resultados de los días 5 y 14 de cultivo se puede concluir que las células CD34<sup>+</sup> mantienen un porcentaje relativamente constante de células CD34<sup>+</sup> desde su caída el día 5

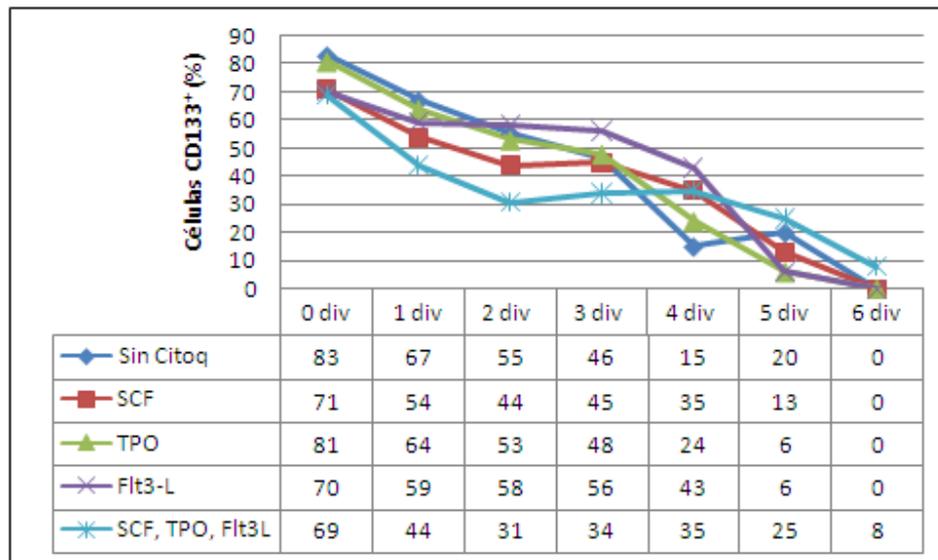
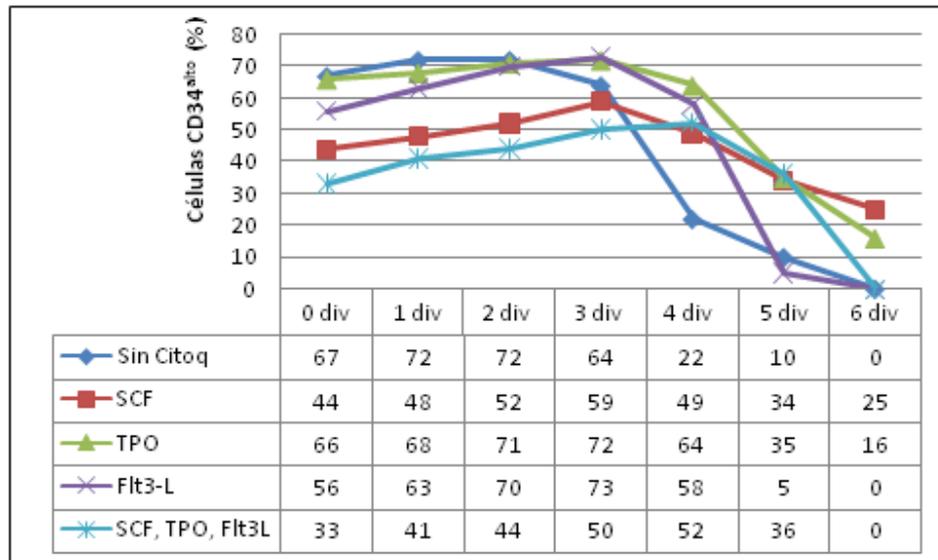
hasta el día 14 (comparar porcentajes Tabla 7, Fig. 13 con Fig. 19) mientras que el CD133 sufre una constante pérdida de expresión durante el cultivo que comienza desde la primera división celular.



**Figura 19. Proliferación celular y expresión de CD34 y CD133 en células CD34<sup>+</sup> expandidas en cultivo por cinco días.**

Se observa el resultado de las células CD34<sup>+</sup> marcadas inicialmente con 5  $\mu$ M de CFSE y cultivadas sin citoquinas (-), con SCF (50 ng/ml), TPO (50 ng/ml), Flt3-L (50 ng/ml) o con las tres citoquinas durante cinco días. Las células cosechadas se marcaron con los anticuerpos anti-CD34APC (arriba) y anti CD133PE (abajo). Se muestra el control de células tratadas con mitomicina C (Mit.C) que permite representar las células que no se han dividido (células de división 0). Se indica el tratamiento al que se expusieron las células en la esquina superior izquierda de cada diagrama.

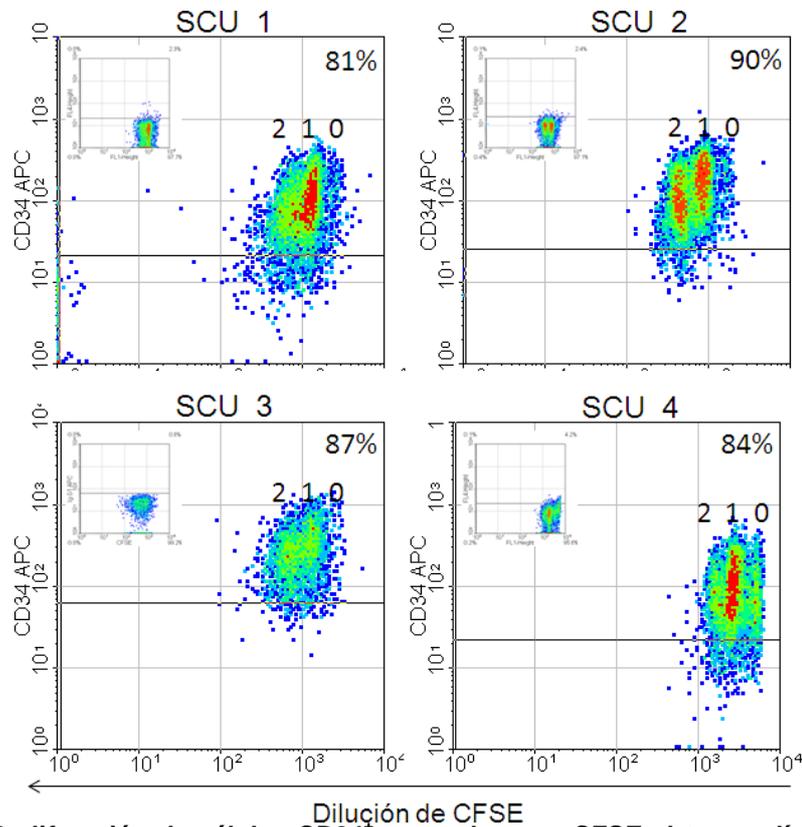
*Propiedades de adhesión, migración y motilidad de células stem hematopoyéticas expandidas con citoquinas de acción temprana en co-cultivo con células stem mesenquimales*



**Figura 20. Porcentajes de células CD34<sup>alto</sup> y CD133<sup>+</sup> en cada división celular.**

Se determinaron los porcentajes de células CD34<sup>alto</sup> (arriba) y CD133 (abajo) en cada una de las divisiones identificadas con la marcación por CFSE. Se observa el resultado de las células CD34 marcadas inicialmente con 5  $\mu$ M de CFSE y cultivadas sin citoquinas (Sin citoq.), con SCF (50 ng/ml), TPO (50 ng/ml), Flt3-L (50 ng/ml) o con las tres citoquinas durante cinco días. Se muestran los datos de una muestra representativa (n=3).

A partir de los anteriores ensayos se pudo establecer que para lograr el objetivo de obtener de células expandidas (divididas) pero mínimamente diferenciadas se debe tomar un punto de la expansión anterior a la caída drástica de CD34 al quinto día de cultivo y a la 4<sup>ta</sup> o 5<sup>ta</sup> división celular (Figs. 19 y 20). Anteriormente se había demostrado que a los tres días de cultivo en presencia de citoquinas más del 85% de las células seguían siendo CD34<sup>alto</sup> por lo que se determinó en un ensayo de CFSE de alta resolución, el grado de división de las células CD34<sup>+</sup> en diferentes muestras de SCU. En estos ensayos se demuestra que al 3<sup>er</sup> día de cultivo las células CD34<sup>+</sup> en su mayoría se han dividido entre una y dos veces preservando la expresión de CD34 (Fig. 21).

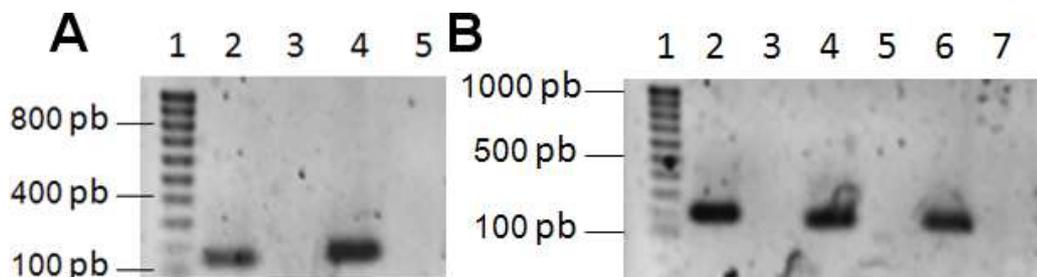


**Figura 21. Proliferación de células CD34<sup>+</sup> marcadas con CFSE al tercer día de cultivo con citoquinas de acción temprana.**

Se muestra el porcentaje de células CD34<sup>+</sup> con base en el umbral de fluorescencia menos uno (FMO) que se muestra dentro de cada diagrama. Se muestra el número correspondiente de divisiones celulares de acuerdo a la dilución de CFSE. Cada uno de los cuatro grandes diagramas representa una de cuatro muestras representativas de SCU (n=9).

#### 4.3.3 Expresión de Notch-1, Gata-2 y Bmi-1 en células CD34<sup>+</sup> expandidas

La expresión de factores transcripcionales como Bmi-1, Gata-2, HoxB4 y de moléculas como Notch-1 se utilizó como medida adicional en la valoración de la diferenciación hematopoyética o conservación de las propiedades *stem* hematopoyéticas durante el cultivo. Anteriormente, se mencionó la evidencia que apunta a que estos factores se regulan con la proliferación y diferenciación de las CSH. Se evaluó la cantidad relativa de ARNm de los genes mencionados, realizando una qRT-PCR a partir del cADN sintetizado de células CD34<sup>+</sup> frescas y expandidas por 5 y 14 días. Se valoró el cambio en la expresión de los genes en las células expandidas con respecto a las células frescas (también llamadas del día 0 de cultivo). Para verificar la especificidad de los *primers* sintetizados, se comprobó la presencia y los tamaños de los productos esperados de la RT-PCR en geles de agarosa (Tabla 4, Fig. 22). En la figura 22 se muestran los productos en los tamaños esperados (ver tabla en materiales y métodos) para cada pareja de *primers* específicos verificando la amplificación únicamente en los casos donde se realizó la reacción de retrotranscripción (carriles pares).

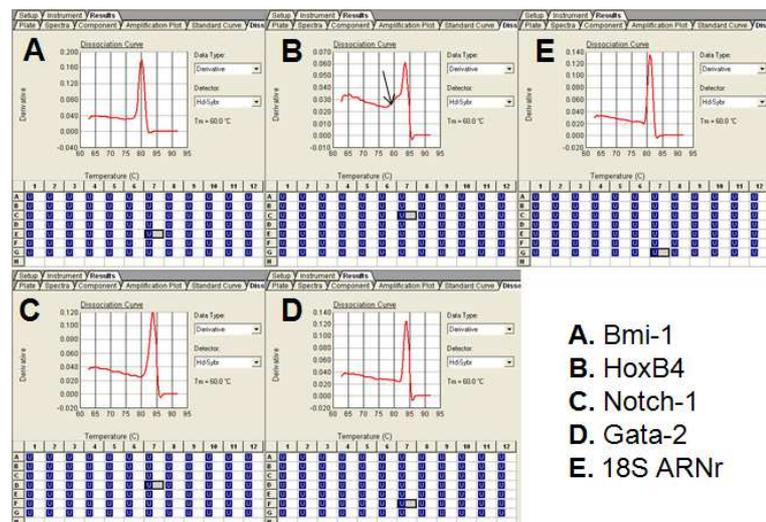


**Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR de células CD34<sup>+</sup> aisladas de SCU y expandidas durante 14 días.**

En cada uno de los geles se muestran los productos de reacciones de PCR a partir de cADN (carriles 2,4 y 6) o a partir del ARN total sin retrotranscripción (3, 5 y 7). A. Productos de la amplificación de HoxB4 (carriles 2 y 3), Notch-1 (carriles 4 y 5) B. Productos de amplificación de Bmi-1 (carriles 2 y 3), Gata-2 (carriles 4 y 5) y Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, Gapdh (carriles 6 y 7). La electroforesis, tinción y visualización de las bandas se desarrolló como se describe en la sección de materiales y métodos.

En el caso de la RT-PCR cuantitativa por el método de *SybrGreen* se recomienda observar la curva de disociación (*melting*) en primera derivada de cada amplificación, para verificar la presencia de un único amplicón. Los productos de

amplificación de Bmi-1, Gata-2 y Notch-1 mostraron picos únicos en la curva de disociación (Fig. 23) garantizando así la fiabilidad de las curvas de PCR en tiempo real. Desafortunadamente la curva disociación para HoxB4 a pesar de presentar una banda única del tamaño esperado en la electroforesis (Fig. 22), presenta un “hombro” que puede indicar inespecificidad (Fig. 23. B, flecha). Por esto se descartó el análisis de HoxB4 con esta pareja de *primers*.

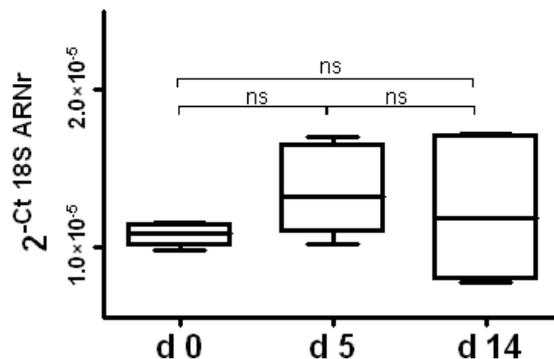


**Figura 23. Curvas de disociación en primera derivada de los productos de amplificación.**

Se muestra la curva del programa de los productos de cada una de las amplificaciones con los respectivos *primers*. Se indica con una flecha la “jorobas” en la curva del amplicón del gen HoxB4. Las curvas de disociación de los ampliaciones de Notch-1, Bmi-1, Gata-2 y el control 18S ARNr muestran un único pico.

Como control de calidad para este tipo de cuantificación relativa, se debe verificar que no se produzca un cambio significativo en la expresión del control interno (gen “*housekeeping*”) en los diferentes tratamientos (Peirson y cols, 2003; Schmittgen y cols, 2008). En experimentos preliminares se determinó que la expresión de la enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (Gapdh) cambiaba drásticamente con la expansión de las CSH, lo cual permitió descartar este gen como control interno. Otro candidato de control interno fue la subunidad 18 de ARN ribosomal (18S ARNr), que mostró un pico único en el análisis de primera derivada de la curva de disociación (Fig. 23). Para verificar su utilidad como gen de normalización se comparó el  $2^{-Ct}$  de las amplificaciones de cADN de células CD34<sup>+</sup> en días 0, 5 y 14 de expansión con citoquinas de acción temprana

(Schmittgen y cols, 2008). En la figura 24 se muestra el  $2^{-Ct}$  de la amplificación del 18S ARNr comparando células CD34<sup>+</sup> en los días 0, 5 y 14 de expansión. Se observó que en los días 5 y 14 de expansión la variabilidad de los datos se incrementa, sin embargo esto no repercute en un cambio significativo del valor de expresión (Fig. 24). Debido a este resultado se decide usar la subunidad 18S ARNr, como control interno para la normalización de los datos.

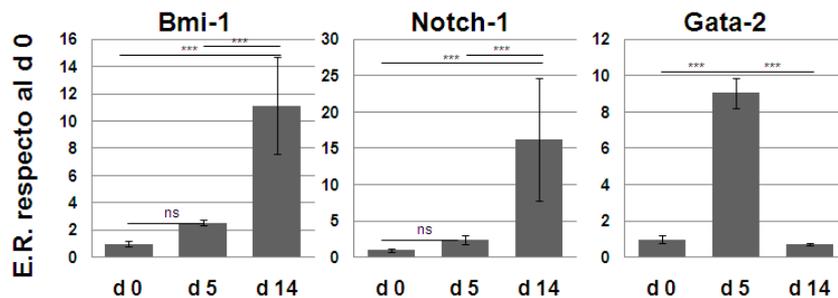


**Figura 24. Valoración de la subunidad 18 del RNAr como gen de normalización para los ensayos de qRT-PCR.**

Se verificó la variación en la expresión de 18S RNAr mediante el método descrito por Schmittgen y cols, 2008, comparando los valores de  $2^{-Ct}$  obtenidos para cada situación experimental. Las curvas y valores de Ct se obtuvieron del programa DART-PCR con los datos obtenidos de la PCR cuantitativa por el método de *SybrGreen* a partir de muestras de cADN de células CD34<sup>+</sup> recién aisladas (d 0), o expandidas durante 5 (d 5) o 14 días (d 14) (n=6). Test de Kruskal Wallis.

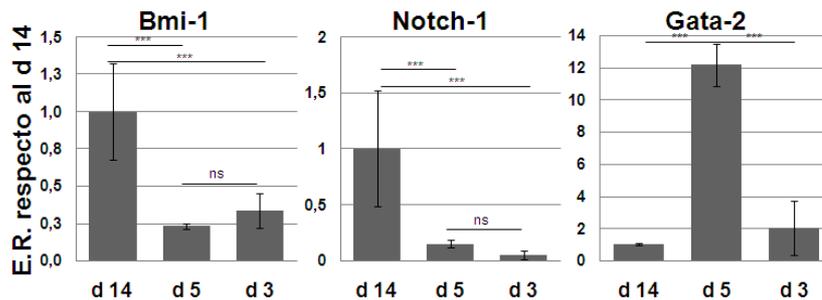
Con el propósito de establecer la dinámica de expresión de Bmi-1, Notch-1 y Gata-2 como genes relacionados con la autorenovación de las CSH se hizo un análisis de la expresión relativa del gen analizado con respecto a su control interno (18S ARNr). Luego se realizó una cuantificación relativa de la expresión en los días 5 y 14 con respecto a la expresión del día 0 (células menos diferenciadas) (Fig. 25) y otra en los días 3 y 5 con respecto a la expresión del día 14 (células más diferenciadas) (Fig. 26). En la cuantificación relativa de los días 5 y 14 de cultivo con respecto al día 0 (Fig. 25), se muestra que la expresión de los factores transcripcionales Bmi-1 y Notch-1 aumenta progresivamente, mientras que Gata-2 tiene un comportamiento bifásico durante el cultivo. Comparando con las células CD34<sup>+</sup> expandidas por catorce días, las expandidas por tres días no aumentan la expresión de Bmi-1 ni de Notch-1 (Fig. 26). Las células CD34<sup>+</sup>

expandidas por tres días no aumentan la expresión de Gata-2 como sucede en las expandidas durante cinco días (Fig. 26).



**Figura 25. Expresión relativa (ER) de los genes Bmi-1, Notch-1 y Gata-2 con respecto al día 0 de cultivo.**

Se muestra el cambio en el nivel de expresión de Bmi-1, Notch-1 y Gata-2 como una comparación del calibrador d0 (células frescas CD34<sup>+</sup>) y las condiciones experimentales de expansión en cultivo de células CD34<sup>+</sup> con citoquinas por cinco días (d5) y por catorce días (d14). En el eje vertical se indica el nivel de expresión en número de veces. La PCR cuantitativa se realizó por el método de *SybrGreen* a partir de muestras de cADN de células CD34<sup>+</sup> recién aisladas (d 0), expandidas durante 5 (5 d) y 14 días (d 14) (n=6). Se utilizó la expresión del 18S RNAr para la normalización y el día 0 como tratamiento calibrador.



**Figura 26. Expresión relativa (E.R.) de los genes Bmi-1, Notch-1 y Gata-2 con respecto al día 14 de cultivo.**

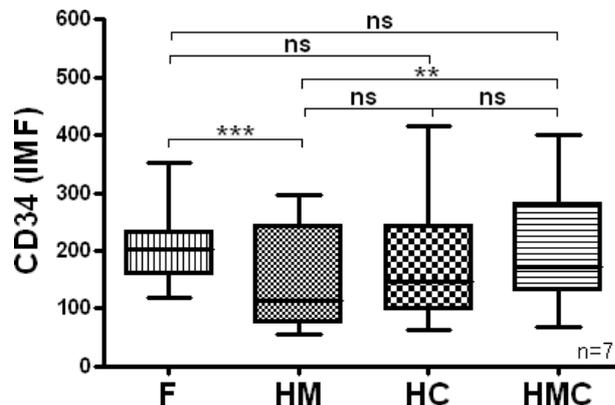
Se muestra el cambio en el nivel de expresión de Bmi-1, Notch-1 y Gata-2 como una comparación del calibrador d14 (células CD34<sup>+</sup> expandidas por 14 días) y las condiciones experimentales de expansión en cultivo con citoquinas de células CD34<sup>+</sup> por cinco días (d5) y por tres días (d3). En el eje vertical se indica el nivel de expresión en número de veces. La PCR cuantitativa se realizó por el método de *SybrGreen* a partir de muestras de cADN de células CD34<sup>+</sup> expandidas durante 14 (d 14), 5 días (d 5) y 3 días (d 3) (n=6). Se utilizó la expresión del 18S RNAr para la normalización y el día 14 como tratamiento calibrador.

Estos hallazgos sugieren que la transcripción de los genes Bmi-1 y Notch-1 aumenta en estas células durante la diferenciación pues aumentan relativa y progresivamente con respecto al día 0. La transcripción de estas moléculas se mantiene similar entre el día cero y tres de cultivo lo que concuerda con los hallazgos anteriores con respecto a la expresión de CD34 y CD133.

#### 4.4 Modelo de expansión de células CD34<sup>+</sup> en co-cultivo con CSM.

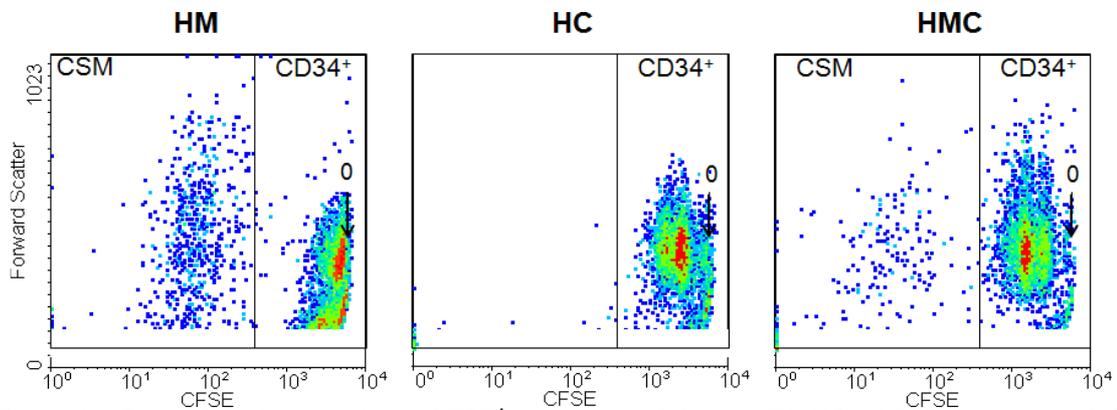
Con la optimización del aislamiento y expansión tanto de células CD34<sup>+</sup> como de CSM se continuó con el establecimiento del modelo de co-cultivo de células CD34<sup>+</sup> y CSM. Se establecieron dos condiciones de cultivo adicionales a la de la expansión de células CD34<sup>+</sup> con citoquinas de acción temprana por tres días (llamada en adelante condición HC, por Hematopoyéticas + Citoquinas): células CD34<sup>+</sup> co-cultivadas con CSM sin la adición de citoquinas (llamadas HM, Hematopoyéticas + Mesenquimales) y células CD34<sup>+</sup> co-cultivadas con CSM más citoquinas (HMC, Hematopoyéticas + Mesenquimales + Citoquinas).

Como medida de mantenimiento del fenotipo *stem* hematopoyético de las células CD34<sup>+</sup> en las distintas condiciones de cultivo, se cuantificó la intensidad media de fluorescencia (IMF) de marcación con el anticuerpo anti-CD34APC después de tres días de cultivo. Se utilizaron las intensidades medias de fluorescencia de duplicados de siete muestras de SCU independientes comparándolo con la IMF de las células CD34<sup>+</sup> frescas. Se realizó un análisis del cambio en la IMF del marcador CD34 entre los distintos tratamientos.



**Figura 27. Expresión de CD34 en células CD34<sup>+</sup> recién aisladas (F) y cosechadas después de tres días de cultivo con CSM (HM), con citoquinas (HC) o con CSM y citoquinas (HMC).** Se observa la intensidad media de fluorescencia de CD34 (IMF) de células CD34<sup>+</sup> recién aisladas o frescas (F), células CD34<sup>+</sup> co-cultivadas con CSM (HM), células CD34<sup>+</sup> cultivadas con citoquinas (HC), células CD34<sup>+</sup> cultivadas con CSM y citoquinas (HMC). Test de Friedman.  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*).

Se encontró que las células CD34<sup>+</sup> en las condiciones de cultivo HC y HMC mantienen más el marcador CD34 que su contraparte HM (Fig. 27). Por otra parte, solo la condición HM muestra diferencias significativas con el control de células frescas (F) (Fig. 27). Al tercer día de cultivo la expresión de CD34 se mantiene de la misma manera en las CSH cultivadas solo con citoquinas (HC) que en las cultivadas con citoquinas y en presencia de CSM (HMC) (Fig. 27). Debido a que las CSM son CD34<sup>-</sup> y pueden alterar la media de fluorescencia es importante aclarar que el anterior análisis se hizo únicamente sobre las células CD34<sup>+</sup> que habían sido previamente marcadas con CFSE, distinguiéndolas de las CSM (baja intensidad de fluorescencia) (Fig. 28). La selección de la región de células CFSE<sup>+</sup> se hizo sobre el diagrama de *forward scatter* vs CFSE (Fig. 28). En estos diagramas de citometría también se puede observar la diferencia en los tamaños celulares (*forward scatter*) entre CSM, CSH divididas y no divididas (0 divisiones) que se presentan con los distintos tratamientos (Fig. 28).

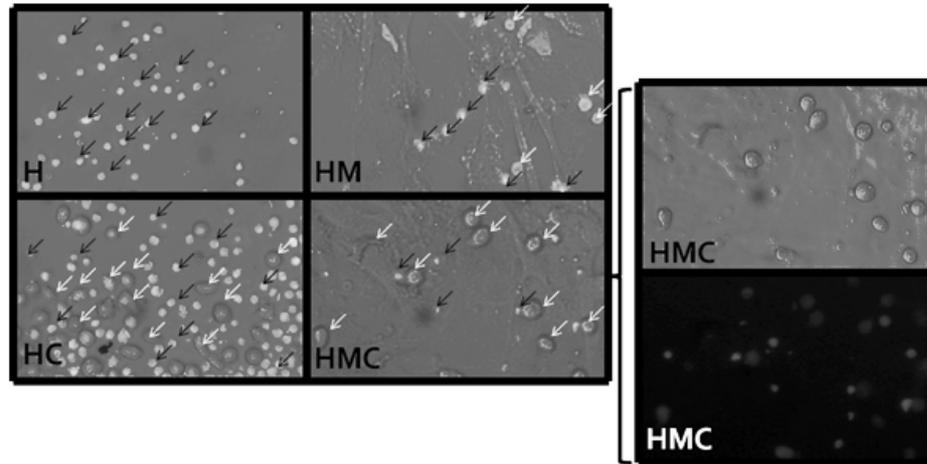


**Figura 28. Selección de las células CFSE<sup>+</sup> en las condiciones HM, HC y HMC para el análisis de la expresión de marcadores en las células CD34<sup>+</sup> cultivadas.**

Se compara el tamaño (*forward scatter*) y fluorescencia para distinguir las células CD34<sup>+</sup> y CSM cultivadas. Células cosechadas después de tres días de cultivo en las siguientes condiciones: células CD34<sup>+</sup> co-cultivadas con CSM (HM), células CD34<sup>+</sup> cultivadas con citoquinas (HC), células CD34<sup>+</sup> cultivadas con CSM y citoquinas (HMC). Se distinguen las CSM en los tratamientos HM y HMC por ser CFSE<sup>-</sup>. Se señala con una flecha y un 0 las células no divididas.

La microscopía de fluorescencia de las células CD34<sup>+</sup> cultivadas con los distintos tratamientos (Fig. 29) muestra que las células divididas que presentan un mayor tamaño tienen una menor intensidad de fluorescencia (flechas blancas) comparativamente con las células no divididas (flechas negras) (Fig. 29). Se

muestra en esta figura un control de células CD34<sup>+</sup> marcadas con CFSE sin estímulo (denominadas H) con células pequeñas y altamente fluorescentes. Se observó (en concordancia con lo mostrado por citometría) que el tratamiento con mayor número de células no divididas es HM seguido de HC y HMC, comparado con el control sin estímulo en donde ninguna célula se ha dividido.



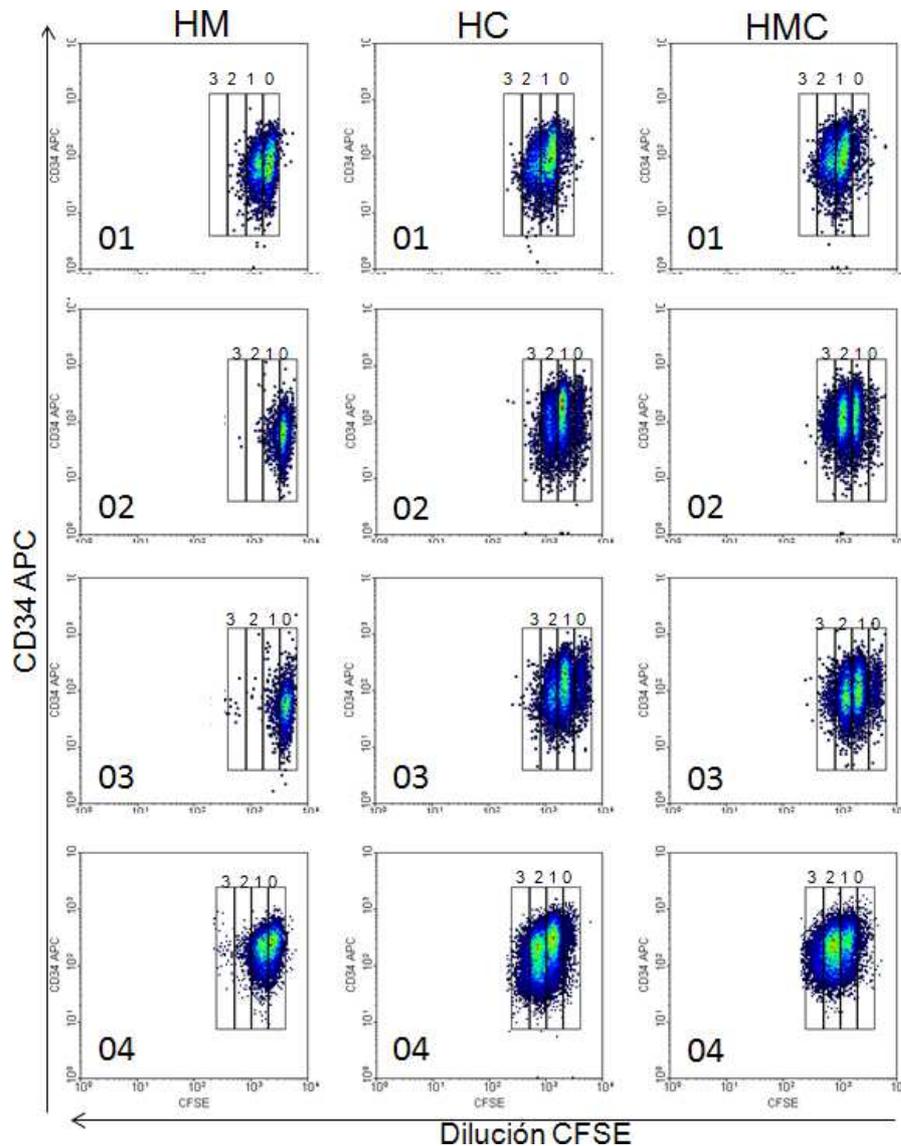
**Figura 29. Microscopía de fluorescencia y luz de los cultivos celulares después de tres días en las condiciones H, HM, HC y HMC.**

Se capturaron imágenes usando la lámpara de fluorescencia y la de luz blanca después del cultivo de tres días de células CD34<sup>+</sup> marcadas con CFSE. Se muestran las siguientes condiciones: células CD34<sup>+</sup> sin citoquinas (H), en co-cultivo con CSM (HM), con citoquinas (HC), en co-cultivo con CSM y citoquinas (HMC) (40X). Se señalan las células no divididas (flechas negras) y las divididas (flechas blancas). Las microfotografías de la derecha son la descomposición de la microfotografía de HMC mostrando arriba la microscopía de luz y abajo la de fluorescencia.

#### **4.4.1 Proliferación de células CD34<sup>+</sup> en co-cultivo con CSM y citoquinas**

En cada uno de los tratamientos se determinó el porcentaje de células CD34<sup>+</sup> que se dividieron una o varias veces. Se establecieron regiones en los diagramas de citometría de flujo con base en las distintas intensidades de fluorescencia de CFSE de las células no divididas o divididas, una, dos o tres veces (Fig. 30). Se definieron las regiones en cada muestra de SCU (Fig. 30, 01, 02, 03 y 04) y se calculó el porcentaje de cada región respecto al total de células CFSE<sup>+</sup> en cada tratamiento. Estos valores se promediaron obteniendo los porcentajes de división celular de los tratamientos HM, HMC y HC que se muestran en la figura 31.

*Propiedades de adhesión, migración y motilidad de células stem hematopoyéticas expandidas con citoquinas de acción temprana en co-cultivo con células stem mesenquimales*

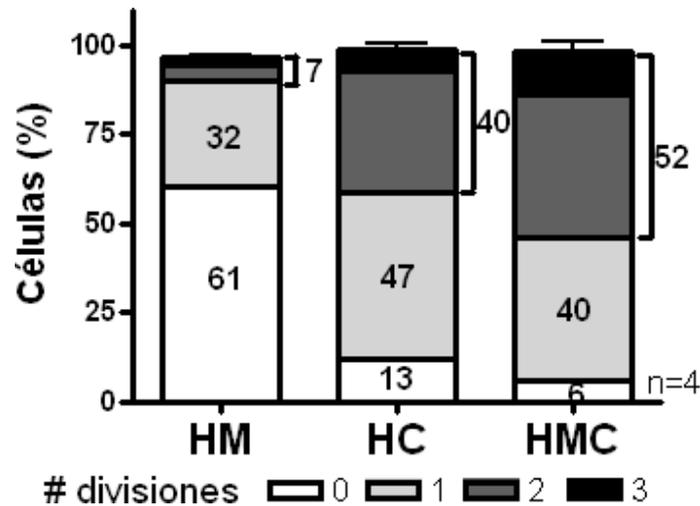


**Figura 30. Divisiones de las células CD34<sup>+</sup> previamente marcadas con CFSE en las condiciones HM, HC y HMC.**

Se muestran los diagramas de citometría de flujo de cuatro muestras de SCU (numeradas 01, 02, 03 y 04) previamente marcadas con CFSE y cosechadas después de tres días de cultivo en las siguientes condiciones: células CD34<sup>+</sup> co-cultivadas con CSM (HM), células CD34<sup>+</sup> cultivadas con citoquinas (HC), células CD34<sup>+</sup> cultivadas con CSM y citoquinas (HMC). Se señalan las regiones que definen el número de divisiones celulares, calibrado para cada muestra con base en el control sin división celular. Todas las muestras cosechadas se marcaron con el anticuerpo anti-CD34 acoplado a APC.

Se encuentra que al tercer día de cultivo un 90% de las células CD34<sup>+</sup> expuestas a citoquinas en presencia o ausencia de CSM (HMC y HC) se dividen al menos una vez. La mayoría de células CD34<sup>+</sup> cultivadas solo con CSM no se dividen y un 40% de ellas se ha dividido al menos una vez (Figs. 30 y 31). Las CSM

combinadas con citoquinas (HMC) parecen aumentar la tasa proliferativa de las células CD34<sup>+</sup> pues el porcentaje de células con más de una división supera el de las células incubadas con solo citoquinas (HC) (52% vs 40%) (Fig. 31).



**Figura 31. Promedio de los porcentajes de división de células CD34<sup>+</sup> en las condiciones HM, HC y HMC.**

Se analizaron los diagramas de citometría de dilución de CFSE de la figura 30 para el cálculo de los porcentajes de células divididas en cada tratamiento. Se muestran el porcentaje de las células no divididas (0, blanco), divididas una (1, gris claro), dos (2, gris oscuro) o tres (3, negro) veces en los tratamientos de CD34<sup>+</sup> co-cultivadas con CSM (HM), células CD34<sup>+</sup> cultivadas con citoquinas (HC), células CD34<sup>+</sup> cultivadas con CSM y citoquinas (HMC) (n=4). Al lado derecho de cada barra se encuentra la sumatoria de los porcentajes de células divididas más de una vez.

Para verificar los resultados de división celular en cada tratamiento se hizo el correspondiente conteo en cámara de *Neubauer* de las células cosechadas después de tres días de cultivo en los tratamientos HM, HC y HMC comparando con el número de células sembrado inicialmente. En la figura 32 se muestran los datos y el análisis estadístico de los conteos en cámara de *Neubauer* después del cultivo. El número de células obtenido después del cultivo de células CD34<sup>+</sup> con citoquinas en presencia o ausencia de CSM (HMC y HC) es significativamente mayor que el obtenido después del co-cultivo de células CD34<sup>+</sup> con CSM (HM). En el caso de HMC, después de tres días se obtiene aproximadamente el doble de células de las sembradas inicialmente (Fig. 32).

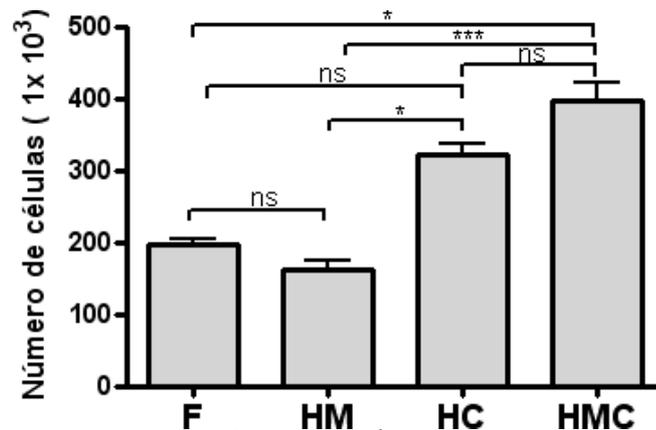


Figura 32. Promedio del número de células CD34<sup>+</sup> sembradas (F) y cosechadas al tercer día de cultivo en las condiciones HM, HC y HMC.

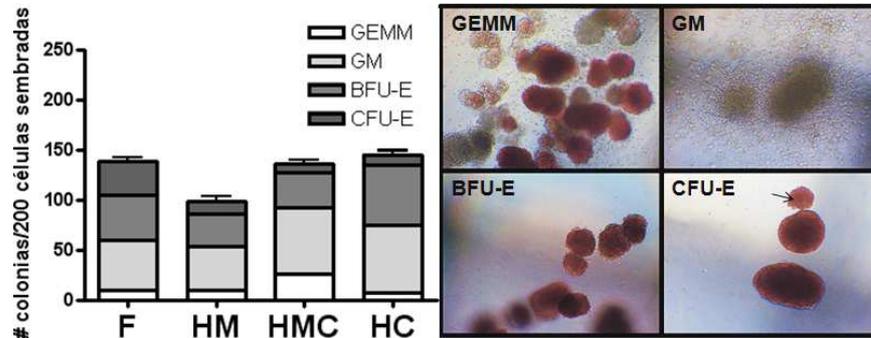
Las células cosechadas de dos pozos (placa de 24 pozos) se contaron en cámara de Neubauer al tercer día de los diferentes tratamientos de cultivo. Células CD34<sup>+</sup> en co-cultivo con CSM (HM), con citoquinas (HC) o con CSM y citoquinas (HMC). El análisis estadístico se realizó con base en los resultados de estos tratamientos en células CD34<sup>+</sup> aisladas de cuatro muestras de SCU independientes. Test de Friedman.  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,05$  (\*).

#### 4.4.2 Clonogenicidad y expresión de Bmi-1, Notch-1 y Gata-2 en células CD34<sup>+</sup> expandidas y en co-cultivo con CSM.

Para verificar la capacidad clonogénica después de los tratamientos HM, HC y HMC se realizaron ensayos de clonogenicidad sembrando un número igual de células cosechadas en medio *MACS® HSC-CFU complete with Epo* y contando las colonias formadas después del cultivo. En la figura 33 se observa el promedio del conteo total de colonias de las condiciones HM, HC y HMC comparadas con el de las células frescas. Se muestran las colonias clasificadas: granulo-eritromonocito-macrófago (GEMM), granulocito-macrófago (GM), colonias de brotes eritroides (BFU-E) y colonias eritroides (CFU-E) (Fig. 33).

Al analizar el número total de colonias formadas se observa que la clonogenicidad de HC y HMC no difiere de la de células frescas (Fig. 33). La clonogenicidad de HM es menor que la de células frescas (Fig. 33), lo que puede estar relacionado con una expresión más baja de CD34 (Fig. 27). El co-cultivo de CSH con CSM sin citoquinas (HM), no solo no aumentó los números de células CD34<sup>+</sup> (Figs. 30-32), sino que las CSH perdieron expresión del CD34 (Fig. 27). Los tratamientos HC y

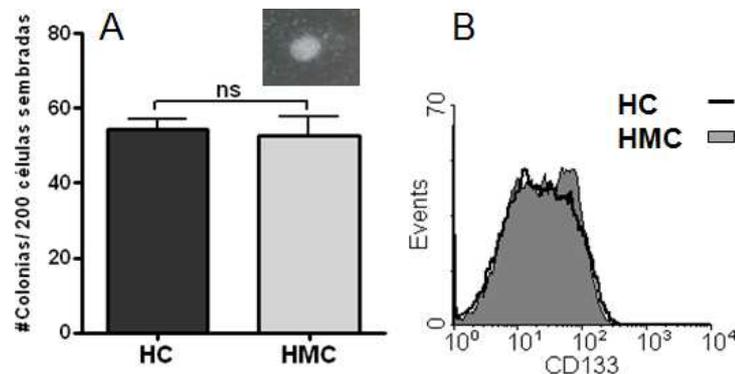
HMC, que permitieron la expansión de la población de CSH manteniendo el marcador CD34 y la clonogenicidad se analizaron más a fondo a continuación.



**Figura 33. Clonogenicidad primaria de las células CD34<sup>+</sup> frescas (F) y cosechadas al tercer día de cultivo en las condiciones HM, HC y HMC.**

Se sembraron en cajas de 24 pozos,  $2 \times 10^2$  células cosechadas de cada tratamiento resuspendidas en 500  $\mu$ l de medio MACS® HSC-CFU complete with Epo. Después de 14 días de cultivo se contaron y clasificaron morfológicamente las colonias en GEMM, GM, BFU-E y CFU-E.

Ensayos de evaluación rápida de clonogenicidad (antes de la hemoglobinización de la colonia) muestran una equivalencia en la capacidad de formar colonias en HC y HMC (Fig. 34A). Además la evaluación de la expresión de CD133 entre HC y HMC muestra niveles similares de este marcador (Fig. 34B).

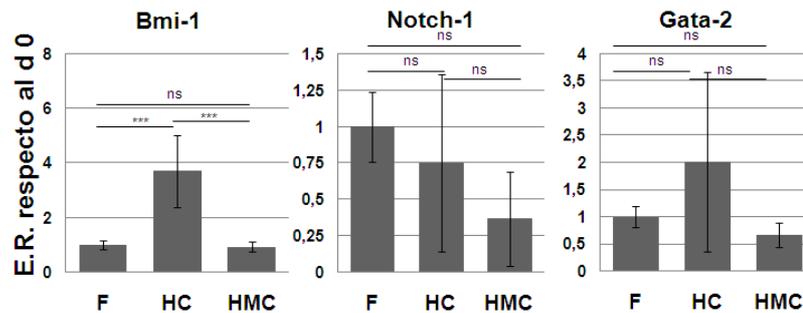


**Figura 34. Clonogenicidad y expresión del marcador CD133 en HC y HMC.**

**A.** Se sembraron en cajas de Petri de 35 mm,  $1 \times 10^3$  células cosechadas de cada tratamiento resuspendidas en 1500  $\mu$ l de medio MACS® HSC-CFU complete with Epo. Después de 7 días de cultivo se enumeraron las colonias. Se muestra una foto de una colonia característica propia de estos ensayos. **B.** Histogramas de citometría de la expresión del marcador CD133 en HC y HMC. Las células se cosecharon y marcaron con el anticuerpo anti-CD133PE.

En cuanto al cambio en la expresión de los genes Bmi-1, Notch-1 y Gata-2, en HC y HMC con respecto a las células frescas se observó que no hay cambios

significativos de los genes Notch-1 y Gata-2 entre células frescas, HC y HMC (Fig. 35). Tampoco la expresión de Bmi-1 cambia en HMC comparativamente con las células frescas. Únicamente en HC, Bmi-1 se expresa casi entre 2 y 4 veces más (Fig. 35) comparativamente con las células recién aisladas y HMC.



**Figura 35. Expresión relativa (ER) de los genes Bmi-1, Notch-1 y Gata-2 en las condiciones HC y HMC con respecto al día 0 de cultivo (F).**

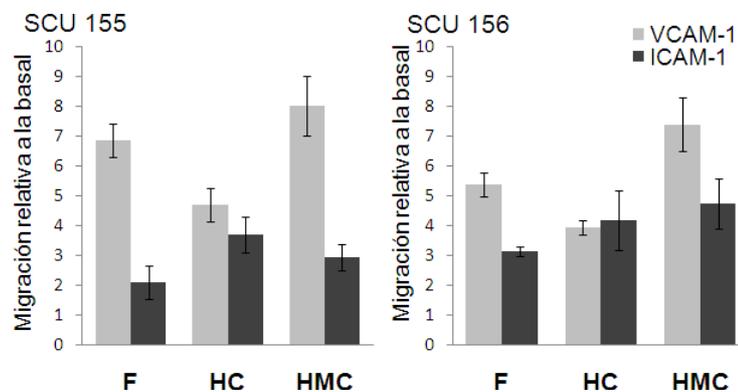
Se muestra el cambio en el nivel de expresión de Bmi-1, Notch-1 y Gata-2 como una comparación del calibrador d0 (células frescas CD34<sup>+</sup>) y las condiciones experimentales de expansión HC y HMC al día 3 de cultivo. En el eje vertical se indica el nivel de expresión en número de veces. Los datos de fluorescencia umbral se obtuvieron del programa DART-PCR a partir de los datos de fluorescencia cruda exportada de la PCR cuantitativa (SybrGreen). Se utilizó la expresión del 18S RNAr para la normalización y el día 0 como tratamiento calibrador. n=6.

Estos resultados en conjunto revelan que los tratamientos de HC y HMC al tercer día de cultivo presentan diferencias mínimas en cuanto a su fenotipo de expresión de marcadores CD34, CD133, su capacidad proliferativa, clonogénica y la expresión de genes relacionados con la actividad hematopoyética. Esto hace que estos tratamientos sean comparables en cuanto a la diferenciación hematopoyética para permitir el análisis del efecto del co-cultivo de CSM sobre las capacidades adhesivas y migratorias de las células *stem* hematopoyéticas expandidas con citoquinas de acción temprana.

#### **4.5 Migración de células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas en presencia y ausencia de CSM.**

Como se mencionó anteriormente distintas moléculas de adhesión como VLA-4, VLA-5 y LFA-1, así como el receptor de quemoquinas CXCR4 y su ligando SDF-1 son fundamentales en los procesos de migración y adhesión hematopoyética. Recientemente, se ha demostrado que la expansión de CSH a corto plazo (tres

días) con citoquinas solubles afecta la transmigración y retención *in vivo* de las CSH en la MO (Ahmed y cols, 2004; Foguene y cols, 2009), específicamente por procesos mediados por VLA-4 y CXCR4 (Foguene y cols, 2009). Dichos efectos se reproducen en ensayos de migración y adhesión *in vitro* en presencia de los ligandos de estas moléculas (Foguene y cols, 2009). Con el propósito de comparar las habilidades migratorias en células CD34<sup>+</sup> frescas y expandidas en presencia y ausencia de CSM se observó el efecto de la expansión en la migración celular *in vitro* en presencia de los ligandos de VLA-4 y LFA-1 (VCAM-1 e ICAM-1, respectivamente).



**Figura 36. Migración *in vitro* mediada por VCAM-1 e ICAM-1 de células CD34<sup>+</sup> frescas (F) y en las condiciones HC y HMC.**

Se muestran los resultados de los ensayos de migración *in vitro* con *transwell* recubiertos con 10 µg/ml de VCAM-1 (gris) e ICAM-1 (negro). Se muestra la migración relativa a la basal (sin ligando). El cálculo de la migración relativa se realizó dividiendo el número de células que migran en presencia del ligando sobre el número de células que migran espontáneamente sin ligando. Se muestran los resultados de las réplicas de dos muestras de SCU (155 y 156).

En la figura 36 se observan los resultados de la migración a través de insertos recubiertos con VCAM-1 (gris) e ICAM-1 (negro) de células CD34<sup>+</sup> aisladas de dos muestras independientes de SCU. Al comparar la migración inducida por VCAM-1 e ICAM-1 en células frescas (F) se observa que la migración inducida por VCAM-1 es 2,5 veces mayor que la inducida por ICAM-1 (en promedio de las dos muestras) y que la expansión con citoquinas de acción temprana (HC) consistentemente induce la reducción de esta diferencia. Este efecto es derivado en gran parte por la disminución de la transmigración en VCAM-1 y a un ligero aumento de la migración en ICAM-1 en las células expandidas (HC) (Fig. 36). De

manera interesante, la adición de CSM en el cultivo de expansión con citoquinas, permite mantener la diferencia relativa de la migración VCAM-1/ICAM-1 en las células CD34<sup>+</sup> co-cultivadas (Fig. 36, HMC). Al repetir estos ensayos en otras muestras calculando el porcentaje de migración mediada por VCAM-1, ICAM-1 y fibronectina (FBN) se observó que predomina la migración mediada por VCAM-1 sobre la migración mediada por ICAM-1 o FBN. (Fig. 37). Además, las células CD34<sup>+</sup> co-cultivadas y estimuladas con citoquinas (HMC) muestran nuevamente una mayor migración a través de VCAM-1 que HC (Fig. 37).

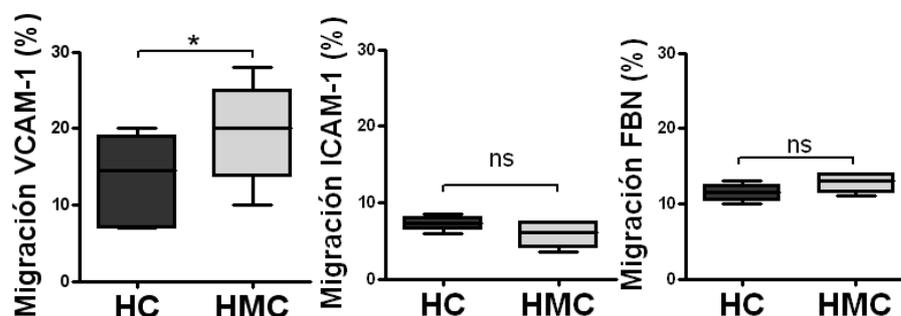


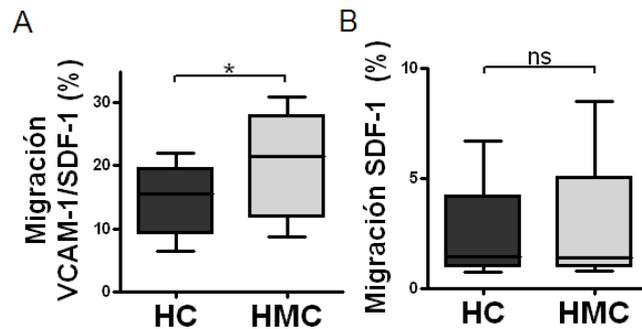
Figura 37. Migración *in vitro* mediada por VCAM-1, ICAM-1 y FBN en HC y HMC.

Se muestran los resultados de los ensayos de migración *in vitro* con *transwell* recubiertos con VCAM-1 (10 µg/ml), ICAM-1 (10 µg/ml) y FBN (25 µg/ml). Se muestran los porcentajes de células que migraron después de 4 h de incubación. Se analiza la migración *in vitro* en células CD34<sup>+</sup> cultivadas con citoquinas (HC) y células CD34<sup>+</sup> cultivadas con CSM y citoquinas (HMC) tres días (n=6). \*  $p < 0,05$ .

#### 4.6 Quimiotaxis de células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas en presencia y ausencia de CSM.

La quemoquina SDF-1 (o CXCL12) es el principal agente quimiotáctico de las CSH (Jo y cols, 2000). La combinación SDF-1 y VCAM-1 es sinérgica para inducir la migración *in vitro* de CSH no expandidas (Foguenne y cols, 2009). Además, la expansión de CSH con citoquinas afecta la sinergia entre estas dos señales (SDF-1 y VCAM-1) (Foguenne y cols, 2009). Por lo tanto, para saber si el co-cultivo con CSM tenía algún efecto sobre la migración inducida por la combinación de VCAM-1 y SDF-1, se comparó la migración de las células cosechadas en las condiciones HC y HMC ante estos estímulos combinados. En la figura 38A, se demuestra que no hay un efecto adicional inducido por SDF-1 en células expandidas (dado que los porcentajes no cambian significativamente con

respecto a la figura 37), lo cual se explica en parte por la muy baja migración (en promedio <5%) inducida con el SDF-1 únicamente (Fig. 38B). Sin embargo se sigue manteniendo la diferencia en porcentaje de migración inducida por VCAM-1 en HMC comparada con HC (Fig. 38A).

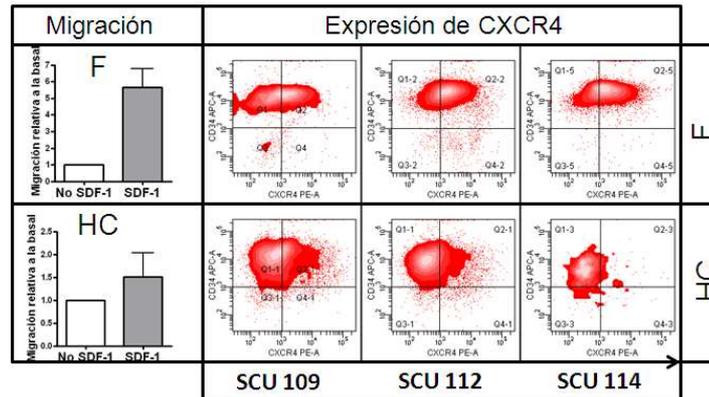


**Figura 38. Migración *in vitro* mediada por VCAM-1 y SDF-1 en HC y HMC.**

**A.** Migración de HC y HMC mediada por VCAM-1 en presencia de SDF-1. **B.** Quimiotaxis mediada por SDF-1. Porcentaje de células CD34<sup>+</sup> cultivadas con citoquinas (HC) y células CD34<sup>+</sup> cultivadas con CSM y citoquinas (HMC) que migraron con respecto al total sembrado, después de 4 h de incubación, adicionando SDF-1 (100 ng/ml) a la cámara inferior del *transwell*. (n=6). \* p< 0,05.

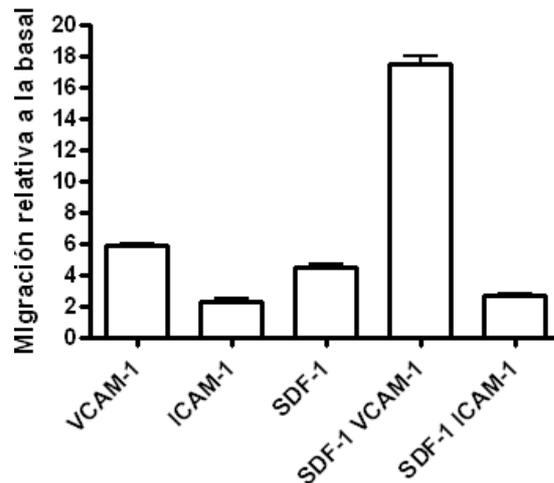
Esta baja actividad quimiotáctica migratoria en respuesta al SDF-1 no se observa en células frescas (F), ya que en estas células la migración puede aumentar entre 3 y 7 veces el nivel de migración basal (Fig. 39), lo cual corresponde con una mayor expresión de CXCR4 en células CD34<sup>+</sup> recién aisladas (Fig. 39). En esta figura se observa que la inducción de migración con SDF-1 en estas células expandidas con citoquinas es muy baja (HC) y corresponde con una menor expresión de CXCR4 (Fig. 39). Se muestra en la figura 40 el perfil migratorio de una muestra de células CD34<sup>+</sup> frescas en el que se observa la inducción de la migración por SDF-1 y la sinergia ante estímulo combinado VCAM-1 y SDF-1 reportada por otros (Jo y cols, 2000; Bonig y cols, 2006; Foguene y cols, 2009). Según esta figura el mayor estímulo migratorio en células frescas CD34<sup>+</sup> es el estímulo combinado VCAM-1 y SDF-1, seguido de VCAM-1 y de SDF-1 como estímulos únicos (Fig. 40). Por último se ubicaría el estímulo de ICAM-1 en ausencia y presencia de SDF-1 (Fig. 40). Esta jerarquía de estímulos migratorios se propuso anteriormente en progenitores hematopoyéticos murinos como fundamento para su anidación en la MO (Bonig y cols, 2006).

Anteriormente se ha descrito que la expresión del CXCR4 disminuye en células expandidas con citoquinas (Fig. 39) (Denning-Kendall y cols, 2003) de acuerdo también con nuestros resultados. Inesperadamente, al comparar la expresión de CXCR4 entre HC y HMC se encontró una diferencia significativa (Fig. 41A) la cual no repercutió en los ensayos de migración con SDF-1 (Fig. 38B).



**Figura 39. Migración inducida por SDF-1 y expresión del receptor CXCR4 de células CD34<sup>+</sup> frescas (F) y expandidas con citoquinas (HC).**

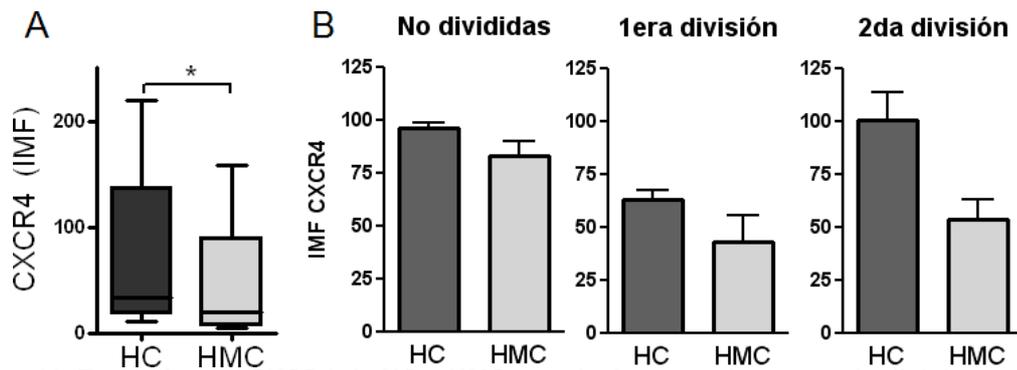
Se muestra la migración inducida con respecto a la migración basal (izquierda, migración) y la expresión de CXCR4 y CD34 correspondiente en tres muestras diferentes (SCU 109, 112 y 114). Se muestran los diagramas de células frescas (F) y HC correspondientes a cada muestra.



**Figura 40. Migración *in vitro* mediada por diferentes estímulos en células CD34<sup>+</sup> frescas.**

Se muestra la migración relativa a la basal (sin ligando) inducida con 10 µg/ml de los ligandos VCAM-1 e ICAM-1. Se muestra la migración inducida por la adición de SDF-1 en la cámara inferior en presencia o ausencia de los ligandos mencionados. Se muestra el resultado del cálculo de la migración inducida como en las figuras 36 y 39 de una muestra representativa de células CD34<sup>+</sup> recién aisladas (n=2).

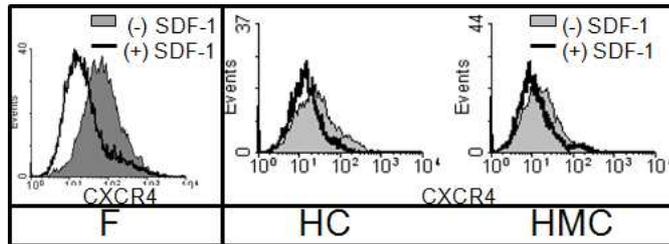
Se encontró que las células co-cultivadas con CSM y con citoquinas pierden más la expresión de CXCR4 que su contraparte con citoquinas solas (Fig. 41A y B). Al analizar la IMF de CXCR4 de cada división celular (CFSE) se encontró que las células co-cultivadas con CSM mantienen la regulación negativa de CXCR4 en las diferentes divisiones (Fig. 41B). Por su parte, las células que se han expandido solo con citoquinas recuperan la expresión del CXCR4 (Fig. 41B).



**Figura 41. Expresión de CXCR4 de HC y HMC en relación con el número de divisiones.**

**A.** Intensidad media de fluorescencia (IMF) de la expresión de CXCR4 comparativa entre HC y HMC n=7. **B.** IMF del CXCR4 HC y HMC en cada división celular cuantificada separando las regiones como en la figura 32.

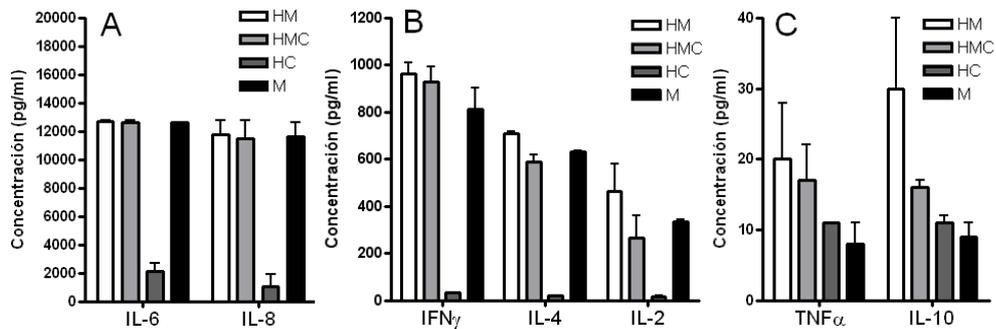
La funcionalidad del eje SDF-1/CXCR4 se puede observar por la endocitosis del receptor CXCR4 luego de la incubación con SDF-1 (Peled y cols, 2002). Con estos ensayos se observa que en las células frescas el receptor se endocita visiblemente con la estimulación por SDF-1 (Fig. 42, frescas (F) panel de la izquierda). Mientras tanto en las células expandidas (HC y HMC) la endocitosis se presenta pero en una menor proporción (Fig. 42, paneles del medio y de la derecha). Las células en la condición HC con respecto a las HMC, aparentemente tienen una endocitosis mayor del CXCR4 (luego del estímulo con SDF-1) tal vez por una expresión basal mayor del receptor. Estos resultados confirman la funcionalidad del eje CXCR4/SDF-1 en las células frescas y expandidas, sugiriendo un umbral más alto de estimulación quimiotáctica para las células expandidas (HC y HMC), especialmente en HMC por su menor expresión de CXCR4 (Fig. 41A) y menor endocitosis inducida (Fig. 42).



**Figura 42. Endocitosis del receptor CXCR4 después de la estimulación con SDF-1 en células CD34<sup>+</sup> F, HC y HMC.**

Se muestra la expresión basal del receptor (histograma relleno gris oscuro), después del tratamiento con SDF-1 por 30 min a 37°C (línea negra). Se presentan los datos de una muestra representativa de cada ensayo.

Una manera de aumentar la quimiotaxis de CSH es a través de la estimulación con medio condicionado de CSM (Peled y cols, 2002). El medio condicionado (Me.Co.) contiene diferentes concentraciones de citoquinas y quemoquinas secretadas por las CSM que en conjunto refuerzan el estímulo quimiotáctico para las CSH. Ante la posibilidad de escoger entre distintos medios condicionados de CSM, se determinó la concentración de citoquinas en los sobrenadantes obtenidos después de tres días de cultivo de CSM (M) y en co-cultivo con HM, HMC y HC mediante un arreglo de perlas para detección de citoquinas (CBA, *cytokine bead array*) (Fig. 43).



**Figura 43. Concentración de citoquinas en medios condicionados.**

**A.** IL-6 e IL-8. **B.** IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-2. **C.** TNF $\alpha$  e IL-10. Se cuantificó la concentración de IL-6, IL-8, IFN $\gamma$ , IL-4, IL-2, TNF $\alpha$  e IL-10 en los sobrenadantes cosechados de los cultivos de CSM solas (M), células CD34<sup>+</sup> en co-cultivo con CSM (HM), con citoquinas (HC) o con CSM y citoquinas (HMC). Estas concentraciones se determinaron por el método de CBA con los *kits* de citoquinas de inflamación y Th1/Th2, como se describe en la sección de materiales y métodos. n=6.

Se estableció que los sobrenadantes de cultivos que contienen CSM (HM, HMC y M) contienen cantidades similares de IL-6, IL-8, IFN $\gamma$ , IL-4, IL-2, TNF $\alpha$  e IL-10

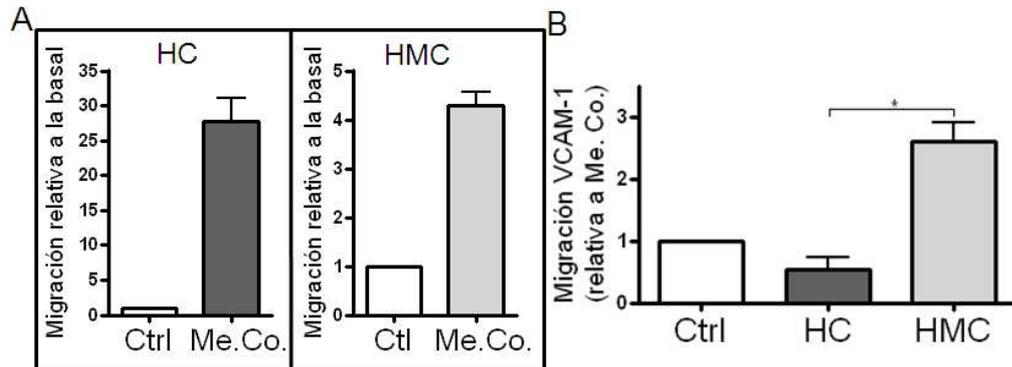
(Fig. 44 A, B y C) independientemente si contienen o no células CD34<sup>+</sup>. Además se detectaron cantidades sustanciales de IL-6 e IL-8 (~12 ng/ml) que son factores importantes en la activación y migración de células CD34<sup>+</sup>, respectivamente. El medio condicionado de HMC (Me.Co) contiene cantidades similares de citoquinas que el de CSM solas (M) (Fig. 43), pero adicionalmente contiene cantidades conocidas de citoquinas de acción temprana (Tabla 8). Por esta razón se usó para los ensayos de migración de células expandidas en las condiciones HC y HMC (Fig. 44).

**Tabla 8. Concentración de citoquinas en medio condicionado HMC.**

Composición del medio condicionado HMC (Me.Co.). Se muestra en la tabla de la izquierda la concentración de citoquinas determinadas por el ensayo de CBA y a la derecha la concentración de citoquinas y SFB que se adicionó al inicio del cultivo.

Citoquinas	Concentración (ng/ml)	Medio de cultivo (IMDM + glutamax) y adición de:	Concentración
IL-8	12,6 (+/- 1,2)	SCF	50 ng/ml
IL-6	12,7 (+/- 0,077)	Flt-3L	50 ng/ml
IFN- $\gamma$	0,929 (+/- 0,065)	TPO	50 ng/ml
IL-4	0,587 (+/- 0,031)	SFB	10%
IL-2	0,360 (+/- 0,093)		
TNF- $\alpha$	0,120 (+/- 0,05)		
IL-10	0,170 (+/- 0,02)		

En los ensayos de migración con el medio condicionado descrito (Me.Co.) se encuentra una gran inducción de la migración en HC comparada con la que se encuentra en HMC (~25 vs ~5 veces) (Fig. 44A). Esta diferencia podría estar relacionada con la mayor expresión relativa del receptor CXCR4 en HC comparada con la de HMC (Fig. 41A y B), pues se espera que el Me.Co. contenga SDF-1 entre otras citoquinas (Van Overstraeten-Schlögel y cols, 2006). Al evaluar la migración mediada por VCAM-1 estimulando quimiotácticamente las células con el medio condicionado (Me.Co.), se observa que solo las células CD34<sup>+</sup> en la condición HMC son inducidas a migrar con el estímulo de VCAM-1 (Fig. 44B). Por su parte, las células expandidas en la condición HC no solamente no se inducen a migrar en presencia de los estímulos de VCAM-1 y medio condicionado combinados, sino que hay una disminución relativa de la migración con respecto al basal. Estos hallazgos refuerzan el postulado de que la expansión con citoquinas de células CD34<sup>+</sup> en condiciones de co-cultivo con CSM favorece la migración de las células a través de la molécula VCAM-1.



**Figura 44. Migración inducida por medio condicionado (Me.Co.) en ausencia y presencia de VCAM-1 en células cultivadas en las condiciones HC y HMC.**

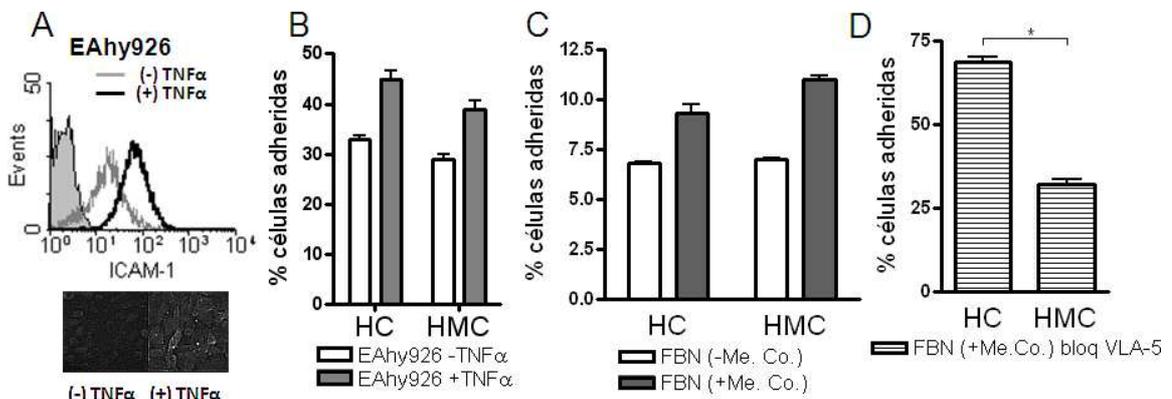
**A.** Migración relativa en Me.Co. con respecto a la migración basal de HC y HMC. **B.** Migración relativa de HC y HMC inducida por los estímulos combinados de VCAM-1 y Me.Co. con respecto a la migración inducida por Me.Co. n=4.

En el proceso de trasmigración ante un sustrato, las células deben adherirse con cierta especificidad pero a su vez tener los mecanismos para desprenderse del mismo y permitir un desplazamiento efectivo (Mañes y cols, 1999). Uno de los mecanismos que pueden explicar la disminución específica de la migración de CSH a través de VCAM-1 (derivada de la estimulación con citoquinas de acción temprana) es un cambio en la adhesividad de estas células a VCAM-1 alterando el proceso adhesión/de-adhesión necesario para la trasmigración.

#### **4.7 Adhesión de células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas en presencia y ausencia de CSM.**

Debido a que el efecto diferencial, inducido por el co-cultivo con CSM, en la migración mediada por VCAM-1 en células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas, puede estar relacionado con la adherencia, se evaluó la adhesividad a ICAM-1, FBN y VCAM-1. La adherencia a ICAM-1 se evaluó usando la línea celular endotelial EAhy926, que expresa ICAM-1 de manera constitutiva e inducible (Fig. 45A) (Lindington y cols, 1999). Esta línea carece de la expresión de VCAM-1 (Lindington y cols, 1999). La adherencia de las células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas únicamente (HC) o en co-cultivo con CSM (HMC) a células EAhy926 previamente estimuladas o no con TNF $\alpha$  (10 ng/ml) se observa en la figura 45B. Se observan los resultados de los ensayos de adhesión a la línea celular

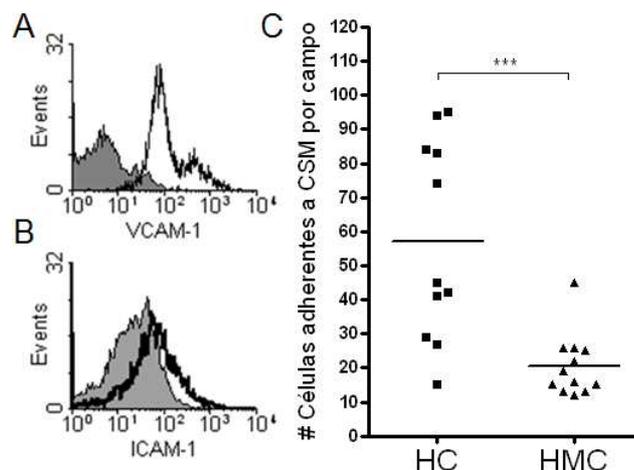
EAhy926 no estimulada, en que células tratadas en las condiciones HMC y HC se adhieren en porcentajes similares (Fig. 45B). Además, se observa que el incremento en la adherencia después de la inducción de la expresión de ICAM-1 en las EAhy926 también es similar en HC y HMC (Fig. 45B). Se evaluó también la adherencia de HC y HMC a FBN, usando medio condicionado como estimulante de la adherencia celular. En estos ensayos (Fig. 45C) se observa que la adherencia basal a FBN, así como su incremento en respuesta al estímulo con Me.Co. es similar tanto en HC como en HMC. Al bloquear la adherencia a FBN mediada por VLA-5, con el anticuerpo SAM-1, se visualiza la adherencia a FBN mediada por VLA-4 (Fig. 45D). En estas condiciones, la adherencia a la FBN de las células CD34<sup>+</sup> del tratamiento HC es significativamente mayor que las del tratamiento HMC (Fig. 45D). Con estos ensayos se puede concluir que la adherencia de las células CD34<sup>+</sup> mediada por LFA-1 y VLA-5 no se modifica sustancialmente por la presencia de CSM en el cultivo de expansión con citoquinas. Sin embargo la adhesión mediada por VLA-4 a FBN está aumentada en las células expandidas solo con citoquinas (HC) comparada con la de las expandidas con citoquinas y CSM (HMC).



**Figura 45. Adherencia a ICAM-1 y FBN de células cultivadas en las condiciones HC y HMC.**

**A.** Expresión de ICAM-1 de la línea celular EAhy926. Marcación con el anticuerpo anti-CD54-PE en condiciones de estimulación (TNF $\alpha$ , 10 ng/ml, línea negra) y no estimulación (línea gris clara). El anticuerpo de isotipo se demarca con el histograma relleno gris oscuro (Panel arriba). Microfotografía de fluorescencia de las células EAhy926 estimuladas o no y marcadas con anticuerpo anti-CD54-FITC. **B.** Porcentajes de células adheridas a las células EAhy926 previamente estimuladas con TNF $\alpha$  (barra gris) o no (barra blanca) en las condiciones HC y HMC (n=6). **C.** Porcentajes de células adheridas en presencia o ausencia de medio condicionado (MC) a placas previamente cubiertas con FBN (25  $\mu$ g/ml) en las condiciones HC y HMC (n=6). **D.** Adherencia a FBN con el bloqueo de la unión de VLA-5/FBN con 10  $\mu$ g/ml del anticuerpo SAM-1 en las condiciones HC y HMC, en presencia de medio condicionado (MC) (n=6).

Con el propósito de evaluar la adherencia mediada por VLA-4 a VCAM-1 en HC y HMC se usó un cultivo de CSM confluentes (de cuarto pase), que tienen una expresión positiva y heterogénea de VCAM-1 (Fig. 46A) y una expresión positiva pero baja de ICAM-1 (Fig. 46B). Al analizar la adherencia a VCAM-1 en HC y HMC se encontró que las células expandidas solo con citoquinas se adhirieron más que las expandidas con citoquinas y CSM (Fig. 46C). También se encontró que así como la expresión de VCAM-1 fue heterogénea en las CSM usadas como sustrato adherente (Fig. 46A), la adherencia en HC se aumentó en ciertas regiones de los pozos con CSM (Fig. 46C). Esto confirma un aumento en la adherencia dependiente de VLA-4 en las células tratadas en la condición HC con respecto a la de HMC.



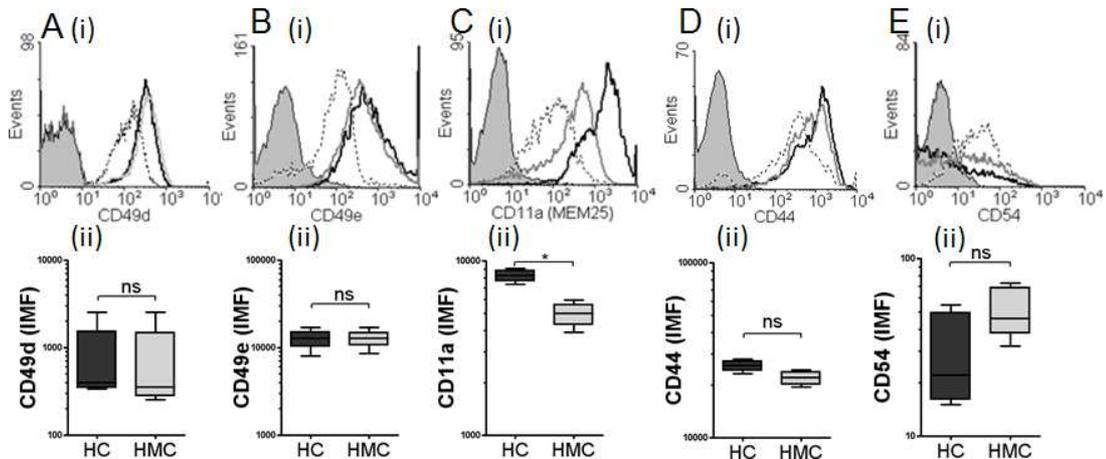
**Figura 46. Adherencia a VCAM-1 de células cultivadas en las condiciones HC y HMC.**

**A.** Expresión de VCAM-1 en CSM. Se muestra la marcación con el anticuerpo anti-CD106PE (línea negra) y control de isotipo (histograma gris). **B.** Expresión de ICAM-1 en CSM. Se muestra la marcación con el anticuerpo anti-CD54PE (línea negra) y control de isotipo (histograma gris). **C.** Número de células adherentes a CSM de las condiciones HC y HMC por campo. Cada punto es el resultado del conteo en el campo respectivo.

La disminución de la adherencia a FBN y a VCAM-1 de las células CD34<sup>+</sup> expandidas en co-cultivo con CSM, sugiere una modulación ya sea de la expresión de VLA-4 o de su afinidad por estos ligandos. Por esta razón se quiso explorar la expresión de diferentes moléculas de adhesión en células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas y su modulación por el co-cultivo con CSM.

#### **4.8 Expresión de moléculas de adhesión en células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas en presencia y ausencia de CSM.**

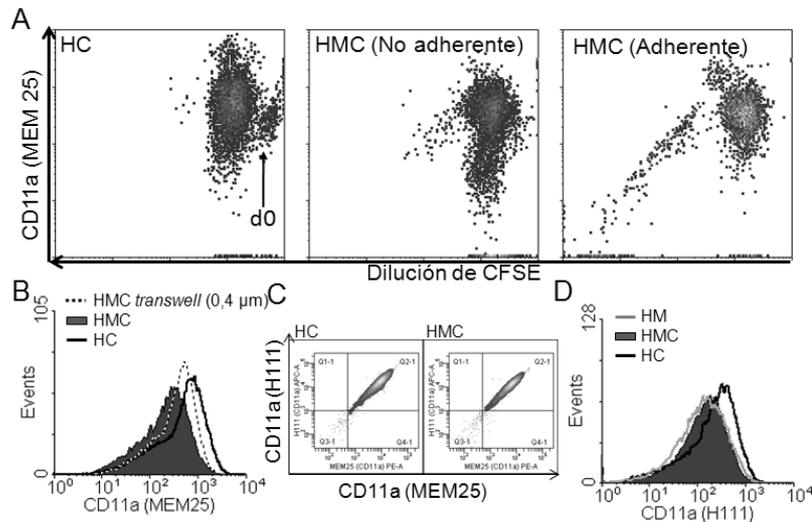
Los efectos observados en la migración y adhesión derivados de la expansión de células CD34<sup>+</sup> podrían explicarse por diferencias en la expresión de las moléculas contra-receptoras de los ligandos evaluados: VCAM-1, FBN e ICAM-1. Las moléculas heterodiméricas VLA-4 (CD49d/CD29), VLA-5 (CD49e/CD29) y LFA-1 (CD11a/CD18) son los principales ligandos de VCAM-1, FBN e ICAM-1 respectivamente (Tabla 2). Se evaluó el cambio en la expresión de estas moléculas en conjunto con la de la selectina CD44 y la de CD54, tomando en cuenta la expresión basal en células frescas CD34<sup>+</sup> aisladas de SCU. En la figura 47, se observan los histogramas de la expresión de CD49d (Fig. 47A (i)), CD49e (Fig. 47B (i)), CD11a (Fig. 47C (i)), CD44 (Fig. 47D (i)) y CD54 (Fig. 47E (i)) en células frescas CD34<sup>+</sup> (línea punteada) y expandidas con citoquinas con CSM (línea gris) y sin CSM (línea negra). Se observa que la expresión de CD49d, CD49e, CD11a y CD44 aumenta en las células expandidas con citoquinas, mientras que la expresión de CD54 disminuye con la expansión. Al analizar estadísticamente en las células CD34<sup>+</sup> (CFSE<sup>+</sup>) la expresión de las distintas moléculas de adhesión, en las condiciones de expansión con citoquinas únicamente (HC) o en co-cultivo con CSM (HMC) (Fig. 47 A-E (ii)), se encontró que CD11a fue la única molécula regulada negativa y significativamente por el co-cultivo con CSM (Fig. 47C (ii)). Se esperaba una diferencia en la expresión CD49d y no en CD11a ante las diferencias encontradas entre HC y HMC en la funcionalidad migratoria y adhesiva mediada por VCAM-1. Sin embargo, se exploró más a fondo la expresión diferencial de CD11a entre HC y HMC, determinando si esta diferencia dependía de los factores solubles secretados por las CSM, la división celular o el contacto intercelular. Se determinó la expresión de CD11a vs CFSE en las células expandidas solo con citoquinas (HC) y en las fracciones adherente y no adherente de células CD34<sup>+</sup> co-cultivadas con CSM y expandidas con citoquinas (HMC).



**Figura 47. Expresión de moléculas de adhesión en células CD34<sup>+</sup> frescas y cultivadas en las condiciones HC y HMC.**

**A.** CD49d. **B.** CD49e. **C.** CD11a. **D.** CD44. **E.** CD54. (i) Se muestran los histogramas sobrelapados de la expresión de cada molécula en células frescas (línea punteada), HC (línea negra) y HMC (línea gris). (ii) Comparación de la expresión (IMF) de las moléculas de adhesión en HC y HMC.

En la figura 48A se muestran los diagramas de citometría de flujo de células marcadas con CFSE y CD11a, en los que la población de células no divididas (d0) de HC presenta una expresión menor de CD11a. Este resultado indica que el aumento en la expresión de CD11a es propio de las células que se dividen. Sin embargo, las células CD34<sup>+</sup> co-cultivadas con CSM y citoquinas mantienen baja la expresión de CD11a (Fig. 48A) a pesar de las divisiones celulares. Este patrón de expresión de CD11a es comparable entre la fracción adherente y no adherente del co-cultivo (HMC), lo que sugiere que esta regulación no es únicamente en las células adheridas a las CSM (Fig. 48A). Para determinar el papel de los factores solubles secretados por las CSM en la modulación de CD11a de células CD34<sup>+</sup>, se estableció un sistema de co-cultivo con CSM y estimulación de citoquinas en condiciones de no-contacto usando insertos *transwell* con un poro de 0,4  $\mu\text{m}$  (HMC *transwell* 0,4  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 48B). En estos ensayos se observa que la expresión de CD11a se puede regular sin el contacto directo entre CSM y células CD34<sup>+</sup> ya que la expresión de esta molécula es intermedia entre HC y HMC.



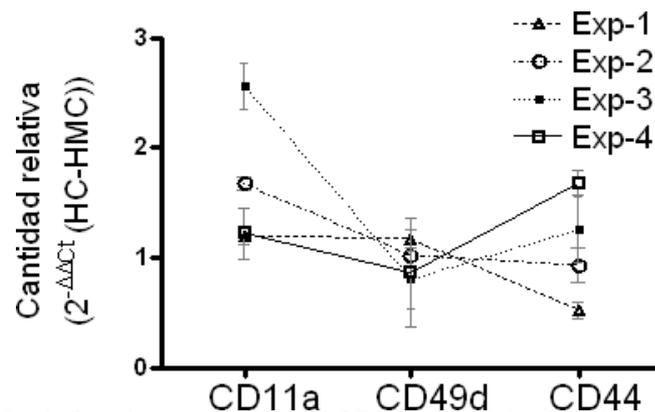
**Figura 48. Factores regulatorios de la expresión de CD11a en células CD34<sup>+</sup> en expansión.**

**A.** Diagramas de citometría de flujo de la expresión de CD11a y dilución de CFSE de HC y HMC. Se separaron las células CD34<sup>+</sup> adherentes de las no adherentes en HMC. **B.** Expresión de CD11a en HC (línea negra) y HMC (histograma relleno gris). Se muestra la expresión de CD11a en células CD34<sup>+</sup> sembradas en condición de no-contacto (HMC *transwell* (0,4 μm)) (línea punteada). **C.** Doble marcación de CD11a con los clones MEM25 y H111 en HC y HMC. **D.** Expresión de CD11a en HC (línea negra) y HMC (histograma relleno gris). Se muestra la expresión de CD11a de células CD34<sup>+</sup> co-cultivadas solo con CSM (línea gris). Marcación con el anticuerpo H111.

Esto sugiere que los factores solubles presentes en el medio condicionado por las CSM si desempeñan un papel en la regulación negativa de CD11a. Al evaluar la expresión de CD11a con otro anticuerpo monoclonal distinto (clon H111) se observa que la detección se correlacionó directamente con la detección con el clon usado hasta ahora (MEM25) (Fig. 48C). Las diferencias observadas anteriormente (en la expresión de CD11a) entre HC y HMC se repiten con el clon H111 (Fig. 48D). Con el uso de este clon también se observa que la expresión de CD11a en las células CD34<sup>+</sup> co-cultivadas con CSM sin citoquinas (HM) es igual a la de HMC, indicando que son las CSM las responsables de este efecto.

La importancia del uso de un clon diferente para la detección de una integrina radica en que cada clon puede ir dirigido contra un epítotope distinto, que se exponga u oculte según la activación de esa integrina (Ma y cols, 2002; Chigaev y cols, 2003). En LFA-1 (compuesta por CD11a y CD18) se han descrito diferentes cambios conformacionales relacionados con la inactivación o estadios de activación de la molécula que se detectan con diferentes clones de anticuerpos

(Wang y cols, 2009). De esta manera algunos anticuerpos detectan la inactivación o activación de esta molécula (Ma y cols, 2002; Wang y cols, 2009). El clon H111 se reporta como un clon dirigido contra la forma inactiva del LFA-1 humano (también llamada conformación cerrada) (Ma y cols, 2002). Esto abrió la posibilidad de que una detección aumentada de CD11a en la superficie de las células no sea secundaria a un aumento de la transcripción de este gen sino a una inactivación de moléculas en la superficie. Por esta razón se hizo una cuantificación relativa del ARNm de las moléculas CD49d, CD44 y CD11a usando sondas *Taqman*. Se calculó el cambio relativo HC/HMC en la expresión de dichos genes. Teniendo en cuenta los datos de citometría, la relación HC/HMC de expresión de las proteínas CD44 y CD49d es alrededor de 1, mientras que la de CD11a es de alrededor de 2. El análisis de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  de la expresión del gen CD11a en HC y HMC comparativamente con los de CD49d y CD44 (Fig. 49) no evidenció cambios consistentes en la expresión de CD11a mostrados por la citometría de flujo. Mientras que los experimentos 1 y 4 muestran un efecto relacionado con la inactivación de moléculas en la superficie los experimentos 2 y 3 parecerían revelar un cambio en la transcripción del gen (Fig. 49). Por esta razón se realizaron otras pruebas para estudiar la existencia de un cambio conformacional de LFA-1.

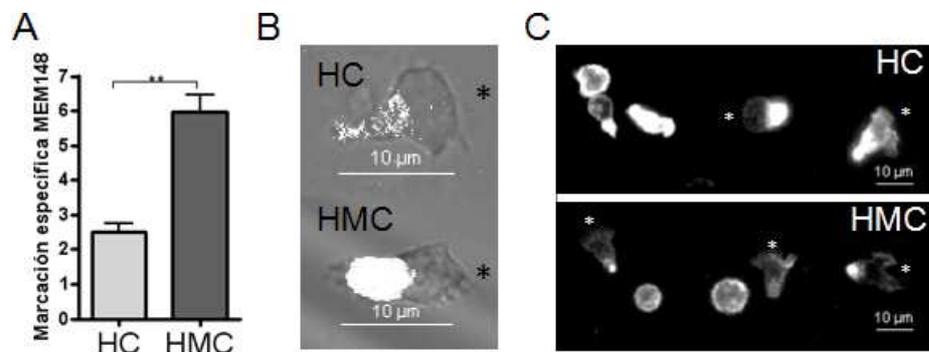


**Figura 49. Cantidad relativa de transcritos de CD11a, CD49d y CD44 en HC y HMC.**

Se aisló ARN total de las células CD34<sup>+</sup> cultivadas en las condiciones HC y HMC de cuatro experimentos diferentes. A partir del cADN sintetizado de cada muestra se realizan amplificaciones en tiempo real de los genes CD11a, CD49d, CD44 y TBP (gen de normalización). Se utilizaron primers y sondas *Taqman*<sup>®</sup> (*Applied Biosystems*). Se calculó el ciclo umbral (Ct) de cada uno de los genes, verificando la eficiencia de la reacción. Con el análisis de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  se calcula la expresión de cada gen en la condición HMC con relación a la expresión del mismo gen en HC.

#### 4.9 Estados de activación de LFA-1 de células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas en presencia y ausencia de CSM

Para determinar cambios en la activación de LFA-1 en los tratamientos HC y HMC se usó el clon MEM148 que reconoce la molécula activa de LFA-1 (Drbal y cols, 2001; Beals y cols, 2001). Debido a que se marcó indirectamente usando un anticuerpo secundario acoplado a FITC, el análisis de la marcación específica de MEM148 se realizó teniendo en cuenta la intensidad media de fluorescencia (IMF) del marcaje inespecífico. Se calculó la relación de la IMF de marcaje con ambos anticuerpos (MEM148 y secundario) sobre la IMF de marcación del anticuerpo secundario comparando HC y HMC. En la figura 50A se observa que la marcación específica con el MEM148 es dos veces mayor en HMC que en HC. Al analizar las imágenes de microscopía confocal se observa el mismo incremento relativo de la marcación con MEM148 en HMC (Fig. 50B). Es importante anotar que la distribución celular de la molécula LFA-1 activa demarca lo que ha sido llamado la zona focal en la migración de células T (Smith y cols, 2005). Esta zona se encuentra entre el urópodo y el lamelipodio de las células polarizadas.



**Figura 50. Detección de las conformaciones abierta y cerrada de LFA-1 en HC y HMC.**

Marcación de la conformación abierta de LFA-1 con el anticuerpo monoclonal MEM148 (A y B). Marcación de la conformación cerrada de LFA-1 con el anticuerpo monoclonal MEM25 (C). A. Se calculó la relación entre la IMF de la marcación específica con el anticuerpo monoclonal MEM148 y el secundario y la IMF de la marcación inespecífica con el anticuerpo secundario. B. Imagen de microscopía confocal de células HC y HMC marcadas indirectamente con el anticuerpo MEM148. C. Imágenes de Microscopía de células HC y HMC detectadas con el clon MEM25. Los asteriscos en B y C (\*) indican el frente de migración (*leading edge*).

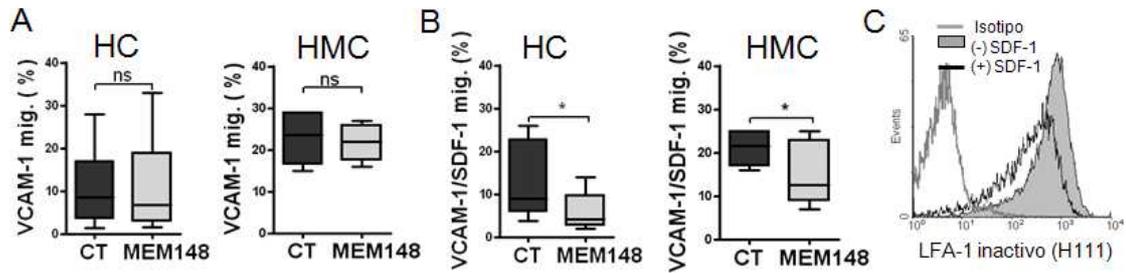
De la misma manera, se comparó por microscopía la intensidad y distribución celular de la molécula LFA-1 cerrada en HC y HMC, usando el anticuerpo MEM25

(Fig. 50C). Se encontró una intensa marcación en las células CD34<sup>+</sup> cultivadas con solo citoquinas (HC), que se distribuye desde el urópodo hasta la zona focal llegando al frente de migración de la célula (Fig. 50C). En cambio en las células polarizadas CD34<sup>+</sup> cultivadas con CSM y citoquinas (HMC), la marcación de la molécula cerrada de LFA-1 se limitó al urópodo (sin alcanzar la zona focal). Estos resultados demuestran que el co-cultivo con CSM impide la inactivación de las moléculas LFA-1 de la zona focal de células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas.

#### **4.10 Migración mediada por VCAM-1 y actividad de LFA-1 en células CD34<sup>+</sup> expandidas en presencia y ausencia de CSM**

En otros tipos celulares de origen hematopoyético se ha encontrado que la funcionalidad de las moléculas VLA-4 y LFA-1 no es independiente (Porter y Hogg, 1997; Chuang y cols, 2004). Por ejemplo, en monocitos la interacción de LFA-1 con su ligando ICAM-1 (que activa a LFA-1), induce la inactivación de la molécula VLA-4 atenuando la interacción con VCAM-1 (Chuang y cols, 2004). Por cuanto nuestros resultados mostraron un incremento de la adhesión mediada por VLA-4, correlacionada con la inactividad de la molécula LFA-1, se pensó en una posible regulación cruzada entre estas dos moléculas. Se evaluó la migración mediada por VCAM-1 en presencia y ausencia de SDF-1, con el bloqueo de la molécula activada de LFA-1 (con el anticuerpo MEM148). En la figura 51A se observa que la migración mediada por VCAM-1 en las células HC y HMC, no se afecta por la presencia del anticuerpo MEM148. Sin embargo, en presencia de SDF-1, la migración mediada por VCAM-1 se disminuye con el bloqueo de la molécula activa de LFA-1, en HC y en HMC (Fig. 51B). El efecto exclusivo del anticuerpo MEM148 en la condición de estimulación con SDF-1, se presume que se debe a la mayor disponibilidad del epítipo activado reconocido por el MEM148. En concordancia, en la figura 51C se puede observar como el epítipo de inactivación (clon H111-APC) se oculta en células CD34<sup>+</sup> expandidas disminuyendo su IMF después de una hora estimulación con SDF-1. Estos resultados indican que la inactivación de LFA-1 puede afectar indirectamente la migración en CSH mediada por VCAM-1 y especialmente la inducida por SDF-1.

Propiedades de adhesión, migración y motilidad de células stem hematopoyéticas expandidas con citoquinas de acción temprana en co-cultivo con células stem mesenquimales

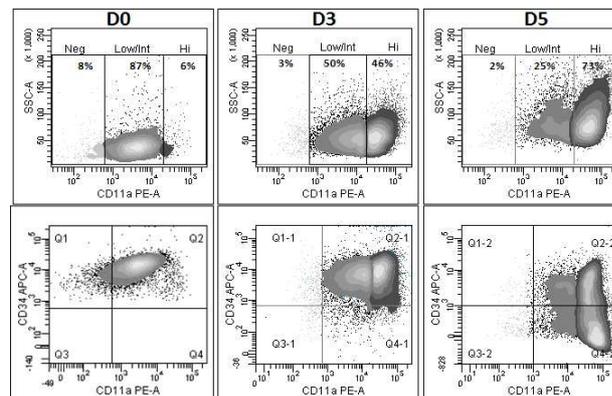


**Figura 51. Efectos del anticuerpo MEM148 en la migración mediada por VCAM-1 en HC y HMC.**

Se muestran los resultados de los ensayos de migración *in vitro* con *transwell* recubiertos con VCAM-1 (10  $\mu$ g/ml). Se muestran los porcentajes de células que migraron después de 4 h de incubación en ausencia (CT) o presencia de 10  $\mu$ g/ml de MEM148 (MEM148). **A.** En ausencia de SDF-1. **B.** En presencia de SDF-1 (100 ng/ml) (n=6). \* p < 0,05. **C.** LFA-1 inactivo en células expandidas con citoquinas en ausencia (histograma relleno) y presencia de SDF-1 (línea negra).

#### 4.11 Expresión de LFA-1, diferenciación y migración

Se ha demostrado hasta ahora que las células CD34<sup>+</sup> al tercer día de cultivo con citoquinas expresan más LFA-1 como una molécula cerrada que las células frescas o las co-cultivadas con CSM. Se exploró si algún cambio adicional en la expresión de esta molécula ocurría tras cinco días de cultivo en los que anteriormente se había determinado una intensa pérdida del marcador de selección CD34<sup>+</sup> (Fig. 52).

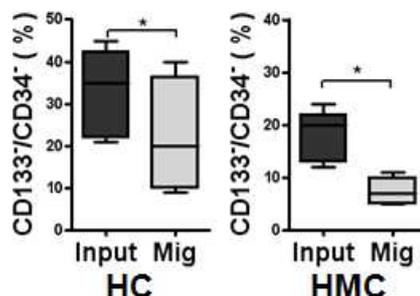


**Figura 52. Expresión de la molécula de LFA-1 (inactiva) y de CD34 en células CD34<sup>+</sup> frescas y cultivadas con citoquinas por tres y cinco días.**

Las células CD34<sup>+</sup> frescas (D0) y después del cultivo con citoquinas por tres (D3) y cinco (D5) días se marcaron con el anticuerpo MEM25 (CD11a-PE, LFA-1 inactiva). Las diferentes regiones de intensidad de marcación de LFA-1 (negativa, baja/intermedia y alta) se muestran en los paneles superiores. La expresión de CD34 (marcación con el anticuerpo antiCD34-APC) en las células marcadas con el anticuerpo MEM25 se muestra en los paneles inferiores.

Tras definir tres regiones de expresión de LFA-1 en su conformación cerrada (negativa, baja/intermedia y alta) se encontró que la proporción de células con alta expresión es del 6% el día 0 de cultivo, aumentando a 46% al tercer día y a 73% al día quinto de cultivo (Fig. 52). Al analizar esta expresión en relación con la del marcador CD34 se encuentra una relación inversa. Al quinto día se observa que las células con menor expresión de CD34 son las que expresan más intensamente la molécula cerrada LFA-1 (Fig. 52, paneles inferiores).

Dado la relación inversa entre la expresión de LFA-1 con la migración mediada por VCAM-1 y con la expresión de CD34<sup>+</sup>, se evaluó si la migración mediada por VCAM-1 está relacionada con el estadio de diferenciación de las células. Para este fin marcaron las células HC y HMC con los anticuerpos anti-CD34 y anti-CD133 antes de la migración y después de ella. Se calculó el porcentaje de células CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup> (más diferenciadas) en las células que migraron (Mig.) a través de los insertos recubiertos de VCAM-1 y en las células sembradas inicialmente en los insertos (*Input*). En la figura 53 se muestra que las células que migran (Mig.) a través de VCAM-1 son menos diferenciadas que el total de células sembradas (*Input*) (Fig. 53). Se puede observar también que la variabilidad de la expresión de CD34 y CD133 en HC es mayor que la de HMC. Esto indica que el fenotipo primitivo de CSH, se selecciona a través de la migración mediada por VCAM-1, selección que favorece más a las HMC.

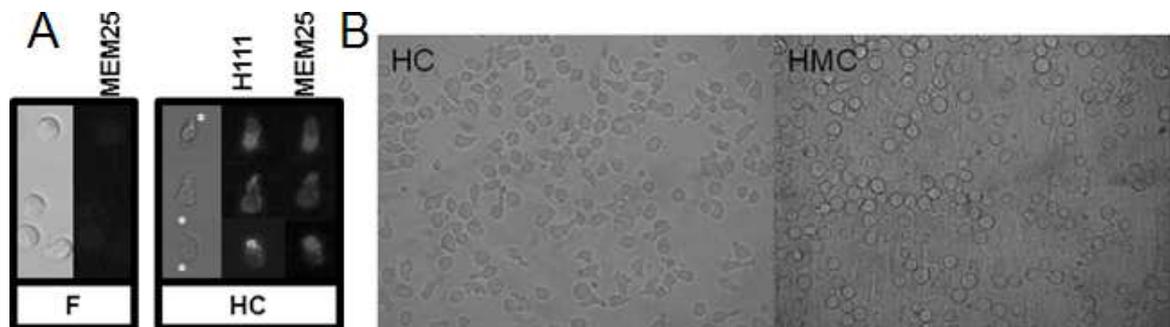


**Figura 53. Migración mediada por VCAM-1 de células con inmunofenotipo CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup> que han sido cultivadas en las condiciones HC y HMC.**

Se comparan los porcentajes de células doblemente negativas (CD133<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>) sembradas (*Input*) con las células doblemente negativas que migraron (*Mig*), en ensayos de migración mediada por VCAM-1. Las células cultivadas en las condiciones HC y HMC se marcaron con los anticuerpos anti-CD34-APC y anti-CD133-PE. Asimismo, se marcaron las células cosechadas en la cámara inferior de los *transwell* cosechadas de los ensayos de migración mediada por VCAM-1 (n=4).

#### 4.12 Motilidad de células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas en presencia y ausencia de CSM.

Giebel y cols reportaron que la expansión con citoquinas induce una elongación de las células CD34<sup>+</sup> dependiente de Akt y una polarización de los marcadores CD133, CD43, CD44 y CD54, similar a lo que encontramos con la LFA-1 inactiva (Figs. 50C, 54A) (Giebel y cols, 2004). En nuestros ensayos durante la expansión de células CD34<sup>+</sup> con citoquinas, también observamos que las células CD34<sup>+</sup> cambiaron de una morfología redondeada (F) a una elongada (HC) (Fig. 54A).



**Figura 54. Morfología de las células frescas CD34<sup>+</sup> y en las condiciones HC y HMC.**

**A.** Se observa la morfología redondeada de las células frescas (F) y la morfología elongada de las expandidas (HC). Se observa que la marcación de LFA-1 en su conformación cerrada con los clones H111 y MEM25 es equivalente. El asterisco representa el frente de migración (*leading edge*). **B.** Microfotografías del cultivo de células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas en ausencia (HC) o presencia de CSM (HMC).

De manera interesante se observó que la presencia de CSM en el cultivo preservó la morfología redondeada de las células (Fig. 54B). El análisis de distribución de frecuencias de células elongadas y redondeadas en HC y HMC (1000 células /tratamiento) demostró que las células elongadas se encuentran con una frecuencia 5 veces mayor en las células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas sin CSM (OR=5,16) (Tabla 9).

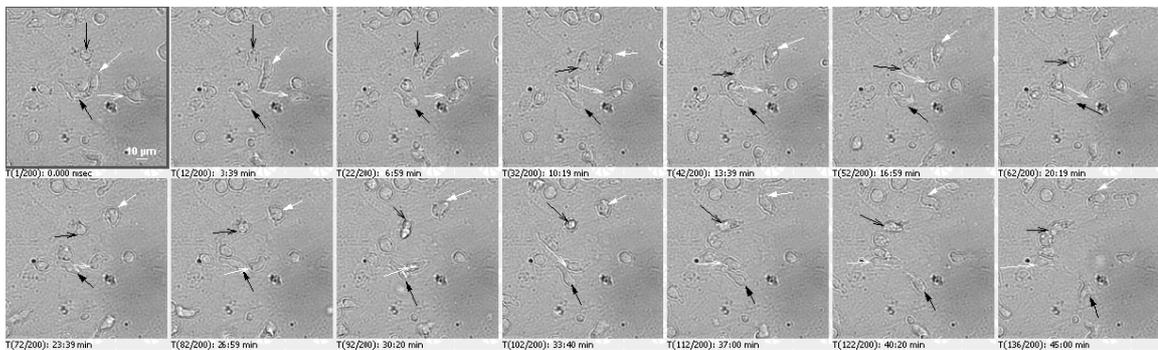
**Tabla 9. Distribución de frecuencias de células elongadas y redondeadas en HC y HMC**

	Elongadas	Redondeadas	Total
HC	640	374	1014
HMC	273	824	1097
Total	913	1198	2111

Chi-square p<0.0001 RR=2,536 OR=5,165

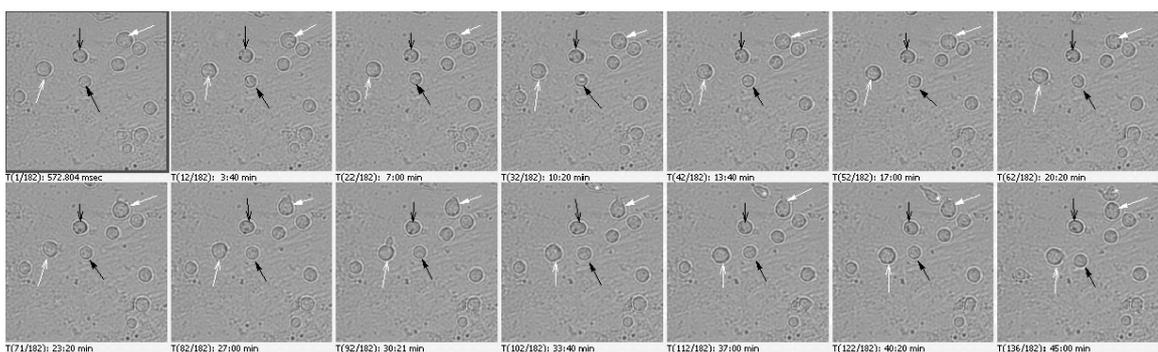
*Propiedades de adhesión, migración y motilidad de células stem hematopoyéticas expandidas con citoquinas de acción temprana en co-cultivo con células stem mesenquimales*

La polarización es una característica propia de las células con potencial de movilidad (Sánchez-Madrid y del Pozo, 1999) por lo que se determinó la motilidad en tiempo real de las células HC y HMC. Se realizaron video-microscopías de las células cosechadas de las condiciones HC y HMC, sembrándolas en medio condicionado sobre CSM confluentes. En la figura 55 y video 1 se muestra como todas las células expandidas con citoquinas están activas y móviles. Algunas de ellas se desplazan y otras solo se quedan adheridas por el urópodo haciendo movimientos exploratorios (flecha negra abierta). En la figura 56 y video 2 se observa que la mayoría de las células que se co-cultivaron con CSM y con citoquinas siguen redondeadas y no son móviles.



**Figura 55. Video-microscopía de HC sembradas en medio condicionado sobre CSM.**

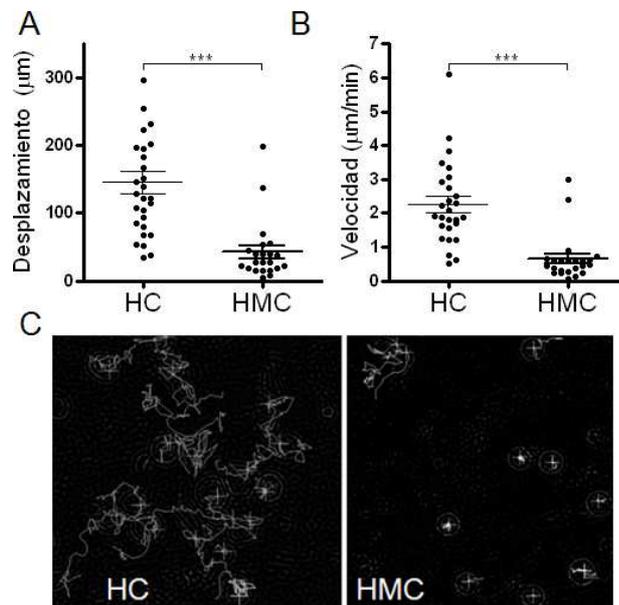
Se seleccionaron los mismos tiempos de captura para el análisis. Tiempo total de video: 45 min. Las células móviles con desplazamientos cortos y largos se señalan con flechas negras y blancas, respectivamente.



**Figura 56. Video-microscopía de HMC sembradas en medio condicionado sobre CSM.**

Tiempo total de video: 45 min. Las células que presentan pequeños desplazamientos se señalan con flechas blancas. Las células inmóviles se indican con flechas negras. Se indica una célula móvil que aparece en los últimos cuatro recuadros con un asterisco blanco. En cada recuadro una célula se identifica con un tipo particular de flecha.

Se cuantificó la velocidad y desplazamiento de cada célula en los videos obtenidos; las células cultivadas con citoquinas (HC) tienen un desplazamiento y velocidad 3 veces mayor que las que han sido co-cultivadas con CSM (Fig. 57A y B). En la figura 57C se muestran las trayectorias celulares de los videos analizados, mostrando mayores trayectorias en HC que en HMC. Estos resultados indican que en las HMC se regula negativamente el comportamiento altamente móvil de las HC inducido por las citoquinas.



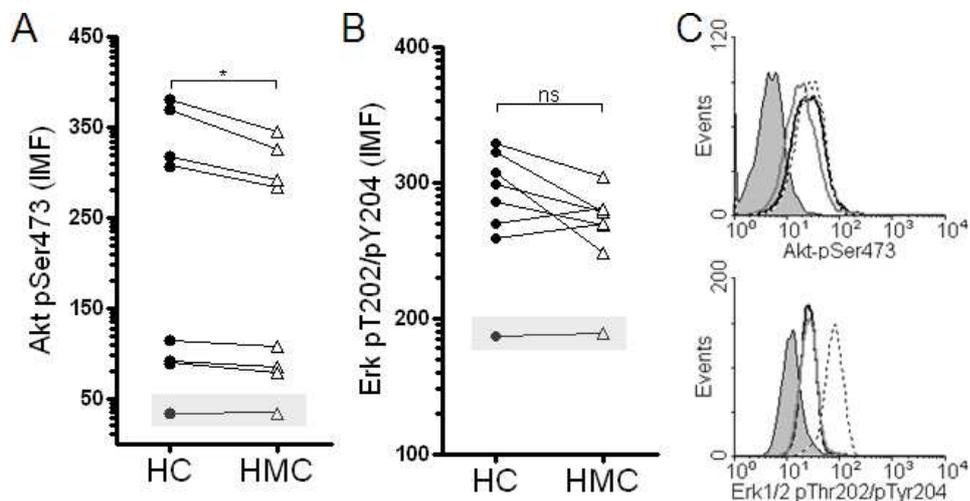
**Figura 57. Desplazamientos, velocidades y trayectorias de HC y HMC.**

Los videos de las células tratadas en las condiciones HC y HMC sembradas en medio condicionado sobre CSM, se analizaron con la herramienta de seguimiento manual del programa *NIS-Elements Advanced Research software*. El desplazamiento de cada célula se siguió cada 20 seg durante 45 min. Se muestran los cálculos de desplazamiento (A) y velocidad (B) de cada célula tratada HC y HMC de dos de los videos analizados. Cada punto representa el dato de una célula. C. Trayectorias observadas en uno de los campos de un video representativo grabado de células HC y HMC.

#### **4.13 Vías de señalización intracelular involucradas en la expansión de células CD34<sup>+</sup> con citoquinas y en co-cultivo con CSM.**

La inducción de polarización en células CD34<sup>+</sup> por citoquinas de acción temprana depende de la activación de la vía PI3K/Akt (Giebel y cols, 2004). Se exploró comparativamente (en HC y HMC) la fosforilación específica de Akt (serina 473) (Buitenhuis y cols, 2010) y de Erk en los residuos treonina 202 y tirosina 204

dados los efectos del co-cultivo en la polarización celular. Dadas las cantidades de células cosechadas por tratamiento no se contemplaron ensayos de *Western blot* sino de *phosphoflow*. En la figura 58, se observa que las fosforilaciones de Akt (A) y Erk (B) están aumentadas con respecto a su control (Ctrl); pero la serina 473 de Akt en las células CD34<sup>+</sup> tratadas en la condición HMC está significativamente menos fosforilada comparada con las células HC (Fig. 58A). El efecto de las CSM en la fosforilación de Erk no es claro (Fig. 58B). Dado el papel de la fosforilación de Akt en células REH (Sarkar y cols, 2002), la fosforilación de Akt también se evaluó en células REH co-cultivadas o no con CSM.



**Figura 58. Fosforilaciones en Ser-473 Akt y Thr-202/Tyr204 Erk de células en las condiciones HC y HMC.**

**A.** IMF de la p-Ser473 de Akt en HC y HMC (Ctrl, en recuadro gris) n=7. **B.** IMF de la p-Thr-202/Tyr204 de Erk en HC y HMC. Se muestra la IMF de células no marcadas con anticuerpo (Ctrl, en recuadro gris) n=7. **C.** Histogramas de fosforilación de Akt (arriba) y Erk (abajo) de células REH en cultivo sin CSM (línea negra), con CSM (línea gris), estimuladas con PMA (10 ng/ml) (línea punteada).

Consistentemente, el efecto visto en células CD34<sup>+</sup> se repitió en células REH (línea de leucemia linfoblástica aguda) co-cultivadas con CSM, pues mostraron una menor fosforilación de la serina 473 de Akt (Fig. 58C, panel de arriba, línea gris) que las no co-cultivadas (Fig. 58C, arriba, línea negra). La fosforilación de Erk en células REH no parece estar afectada por el co-cultivo con CSM (Fig. 58 C, abajo, línea gris), pero si por la estimulación con PMA (Fig. 58, abajo, línea punteada), que induce la fosforilación de Erk mas no la de Akt. Teniendo en

cuenta estos ensayos, se postula que la presencia de CSM modula la vía de fosforilación de Akt de las CSH, participando a través de esta en la regulación de la motilidad de las CSH.

En este trabajo se observó que el co-cultivo de células CD34<sup>+</sup> con CSM en un cultivo de expansión modula los efectos de las citoquinas sobre las propiedades migratorias, adhesivas y de motilidad de las CSH. El co-cultivo con CSM permite preservar un fenotipo de baja adhesión mediada por VLA-4 en las células CD34<sup>+</sup> co-cultivadas, lo que les permite a las CSH una migración mediada por VCAM-1. En la regulación positiva de la migración de CSH mediada por VCAM-1 participa la señal de LFA-1, la cual se mantiene más activa en células CD34<sup>+</sup> co-cultivadas con CSM. Contrastando con una migración afectada en células expandidas con citoquinas mediada por el estímulo combinado de VCAM-1 y agentes quimiotácticos; el co-cultivo de CSH con CSM preserva la migración mediada por VCAM-1 en presencia de estímulos quimiotácticos. La polarización de las células expandidas con citoquinas se relaciona con una actividad quimiotáctica basal aumentada y una mayor fosforilación de Akt. Por el contrario las CSH expandidas con citoquinas en presencia de CSM muestran menor polarización, menor actividad quimiotáctica basal y una menor fosforilación de Akt. Este último efecto se repite en células leucémicas en donde la señal de Akt esta activada y el co-cultivo con CSM puede regular negativamente esta señal.

En conclusión el co-cultivo de CSM con CSH en presencia de citoquinas no solo permite la expansión de las CSH de forma más eficiente sino que mantiene un fenotipo migratorio que se acerca más a lo que se observa en CSH recién aisladas. Estos hallazgos permiten postular que el beneficio del uso en trasplantes de CSH expandidas en condiciones de co-cultivo con CSM se debe en parte a la preservación de ciertas capacidades migratorias, adhesivas y de motilidad que les permite a las CSH encontrar nichos más apropiados dentro de la MO.

## 5. Discusión

Como un caso excepcional en investigación, los estudios sobre CSH han concretado paralelamente su utilidad clínica y sus propiedades funcionales básicas. Las CSH son una posibilidad terapéutica desde hace casi cincuenta años (Bryder y cols, 2006). Pero a pesar de ser el paradigma de la terapia regenerativa, el conocimiento sobre ciertos aspectos de la fisiología de las CSH es incompleto. Una de las razones que explican estos vacíos es la dificultad en el estudio de estas células debido a su baja frecuencia relativa en sus fuentes originales. Además, estrategias de estudio como el establecimiento de líneas celulares no son extrapolables a las CSH. Por lo tanto para el estudio de las CSH es necesario aislar la población primaria de su fuente original.

Asimismo, la funcionalidad de las CSH es determinada por su microambiente original involucrando en su estudio a otros tipos celulares, como las células *stem* mesenquimales (CSM). Las CSM hacen parte del microambiente de las CSH y gran cantidad de evidencia *in vivo* y *ex vivo* demuestra su papel en la modulación de la hematopoyesis embrionaria, fetal y adulta (para revisión Wagner y cols, 2008). En la búsqueda de fórmulas para la expansión *ex vivo* de las CSH, la combinación CSM y citoquinas solubles han mostrado un camino promisorio (Wagner y cols, 2008; Walenda y cols, 2010). Saltando rápidamente a la terapéutica clínica, las CSM se han utilizado como soporte en la expansión de CSH con resultados positivos (Kelly y cols, 2009; Robinson y cols, 2011). La mayoría de estudios de los efectos de las CSM sobre las CSH se han enfocado en cómo las CSM permiten o no obtener un fenotipo hematopoyético primitivo que se va perdiendo en las CSH luego de la expansión con citoquinas (Jang y cols, 2006; Fei y cols, 2007, Walenda y cols, 2011). Sin embargo, las citoquinas no solo afectan el fenotipo primitivo de las CSH. Como se ha visto en este trabajo los efectos de las citoquinas también se ven en las propiedades de adhesión, migración y de motilidad de las CSH. Las CSM crean un microambiente que permite modular muchas de las funciones de las CSH, pero su modulación en la

adhesión, migración y motilidad de CSH está todavía bastante inexplorada. En este estudio se contemplan los efectos del co-cultivo con CSM la expansión de CSH en presencia o ausencia de CSM con un enfoque en los cambios que se presentan en las propiedades migratorias, adhesivas y de motilidad celular pues estas propiedades también determinan el éxito de la terapia celular (Chavakis y cols, 2008).

Se discutirán a continuación las fases iniciales de este estudio en las que se optimizan las condiciones de aislamiento de CSH, CSM y su expansión, para luego discutir los efectos de las CSM en las propiedades migratorias, adhesivas y de motilidad de las CSH expandidas con citoquinas.

### **5.1 Consideraciones del aislamiento de CSH**

Se utilizaron muestras de SCU como fuente de CSH, por sus mencionadas ventajas (Tabla 3). Además la temática de la expansión de CSH es más aplicable y significativa en el caso de unidades de SCU pues, como ya se anotó, el número total de CSH es menor en SCU que en MO. El uso de tubos heparinizados de 10 ml de capacidad, permitió una recolección controlada del volumen SCU con la cantidad apropiada de anticoagulante. En estudios anteriores se ha observado que la dilución excesiva de la muestra de SCU, como sucede al utilizar la bolsa CPDA, disminuye los parámetros hematológicos de WBC y RBC (Freise y cols, 2009). Nuestros resultados iniciales en los que colectamos las muestras de SCU en bolsa CPDA mostraron pérdidas de viabilidad en las muestras más diluidas. De estos parámetros depende el número de CSH aisladas, por lo que al optimizar este paso también se garantiza la obtención de un mayor número de CSH por unidad de SCU.

El aislamiento inmunomagnético con anticuerpos anti-CD34 es una de las técnicas que garantiza reproducibilidad y esterilidad para aislar CSH humanas (de Wynter y cols, 1999). Sin embargo, en ocasiones los resultados no son los esperados, con el consumo ineficiente de los costosos recursos que implica la purificación. Las bajas frecuencias de células CD34<sup>+</sup> (0,1%-0,8%) en las unidades

de SCU, así como los volúmenes disminuidos de las muestras limitan la eficiencia del aislamiento inmunomagnético (Cancelas y cols, 1996). En nuestro medio, la práctica de pinzamiento diferido del CU, protocolaria en el Instituto Materno Infantil de Bogotá resulta en la recolección de volúmenes reducidos de SCU (Andersson y cols, 2011), lo que implicó un abordaje técnico más estricto de la purificación de estas células.

En cuanto a la purificación inmunomagnética se comprobó la necesidad del uso de dos columnas magnéticas y el aumento de los volúmenes de elución de las mismas para obtener poblaciones puras de células CD34<sup>+</sup>. Esto concuerda con lo reportado sobre la necesidad del uso de dos columnas para la purificación de células CD34<sup>+</sup> de SCU (Kekarainen y cols, 2006).

El tamizaje de las muestras de SCU ha sido propuesto por otros autores para el almacenamiento efectivo de unidades de SCU en bancos especializados para su posterior uso clínico (Urcioli y cols, 2010). Se propuso en este trabajo un tamizaje de muestras de SCU antes de la purificación inmunomagnética que garantice que el procedimiento de aislamiento permitirá la obtención de una cantidad suficiente de células CD34<sup>+</sup> para la experimentación a pequeña escala. En nuestro caso se tomaron como números base  $5 \times 10^5$  células para los análisis necesarios de células CD34<sup>+</sup> expandidas y  $1 \times 10^6$  células CD34<sup>+</sup> para los análisis en células frescas. Utilizando los datos de 59 muestras se realizó una regresión múltiple de los datos obtenidos de cada muestra antes y después de la purificación inmunomagnética. Se estableció que tres de las variables analizadas (volumen de la muestra, WBC y RBC) se correlacionan con el número de células CD34<sup>+</sup> obtenidas al final del procedimiento (Tabla 6). Urcioli y cols, reportan también que el volumen y el total de leucocitos se correlacionan con los conteos de células CD34<sup>+</sup> en muestras no purificadas (Urcioli y cols, 2010). Definiendo previamente que los números de células CD34<sup>+</sup> requeridos para los montajes experimentales eran de  $5 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  CSH se analizaron las curvas ROC construidas para estas tres variables.

Se escogieron los volúmenes de SCU de 27 ml y 35 ml ya que estos valores

permiten captar respectivamente, las muestras de las que se obtendrán  $5 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  células CD34<sup>+</sup>, con una sensibilidad del 75%. Estos volúmenes son comparativamente bajos con lo recolectado en bancos de SCU que descartan las muestras con un volumen menor a 60 ml (sin incluir el volumen de anticoagulante y preservantes) (Ballen y cols, 2001; Lechi y cols, 2009). Con los bajos volúmenes de SCU obtenidos debido a la práctica de pinzamiento tardío del CU, más del 80% de las muestras de SCU se hubiesen descartado en este estudio al usar el umbral de recolección de 60 ml. De esta forma se pudo racionalizar la recolección con respecto a los parámetros de volumen y la necesidad de células CD34<sup>+</sup> necesarias para cada experimento.

Tomando en cuenta los volúmenes seleccionados se siguió con el procedimiento de aislamiento de la FCBD y el análisis de los parámetros hematológicos de esta fracción, para aumentar la especificidad de la selección de las muestras. Con el análisis del número de leucocitos (WBC) de la FCBD, se sugiere realizar el aislamiento inmunomagnético de las muestras que tengan  $194 \times 10^6$  o  $294 \times 10^6$  o más células (WBC) dependiendo de una necesidad experimental de  $5 \times 10^5$  o  $1 \times 10^6$  células CD34<sup>+</sup>, respectivamente. Estos valores aseguran con un 90% de especificidad la selección, descartando con alto valor predictivo (5 y 3, respectivamente) las muestras que no poseen los números de células CD34<sup>+</sup> deseados. Adicionalmente, con estos resultados se previene sobre la depleción excesiva de eritrocitos en las FCBD y el uso de muestras con porcentajes bajos de linfocitos, pues resultan en la disminución en los números de células CD34<sup>+</sup> y en la pureza de células CD34<sup>+</sup>, respectivamente. Esta selección escalonada de las muestras para la obtención de células CD34<sup>+</sup> aisladas de SCU, tomando en cuenta primero el volumen de muestra y después los parámetros hematológicos de la FCBD es novedoso y especialmente útil en investigación básica. De esta manera se optimiza el tiempo de trabajo y el uso de recursos costosos como son los insumos para el aislamiento inmunomagnético de células CD34<sup>+</sup>.

Con estos resultados se estableció un procedimiento de selección de muestras que permite una purificación inmunomagnética costo-efectiva a pequeña escala

que no había sido publicado hasta ahora (Perdomo-Arciniegas y Vernot, 2012, Artículo N° 1).

## **5.2 Consideraciones para el aislamiento y expansión de CSM**

Aunque la población de CSM es mucho menos frecuente en la MO que la de células CD34<sup>+</sup> en SCU (Castro-Malaspina y cols, 1980), su aislamiento no representó los retos técnicos mencionados anteriormente. El carácter adherente de las CSM permite su aislamiento con un método sencillo, de bajo costo y de alta eficiencia (Pittenger y cols, 1999). Las CSM recién aisladas se duplican en un tiempo aproximado de 24 h (Honczarenko y cols, 2006) lo que nos permitió (con pocas muestras) obtener números suficientes de CSM para el montaje de los experimentos de co-cultivo. Se eligió el aislamiento de las CSM a partir de células de MO pues estas son más eficientes en el mantenimiento de progenitores hematopoyéticos que las CSM aisladas de tejido adiposo (Wagner y cols, 2007; Wagner y cols, 2008). Las CSM aisladas para este estudio cumplieron con los criterios de inmunofenotipo y multipotencialidad presentados por la ISCT para categorizar a estas células (Dominici y cols, 2006).

Antes del montaje de los co-cultivos con CSH, las CSM se expandieron solo hasta un tercer o cuarto pase previniendo la pérdida eventual de sus capacidades estimuladoras y secretoras durante su expansión (Honczarenko y cols, 2006). Se ha encontrado que con el cultivo de CSM la expresión de VCAM-1, SDF-1, entre otras moléculas de adhesión y quemoquinas, se reduce progresivamente después del segundo pase (Honczarenko y cols, 2006). Dado que reportes anteriores documentan que VCAM-1 es fundamental en el mantenimiento hematopoyético derivado del co-cultivo (Teixidó y cols, 1992; Wang y cols, 1998), éste estaría afectado al usar por ejemplo CSM de duodécimo pase en las que la expresión de VCAM-1 es nula (Honczarenko y cols, 2006). La evidencia presentada en este trabajo demuestra que la CSM usadas expresan altos niveles de VCAM-1 pero en forma heterogénea (Fig. 46), esto puede reflejar niveles variables de pérdida de la expresión de VCAM-1 por el cultivo de las CSM.

Recientemente, se demostró que la capacidad de las CSM como soporte hematopoyético se afecta después del cuarto pase en cultivo (Briquet y cols, 2010; Walenda y cols, 2010). Estos ensayos de xenotransplante de células CD34<sup>+</sup> co-cultivadas con CSM muestran que las CSH co-cultivadas solo aumentan y mantienen su capacidad repobladora hematopoyética con el uso de CSM de no más de cuatro pases (Briquet y cols, 2010).

En este estudio se usaron CSM en su tercer o cuarto pase de cultivo aisladas de MO estableciendo una condición óptima de mantenimiento hematopoyético.

### **5.3 Consideraciones sobre la expansión de CSH**

Como se ha comentado antes, múltiples combinaciones de citoquinas se han ensayado para la expansión de CSH, sin todavía tener una fórmula efectiva (Walenda y cols, 2011; Kelly y cols, 2009, Hofmeister y cols, 2007). En este trabajo se usó la combinación de citoquinas de acción temprana para la expansión de células CD34<sup>+</sup>, por ser de todas esta combinación la más estudiada (Szilvassy y cols, 2001; Herrera y cols, 2001; Ando y cols, 2006; Vanheusden y cols, 2007; Fei y cols, 2007; Yamamura y cols, 2008). Además, se tuvo en cuenta que esta combinación también se usa como base de adición de otros factores como el G-CSF (Foguenne y cols, 2005; Robinson y cols, 2006; Foguenne y cols, 2009). La disponibilidad de literatura sobre los efectos en las propiedades adhesivas, migratorias y de motilidad documentadas en las CSH cultivadas con citoquinas de acción temprana (Drauid y Rao, 2002; Denning-Kendall y cols, 2003; Giebel y cols, 2004; Szilvassy y cols, 2001; Fei y cols, 2007; Yamamura y cols, 2008) fue otra de las consideraciones dado el enfoque de este trabajo.

La pregunta que se ha formulado desde el comienzo de los estudios de expansión de CSH, es si al inducir la proliferación de estas células se deteriora el compartimiento *stem* que permite la reconstitución hematopoyética (Williams, 1993). Además se cuestiona si las CSH que se someten a la expansión se diferencian perdiendo su capacidad de autorenovación (Hofmeister y cols, 2007). En el modelo planteado de la jerarquía hematopoyética (Fig. 1) las CSH preceden

a los PHM y se distinguen por su capacidad de autorenovación. Esta diferenciación se ha tratado de definir con el uso de marcadores de superficie; el más importante de estos es el marcador CD38. La ausencia del marcador CD38 en células CD34<sup>+</sup> aisladas de MO permite el enriquecimiento de células repobladoras de largo término o CSH y las separa de los PHM (repobladoras de corto término) (Civin y cols, 1996; Prosper y cols, 1996). Se ha planteado entonces que la presencia de este marcador define la pérdida de la capacidad autorenovadora. En este estudio no se utilizó la negatividad de este marcador para distinguir las CSH de los PHM pues la expresión del CD38 de células en cultivo no define las mismas características que en células frescas. Por ejemplo, luego de la expansión de células CD34<sup>+alto</sup>/CD38<sup>-</sup> de SCU hay una disociación funcional de este inmunofenotipo pues el xenotransplante de cantidades crecientes de células expandidas CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> no resultan en un mayor quimerismo (Dorrel y cols, 2000, Danet y cols, 2001). Además en el contexto de trasplantes terapéuticos el número de células CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> trasplantadas se asocia con la rapidez de recuperación hematopoyética (Lanza y cols, 2001). Asimismo, diferentes investigadores han reevaluado la ausencia del CD38 como marcador de “primitividad” en las CSH después del cultivo de expansión (Walenda y cols, 2011).

Habiendo descartado uno de los marcadores tradicionales para evaluar el fenotipo primitivo de las CSH se requirió de varios parámetros para evaluar la diferenciación. El objetivo de esta fase del estudio fue identificar un tiempo de cultivo en que la división de las células CD34<sup>+</sup> no impactara considerablemente la expresión de los marcadores y la funcionalidad hematopoyética. Por esto se valoró la diferenciación durante el cultivo con citoquinas de acción temprana utilizando varias estrategias.

Diferentes estudios han demostrado la pérdida progresiva de la expresión de los marcadores CD34 y CD133 en el cultivo de expansión, evidenciando la diferenciación de las CSH (Möbest y cols, 1997; Robinson y cols, 2006). De acuerdo con esto, se cuantificó la expresión de estos marcadores y al mismo

tiempo la capacidad clonogénica de células CD34<sup>+</sup> en diferentes tiempos de cultivo. Se encontró que la expansión de células CD34<sup>+</sup> durante 14 días de cultivo aumenta el número total de células más de veinte veces. No obstante más de la mitad de las células pierden el marcador CD34 y más del 80% pierden el CD133 (Tabla 7, Fig. 13). Adicionalmente la capacidad clonogénica y de diferenciación de estas células se disminuye sustancialmente (Figs. 14 y 15). Estos parámetros indican que aunque las células CD34<sup>+</sup> se replicaron, la mayoría de estas se comprometieron con el fenotipo de progenitor mieloide (Fig. 15) perdiendo su potencial eritroide. En otros estudios del grupo, se encontró que las células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas por 14 días, preservan ese potencial mieloide pues se diferencian hacia células dendríticas por la inducción con GM-CSF e IL-4 (expresando CD80, CD83, HLA-DR, ICAM-1 y Rel-B) (Anexo 3, Poster presentado en el XLIII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas, 2008). En conclusión el día 14 de expansión la mayoría de las células han perdido la multipotencialidad característica de las CSH.

Asimismo, al evaluar los primeros días de cultivo se encontró que la pérdida más drástica en la intensidad de expresión de CD34 se da al quinto día, en células que se han dividido hasta 5 veces (Figs. 17, 19 y 20). Nuestros resultados concuerdan con los de Möbest y cols, quienes usando una combinación diferente de citoquinas (IL-3, SCF y Flt3L) muestran que un 83% de las células preservan el marcador CD34 al tercer día de cultivo y solo un 35% al quinto día de cultivo (Möbest y cols, 1997). Este resultado es interesante pues en este trabajo encontramos una reducción muy similar del marcador CD34 al tercer y al quinto día de cultivo, a pesar ser combinaciones diferentes de citoquinas. En nuestros experimentos se encontró además, que al tercer día de cultivo con citoquinas de acción temprana la mayoría de las células se habían dividido cumpliendo el objetivo de la expansión (Fig. 21). Seleccionando este tiempo de cultivo, se obtuvo CSH divididas con una mínima pérdida de los marcadores CD34 y CD133.

Como una estrategia alternativa escogimos diferentes días de cultivo para establecer la expresión relativa de algunos de los genes que son claves durante

el desarrollo hematopoyético (Hofmeister y cols, 2007). La curva de expresión obtenida de estos genes se usó para determinar su comportamiento durante la expansión y diferenciación. Se estableció el día 0 como el de menor diferenciación y el día 14 como el punto de mayor diferenciación. Encontramos que mientras que Gata-2 se expresa con un comportamiento bifásico, los transcritos de Notch-1 y Bmi-1 aumentan con la expansión y la diferenciación (Fig. 25).

Gata-2 se expresa en CSH, PHM y especialmente en progenitores eritroides multipotentes que originan las BFU-E y CFU-E (Bresnick y cols, 2010) (Fig. 1). Su transcripción es autoregulada y se suprime en los progenitores restringidos y células hematopoyéticas maduras por un mecanismo de competición que involucra a Gata-1 (Bresnick y cols, 2010) (Fig. 1). En los ensayos realizados con CSH expandidas por tres días demostraron que los transcritos de Gata-2 aumentan levemente, lo cual concuerda con un aumento relativo de formación de colonias de tipo eritroide (BFU-E y CFU-E) (Figs. 25 y 33). A los 14 días de expansión se observó que se restringe la transcripción de este gen concurriendo con la restricción a la formación de progenitores mieloides y posiblemente también células maduras. Los ensayos de cinética de la clonogenicidad de células CD34<sup>+</sup> en cultivo de expansión, muestran un pico de producción de progenitores eritroides al quinto día de expansión que decae al séptimo día (Möbest y cols, 1999). Esto concuerda con que al día quinto de expansión se observó que hay un incremento de 12 veces en la expresión de Gata-2 con respecto al primer día de cultivo la cual decae con el cultivo prolongado. El aumento en la expresión de Gata-2 indicaría un compromiso oligopotente mieloides común que da origen a las BFU-E y UFC-E (Fig. 1, PMC) (Bryder y cols 2006; Bresnick y cols, 2010) y su disminución un compromiso al linaje restringido mieloides y/o de células maduras.

El aumento en la expresión de Bmi-1 en el modelo de diferenciación planteado fue un hallazgo inesperado (Fig. 25), pues en la MO adulta la expresión de Bmi-1 se disminuye con la diferenciación (Lessard y cols, 1998). Sin embargo, se ha

comprobado que al expandir progenitores hematopoyéticos embrionarios y fetales con citoquinas de acción temprana se induce el aumento progresivo de la expresión de este gen (Lee y cols, 2011). Además la deficiencia de Bmi-1 no afecta el desarrollo hematopoyético embrionario o fetal pero si el del adulto sugiriendo un papel diferente de Bmi-1 en los diferentes estadios del desarrollo hematopoyético (van der Lugt y cols, 1994, Park y cols, 2003). El comportamiento proliferativo de las células CD34<sup>+</sup> de SCU se acerca más al de progenitores hematopoyéticos fetales y embrionarios que a los de MO adulta (Winemann y cols, 2000). Teniendo en cuenta que las CSH fetales y las de MO adulta se diferencian en su tasa replicativa y que Bmi-1 es un regulador del ciclo celular (Pietras y cols, 2011), se esperaría que también una regulación diferente de este gen entre estas células. Por tanto una expresión aumentada de Bmi-1 a medida que las CSH se diferencian sería un hallazgo explicable en células CD34<sup>+</sup> aisladas de SCU. El papel de Bmi-1 en la regulación de funciones diferentes a la diferenciación y al ciclo celular se ha documentado recientemente y se discutirá más adelante.

Como se comentó anteriormente Notch-1 se expresa en las células comprometidas al linaje mieloide y especialmente en macrófagos adherentes (Jönsson y cols, 2001; Singh y cols, 2005). En los experimentos analizados la expresión de Notch-1 aumenta en las CSH que han sido expandidas por 14 días (Fig. 25), lo que concuerda con un compromiso hacia la línea de macrófagos en los ensayos de clonogenicidad (Fig. 15). Se observó en estos ensayos que las células CD133<sup>-</sup> aisladas, correspondientes a un 80% de la población formaron colonias de macrófagos. El incremento en la expresión de transcritos de Notch-1 implicaría un compromiso hacia la línea mieloide que no se observó al tercer día de cultivo y pero si de forma moderada al quinto día de cultivo.

Con los patrones de expresión de marcadores hematopoyéticos que se dan durante la diferenciación en cultivo fue posible determinar un tiempo de cultivo en el que hubiese expansión con mínima diferenciación. Además se lograron establecer nuevos patrones de expresión genética que permitieron valorar la

diferenciación de las células expandidas con citoquinas en co-cultivo con CSM comparadas con las no co-cultivadas.

#### **5.4 Establecimiento del modelo de co-cultivo de CSH y CSM**

Otros autores han reportado que la población primitiva de células CD34<sup>+</sup> se expande en presencia de citoquinas de manera más eficiente con el co-cultivo con CSM que con el cultivo con citoquinas solas (Li y cols, 2007; Robinson y cols, 2006; Fei y cols, 2007; Walenda y cols, 2011). Los anteriores reportes evalúan las CSH a los siete o catorce días de expansión, por lo que hay que anotar que en estos tiempos de cultivo también se observan células diferenciadas CD34<sup>-</sup> en ambos tratamientos (Li y cols, 2007; Robinson y cols, 2006; Fei y cols, 2007; Walenda y cols, 2011). También se ha demostrado que el co-cultivo con CSM es sinérgico con las citoquinas induciendo una mayor proliferación de las CSH preservando más los marcadores CD133 y CD34 (Walenda y cols, 2011). En nuestros ensayos se observaron proporciones mayores de células CD34<sup>+</sup> en segunda y tercera división (52%) en las células co-cultivadas que en las cultivadas con citoquinas solas (40%) de acuerdo con el sinergismo proliferativo reportado entre citoquinas y CSM. El número de células CD34<sup>+</sup> que se encontró en el tratamiento HMC fue un 15% mayor que el encontrado en el HC, valor que no resultó estadísticamente significativo. En el co-cultivo de CSH y CSM sin citoquinas las células CD34<sup>+</sup> en su mayoría no proliferaron, pero si disminuyeron la intensidad de expresión de CD34 y su capacidad clonogénica total. Esto demostró que la condición de co-cultivo sin citoquinas no es ideal para la expansión de CSH comparativamente con los tratamientos HC y HMC.

La pérdida de la expresión de marcadores CD34 y CD133, así como la clonogenicidad fue comparable entre HC y HMC. Tanto en HC como en HMC se observó el mantenimiento de la multipotencialidad con la formación de colonias granulocito-macrófago, eritroides y compuestas (GEMM). En progenitores hematopoyéticos primitivos aislados de SCU esta composición clonogénica primaria es en un 80% de UFC-GM y un 20% repartido entre BFU-E y UFC-

GEMM (Majeti y cols, 2007). Esta composición se asemeja a lo observado en nuestros ensayos que muestran una composición mayoritaria de UFC-GM (Fig. 33).

Los genes evaluados Notch-1 y Gata-2 se mantuvieron tanto en HC como en HMC en niveles de expresión similares a las células no expandidas (d 0). Esto se correlaciona con el hallazgo de la retención de todos los potenciales de diferenciación. Sin embargo, el marcador Bmi-1 que se aumenta con el cultivo de expansión al día 14, fue diferente entre HC y HMC. Bmi-1 se expresó 4 veces más en HC que en las células CD34<sup>+</sup> recién aisladas y HMC. Este hallazgo resultó interesante en el contexto de este estudio pues recientemente se encontró que Bmi-1 suprime la expresión de PTEN balanceando positivamente la vía PI3k/Akt aumentando la motilidad celular (Song y cols, 2009; Guo y cols, 2011).

En conclusión, el co-cultivo de expansión a corto plazo de CSH y CSM preserva la expresión de marcadores hematopoyéticos y capacidad clonogénica de las CSH recién aisladas. Nuestros hallazgos al tercer día de expansión de CSH con citoquinas en co-cultivo de CSM demuestran que estas células son comparables en cuanto a sus características de diferenciación y proliferación con las CSH expandidas únicamente con citoquinas.

### **5.5 Efectos del co-cultivo de CSM y CSH en las propiedades adhesivas, migratorias y de motilidad de las CSH**

La capacidad de una CSH de injertarse después de un trasplante depende de sus habilidades en encontrar y anidar los nichos propios de la MO. Esta capacidad es controlada por funciones como la quimiotaxis, adhesión, motilidad y migración a través de moléculas como VLA-4, VLA-5, LFA-1, SDF-1 y CXCR4 (Peled y cols, 2000). Como se comentará a continuación algunas de estas interacciones son más relevantes que otras en la anidación de CSH, formando una jerarquía de vías y señales parcialmente conocida. Reproduciendo algunos hallazgos de otros investigadores, encontramos que las células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas presentan cambios en la funcionalidad de moléculas relacionadas con la adhesión

y quimiotaxis. Se evaluaron los efectos de la presencia de CSM en un cultivo de expansión con citoquinas en las propiedades migratorias, adhesivas y quimiotácticas de las células CD34<sup>+</sup> cultivadas, especulando que el co-cultivo podía modificar los efectos inducidos por las citoquinas.

Se encontró un restablecimiento de las propiedades migratorias, adhesivas y quimiotácticas en CSH como un efecto del co-cultivo de expansión con CSM, el cual no había sido reportado hasta ahora (Perdomo-Arciniegas y Vernot, 2011, Artículo N° 2). Como ya se ha anotado anteriormente la expansión de CSH con citoquinas en co-cultivo con CSM había tenido el enfoque en la sinergia con las citoquinas para el estímulo proliferativo de las CSH y preservación del fenotipo hematopoyético primitivo (Kawada y cols, 1999; Mourcin y cols, 2005; Jang y cols, 2006; Fei y cols, 2007; Li y cols, 2007; Huang y cols, 2007; Walenda y cols, 2011). Este trabajo da una nueva aproximación a los efectos que tienen las CSM en la expansión de CSH con citoquinas. El enfoque de este estudio estuvo en los efectos que tiene el co-cultivo de CSH y CSM en la adhesión, migración y motilidad de las CSH co-cultivadas.

Se tuvieron en cuenta los reportes sobre los efectos *in vitro* e *in vivo* de la expansión con citoquinas en las funciones migratorias, adhesivas y de motilidad como guía para el diseño de la investigación de los efectos del co-cultivo con CSM. Se evaluó la literatura relacionada con la expansión de células CD34<sup>+</sup> aisladas de SCU y sus efectos sobre la migración *in vitro* (Foguenne y cols, 2005; Gothot y cols, 2003), adhesión *in vitro* (Ramírez y cols, 2001; Dravid y Rao, 2002; Giet y cols, 2001; Foguenne y cols, 2005) y motilidad celular *in vitro* (Giebel y cols, 2004); así como con el impacto de la expansión en la anidación de CSH a MO (Ahmed y cols, 2004; Dooner y cols, 2004).

## **5.6 El co-cultivo con CSM restablece la migración mediada por VCAM-1 afectada en CSH expandidas.**

En la jerarquía de las interacciones para el mantenimiento de las CSH dentro de

la MO, la interacción entre VLA-4 y VCAM-1 ocupa el primer lugar por encima de las vías SDF-1/CXCR4 y LFA-1/ICAM-1 (Pappayanopoulou y cols, 2001; Bonig y cols, 2006). La interacción VLA-4/VCAM-1 es fundamental para la movilización y la anidación de CSH a la MO. Esto se evidenció inicialmente al inyectar primates con anticuerpos anti-CD49d (cadena  $\alpha$ , VLA-4) y observar una movilización de CSH desde MO a sangre periférica (Pappayanopoulou y Nakamoto, 1993); lo que no sucedió con anticuerpos dirigidos contra VLA-5 o LFA-1 (Pappayanopoulou y Nakamoto, 1993; Pappayanopoulou y cols, 2001). Asimismo, el bloqueo con anticuerpos dirigidos contra VLA-4 y/o VCAM-1 afectan la anidación medular de CSH, manteniéndolas en sangre periférica y bazo (Pappayanopoulou y cols, 1995).

Al analizar la jerarquía *in vitro* de los sustratos de migración en células CD34<sup>+</sup> frescas, la migración mediada por VCAM-1 resultó siempre mayor que la mediada por ICAM-1, FBN y SDF-1 (Figs. 36, 37 y 40). Mientras que ICAM-1 induce en células frescas el doble o triple de la migración basal, VCAM-1 puede inducir entre cinco y siete veces la migración basal en células CD34<sup>+</sup> recién aisladas de SCU (Figs. 36 y 40). Encontramos como otros autores, que la fibronectina como estímulo único no induce migración adicional con respecto al basal (Huygen y cols, 2002). Estos hallazgos indican que la migración y quimiotaxis *in vitro* en cierta forma reproduce en células frescas los hallazgos de la jerarquía *in vivo* (Bonig y cols, 2006).

En cuanto a los efectos específicos *in vitro* de la expansión con citoquinas, hay consenso en que disminuye la migración de CSH mediada por VCAM-1 (Bonig y cols, 2006; Foguene y cols, 2005). Nuestros ensayos de migración mediada por VCAM-1 en células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas revelaron esta reducción reportada anteriormente (Figs. 36 y 37). Encontramos que con la expansión de células CD34<sup>+</sup> la migración vía VLA-4/VCAM-1 y LFA-1/ICAM-1 tienden a igualarse perdiendo la jerarquía entre ellas (Fig. 36). Pero el resultado más interesante fue el restablecimiento de la migración mediada por VCAM-1 en las células CD34<sup>+</sup> expandidas en co-cultivo de CSM preservando la jerarquía

migratoria mencionada (Figs. 36 y 37).

La migración transestromal de células CD34<sup>+</sup> depende de la afinidad de VLA-4 (más no de LFA-1) la cual es modulada a su vez por SDF-1 (Peled y cols, 2000), indicando también una jerarquía de interacciones para atravesar el estroma medular. Esto es aún más importante en modelos post-irradiación pues con el endotelio alterado, la anidación de las CSH recae en la interacción con el VCAM-1 estromal (Mazo y cols, 2002). Además, las otras integrinas importantes en la hematopoyesis como VLA-5, VLA-6 y LFA-1 muestran solo un papel cooperativo con VLA-4 en la movilización de progenitores de MO a sangre periférica (Pappayanopoulou y Nakamoto, 1993; Pappayanopoulou y cols, 2001; Qian y cols, 2006).

Recientemente se han reportado, al menos cuatro estados conformacionales de VLA-4, dos de alta y dos de baja afinidad a VCAM-1, que se modulan por los estímulos de las quemoquinas (Chigaev y cols, 2003, Chigaev y cols, 2001; Chigaev y cols, 2009) sin cambiar la expresión de VLA-4 (Lichterfeld y cols, 2000). Se ha visto que la expansión de células CD34<sup>+</sup>, induce un estado permanente de activación de VLA-4 que no aumenta con el estímulo de SDF-1 y que resulta una adhesión aumentada a VCAM-1 (Foguenne y cols, 2009). Dado que el co-cultivo con CSM afectó la migración mediada por VCAM-1 se quiso evaluar también la adherencia de las células expandidas a los sustratos principales de VLA-4 (VCAM-1 y fibronectina).

### **5.7 El co-cultivo con CSM restablece el balance entre adhesión y migración en la interacción mediada por VLA-4**

El proceso migratorio sobre un sustrato determinado implica que las células se adhieran a éste con una afinidad que les permita luego desprenderse del sustrato para desplazarse (Mañes y cols, 1999). En el caso de las células CD34<sup>+</sup> expandidas se ha demostrado que la migración inducida está afectada por un aumento en la adhesión basal a VCAM-1 (Foguenne y cols, 2009). Reportes previos también documentan el aumento en la adhesión al fragmento CH-296 de

la fibronectina en células CD34<sup>+</sup> aisladas de SCU y expandidas con citoquinas (Foguenne y cols, 2005). El fragmento de fibronectina mencionado CH-296, tiene sitios de unión a VLA-4 y VLA-5 (Foguenne y cols, 2005). En xenotransplantes, el aumento artificial e irreversible de la adhesión mediada por VLA-4 y VLA-5 disminuye la anidación de células CD34<sup>+</sup> a la MO (Ramírez y cols, 2001). Es decir que un aumento en la adhesión celular a ciertos sustratos no necesariamente indica una mejora en la función fisiológica de estas moléculas.

Una de las explicaciones al aumento de la migración mediada por VCAM-1 en la condición de co-cultivo de células CD34<sup>+</sup> con CSM podría ser la modulación de la adhesividad de VLA-4 en las células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas. En la evaluación comparativa de estas funciones se encontró que las células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas y en co-cultivo con CSM (HMC) se adhirieron menos a VCAM-1 que las células expandidas solo con citoquinas (HC) (Fig. 46). Asimismo, la adhesión a fibronectina mediada por VLA-4 (bloqueando VLA-5) fue menor en las células CD34<sup>+</sup> expandidas en co-cultivo con CSM (Fig. 45D).

Al evaluar la adherencia a ICAM-1 no encontramos diferencias entre la expansión con o sin co-cultivo (Fig. 45B). Tampoco la adhesión a fibronectina con estímulo reportó ningún efecto mediado por el co-cultivo de CSM (Fig. 45C). Se observó en los videos grabados de las células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas que algunas de estas células se quedan adheridas a las CSM por medio del urópodo (Video 1). En otros tipos celulares se ha observado que la localización de CD49d se puede observar en el urópodo (Goldfinger y cols, 2003) por lo que es posible que la mayor adhesión de estas células se correlacione también con la polarización. Nuestros ensayos, que concuerdan con los de Foguenne y cols, muestran que las células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas aumentan su adhesión mediada por VCAM-1 y esto se correlaciona con una disminución de la migración mediada por VCAM-1 (Foguenne y cols, 2005; Foguenne y cols, 2009). Estos hallazgos nos permitieron concluir que las células CD34<sup>+</sup> co-cultivadas expandidas con citoquinas en presencia de CSM migran más debido a una atenuación de la adherencia a VCAM-1.

## **5.8 El co-cultivo con CSM atenúa la quimiotaxis, la polarización y la motilidad incrementada de las CSH expandidas con citoquinas**

En CSH frescas la siguiente vía en la jerarquía de la anidación después de la interacción VCAM-1/VLA-4 es el eje quimiotáctico SDF-1/CXCR4 (Bonig y cols, 2006). Se ha propuesto que la expansión de CSH con citoquinas invierte esta jerarquía aumentando la importancia de la vía SDF-1/CXCR4 sobre la de VCAM-1/VLA-4 (Bonig y cols, 2006). Nuestros hallazgos muestran, como los de otros, que la expansión con citoquinas induce un deterioro en la quimiotaxis inducida por SDF-1 (Fig. 39), así como una reducción de la expresión del receptor (Figs. 39, 41A, 41B) (Jo y cols, 2000, Denning-Kendall y cols, 2003). En aparente contradicción con nuestros resultados, Bonig y cols reportan que los progenitores hematopoyéticos murinos expandidos son quimiotácticamente más activos que los recién aislados (Bonig y cols, 2006). En los ensayos de quimiotaxis *in vitro* que realizan estos investigadores usan una combinación de SDF-1 más SCF demostrando una mayor migración de las células expandidas. Ellos interpretan que este proceso es dependiente de la vía SDF-1/CXCR4 por su sensibilidad a la toxina pertusis que inhibe la señal dependiente de proteínas G del CXCR4 (Bonig y cols, 2006). Explicamos la falta de estimulación quimiotáctica de las HC en nuestros ensayos por la ausencia de factores adicionales como el SCF como co-estimulantes en el *buffer* de migración. En ensayos de quimiotaxis usando CSH fetales, se ha demostrado que la adición de SCF al *buffer* de migración (que contiene SDF-1) aumenta la quimiotaxis *in vitro* a un 90% comparado con una quimiotaxis del 10% usando únicamente SDF-1 (Christensten y cols, 2004). Incluso se ha reportado que la adición de concentraciones mayores al 4% de albúmina sérica aumentan de forma considerable la quimiotaxis inducida por SDF-1 *in vitro* (Ryser y cols, 2009). Durante la estandarización de los ensayos de quimiotaxis en los que se usó medio con SFB al 10% en lugar de *buffer* de migración, la quimiotaxis de las células expandidas sin CSM fue 5 veces mayor a la de las expandidas con CSM (Anexo 4, Poster presentado en el *ISSCR meeting* 2009, Fig. 5). En estos ensayos se usó la combinación de SDF-1 y SFB mostrando que las células expandidas con citoquinas sin CSM son

quimiotácticamente más activas que las co-cultivadas en presencia de estímulos combinados.

A diferencia de lo encontrado con el estímulo único de SDF-1, al evaluar la quimiotaxis con medio condicionado se encontró inducción tanto en las células expandidas solo con citoquinas (HC) como en las expandidas con citoquinas y CSM (HMC) (Fig. 44). El medio condicionado indujo 20 veces la migración basal en células CD34<sup>+</sup> expandidas únicamente con citoquinas (HC) mientras que en las células expandidas co-cultivadas con CSM (HMC) solo la indujo 5 veces (Fig. 44). Esta diferencia se correlacionó con una menor expresión del receptor CXCR4 en las células co-cultivadas con CSM. El medio condicionado de CSM contiene múltiples factores, que son candidatos a potenciar la respuesta migratoria del SDF-1, entre ellos están el SCF y el Flt3L (Christensen y cols, 2004; Fukuda y cols, 2005). Otras quemoquinas secretadas por las CSM (Honczarenko y cols, 2006) son CCL4 y CCL5 las cuales también modulan la respuesta migratoria de CSH ante SDF-1 (Basu y cols, 2009). Sugerimos que parte de la diferencia en la quimiotaxis entre células CD34<sup>+</sup> expandidas con o sin CSM, se deba a las diferencias de expresión del receptor CXCR4 entre ellas. Las diferencias en la quimiotaxis mediada por SDF-1 entre HC y HMC no se revelarían sino con estímulos combinados debido a la ya disminuida expresión del receptor CXCR4 de las células con ambos tratamientos (Figs. 39 y 41A). El SDF-1 en sinergia con otros factores del medio condicionado induce la quimiotaxis celular a través de su interacción con receptor CXCR4, en este caso especialmente en las células que más lo expresan (HC). Asimismo en las células HC se observó que el receptor CXCR4 se endocita más después del estímulo único de SDF-1, lo cual estaría de acuerdo con una mayor inducción a través del receptor CXCR4 (Fig. 42).

Aunque en este estudio no se puede asegurar cuales son los factores del medio condicionado (Me.Co) que potencian la quimiotaxis, se puede decir que este medio permite evaluar una quimiotaxis más fisiológica de las células CD34<sup>+</sup> pues las citoquinas evaluadas (Tabla 8), hacen parte del microambiente medular (Cluitmans y cols, 1995).

El incremento en la quimiotaxis en CSH expandidas reportada anteriormente, se correlaciona con un aumento en la polarización de las células CD34<sup>+</sup> estimuladas con citoquinas de acción temprana (Giebel y cols, 2004). Nuestros hallazgos muestran una polarización generalizada en células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas comparadas con las células recién aisladas y las células expandidas y co-cultivadas con CSM (Figs. 50C y 54, Tabla 9). La frecuencia de células polarizadas en células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas (HC) resultó cinco veces mayor que en las expandidas con citoquinas y CSM (HMC). Además, al analizar la motilidad *ex vivo* de HC en Me.Co. se encuentran desplazamientos y velocidades tres veces mayores que en HMC (Fig. 57). Esto demuestra que el co-cultivo con CSM modula negativamente la actividad quimiotáctica de células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas, posiblemente por una reducción de la expresión de CXCR4, que se mantiene con la división celular (Fig. 41B) y la disminución de la fosforilación de Akt relacionada con una polarización celular reducida.

### **5.9 El co-cultivo de células CD34<sup>+</sup> con CSM restablece la migración inducida por el co-estímulo de SDF-1 y VCAM-1**

Los estudios de Foguene y cols, demuestran en células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas que la migración *in vitro* mediada por VCAM-1 se reduce con el estímulo de SDF-1, en lugar de aumentar como pasa en células recién aisladas (Foguene y cols, 2009). Usando medio condicionado en lugar de SDF-1 encontramos que la migración de células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas se reduce con la presencia de VCAM-1 (Fig. 44B). Por el contrario, en células co-cultivadas se induce una migración adicional en presencia de VCAM-1 y medio condicionado. Postulamos entonces que las CSM preservan la inducción específica mediada por VCAM-1 modulando los efectos de los agentes quimiotácticos sobre la adherencia en VCAM-1. Se ha reportado que el SDF-1 estimula un incremento en la adhesión mediada por el VLA-4 (Hidalgo y cols, 2001) y que esto es especialmente cierto en células CD34<sup>+</sup> expandidas (Zhang y cols, 2004). Sugerimos que la disminución en la migración mediada por VCAM-1

y medio condicionado en células expandidas resulte de un aumento de la adhesión a los ligandos de VLA-4 que impide la migración inducida. Por el contrario el co-cultivo con CSM preserva la jerarquía migratoria de VCAM-1/VLA-4 sobre la quimiotaxis en células expandidas con una menor sensibilidad al estímulo de SDF-1 y una menor adhesión mediada por VLA-4. Es decir que otro de los efectos del co-cultivo además de una expansión sinérgica con las citoquinas es la preservación la jerarquía de vías adhesivas y migratorias de las células frescas.

Es posible que los cambios en la jerarquía migratoria liderada por las interacciones mediadas por VCAM-1 repercuta en procesos *in vivo* como la localización y mantenimiento de células CD34<sup>+</sup> en la MO después de un trasplante. La participación de VCAM-1 está ampliamente documentada múltiples procesos de las CSH, como la homeóstasis hematopoyética (Teixidó y cols, 1992; Wang y cols, 1998), la migración transendotelial (Jacobsen y cols, 1996; Schweitzer y cols, 1996; Mazo y cols, 1999; Mazo y cols, 2002; Katayama y cols, 2003) y la migración transestromal (Peled y cols, 2000). El efecto movilizador de CSH con los anticuerpos anti-CD49d y anti-VCAM-1, dependiente de la expresión del receptor del SCF, revelan la participación de estas vías en la retención de estas células en la MO (Pappayanopoulou y cols, 1998). La evidencia de que los osteoblastos modulan la hematopoyesis a través de VCAM-1 (Jung y cols, 2006) y que las “nuevas” CSM (Nestin<sup>+</sup>) expresan VCAM-1, SCF y SDF-1 al mismo nivel que genes “housekeeping” (Méndez-Ferrer y cols, 2010), indicarían un mecanismo posible de localización de CSH en estos nichos específicos.

El proceso de anidación de las CSH en nichos específicos dentro de la MO, tiene cierta especificidad por el tipo de diferenciación que tengan los progenitores hematopoyéticos. Así se ha demostrado que las células más indiferenciadas se localizan en el endosteo o cerca a las CSM (Nestin<sup>+</sup>) (LoCelso y cols, 2009; Sánchez-Ferrer y cols, 2010). Los fenotipos adhesivos y/o migratorios de la retención o salida medular de las células *stem* hematopoyéticas primitivas no están especificados aún. Experimentos *in vitro* demuestran que las células CD34<sup>+</sup>

más primitivas son las que migran con la participación de VLA-4 a través de células endoteliales (Lichterfeld y cols, 2000; Peled y cols, 2000) y estromales (Peled y cols, 2000). En este trabajo se demostró que la migración mediada por VCAM-1 selecciona las CSH más indiferenciadas (Fig. 53). La proporción de células diferenciadas que migraron a través de VCAM-1 en células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas co-cultivadas o no con CSM fue significativamente menor al total sembrado en el ensayo (Fig. 53). Esto indica la importancia del mantenimiento del fenotipo migratorio pues su desregulación puede resultar en localizaciones intramedulares inadecuadas de progenitores hematopoyéticos indiferenciados.

En un artículo reciente publicado en *Science* se incluye por primera vez el marcador CD49f (VLA-6) en el inmunofenotipo para el aislamiento de las CSH más primitivas que han sido recuperadas de SCU (Notta y cols, 2011). El CD49f es el receptor de laminina (Tabla 2), y se ha demostrado que su función es cooperativa con CD49d (VLA-4) en la anidación medular de CSH murinas (Qian y cols, 2006). El hallazgo de este inmunofenotipo específico demuestra una vez más que la relación entre un fenotipo primitivo hematopoyético y la adhesión todavía está por dilucidar completamente. Además se reconoce la necesidad de entender a fondo los mecanismos por los que con la expresión de este marcador, una sola de estas células puede restablecer la hematopoyesis de un organismo completo (Notta y cols, 2011).

#### **5.10 El co-cultivo con CSM preserva la actividad de LFA-1 en CSH expandidas con citoquinas: regulación cruzada entre LFA-1 y VLA-4**

Se ha discutido hasta ahora que las CSM modulan la funcionalidad migratoria y adhesiva mediada por VCAM-1 y CXCR4 en las CSH co-cultivadas en un modelo de expansión con citoquinas de células CD34<sup>+</sup>. Se evaluó si estos cambios (dependientes del co-cultivo con CSM) se relacionaban con cambios en la expresión de CD49d (receptor de VCAM-1) entre otras moléculas como CD49e, CD44 y CD11a en la superficie de las CSH. En estos análisis no se encontraron

modificaciones en la expresión de CD49d pero si en la de CD11a (Fig. 47). Inicialmente encontramos como lo han reportado otros autores, que la expansión de células CD34<sup>+</sup> con citoquinas induce un aumento en la expresión de diferentes moléculas de adhesión, entre ellas CD49d, CD49e, CD44 y CD11a (Draavid y Rao, 2002; Denning-Kendall y cols, 2003; Yamamura y cols, 2008; Wulf-Goldenberg y cols, 2008). Sin embargo, encontramos que la menor adhesión y mayor migración mediada por VCAM-1 de las CSH co-cultivadas no se correlacionó con una reducción en la expresión de CD49d (VLA-4) previamente aumentada por las citoquinas.

Se encontró que la detección de la molécula CD11a que se aumenta por las citoquinas en las células CD34<sup>+</sup> expandidas, se redujo por acción de las CSM. La activación de LFA-1 (CD11a/CD18) implica cambios conformacionales de la integrina como los que se mencionaron con la activación de VLA-4 (Ma y cols, 2002; Tang y cols, 2005). La activación e inactivación de LFA-1 se puede detectar con anticuerpos dirigidos contra epítopes en el dominio I de CD11a (Ma y cols, 2002) o ciertos epítopes del CD18 (Tang y cols, 2005). Encontramos que el anticuerpo usado para detectar CD11a en la superficie de las CSH (MEM25) es sensible a la inactivación de LFA-1, confirmando este hallazgo con el anticuerpo H111 dirigido contra la conformación cerrada de LFA-1 (Figs. 48 y 54A) (Ma y cols, 2002). Los experimentos de cuantificación relativa del ARNm de CD11a no reflejaron consistentemente las diferencias entre HC y HMC detectadas en la expresión de superficie de CD11a (Figs. 49 y 47), por lo que se exploró más a fondo la activación de esta molécula. Se encontró una diferencia consistente en la expresión del epítipo de activación de LFA-1 MEM148 entre HMC y HC, que denotaba la activación de esta molécula en las células co-cultivadas (Fig. 50). El LFA-1 inactivo se localiza a lo largo de las células polarizadas expandidas con citoquinas mientras que en las células co-cultivadas es la molécula activa la que prevalece (Fig. 50B). Dado que en otros tipos celulares de origen hematopoyético existe una regulación cruzada entre las señales de LFA-1 y VLA-4 (Porter y Hogg, 1997; Chuang y cols, 2004) se exploró esta posibilidad en HC y HMC. Se demostró que la migración mediada por VCAM-1 se disminuyó con el bloqueo de

LFA-1 en las células estimuladas con SDF-1 (tanto en HC como en HMC) (Fig. 51). Esto podría indicar que se necesita la actividad de LFA-1 para una migración mediada por VCAM-1. En monocitos la activación de LFA-1 disminuye la adhesión a VCAM-1 (Chuang y cols, 2004). Por lo que sugerimos que la activación de LFA-1 en HMC permita un mejor balance de la adhesión a VCAM-1 (disminuyéndola), lo cual sería necesario para la migración mediada por este ligando.

Las CSM secretan al medio de cultivo ICAM-1 y VCAM-1 (Van Overstraeten-Schölgen y cols, 2001), estos ligandos podrían activar directa o indirectamente el LFA-1 o el VLA-4 en las células CD34<sup>+</sup> co-cultivadas. Esto estaría en línea con nuestros ensayos que demuestran que la activación de LFA-1 en HMC es mediada por factores solubles. El VCAM-1 secretado que estimula o bloquea el VLA-4 puede ser la manera directa de modular la adhesión mediada por VLA-4/VCAM-1. Asimismo, la activación de LFA-1 por su interacción con el ICAM-1 soluble, podría modular indirectamente la adhesión mediada por VLA-4. Se propone que la inactivación de LFA-1 inducida en las HC genere una adhesión aumentada a VCAM-1 que les impide migrar mediante VCAM-1 en condiciones de estimulación.

#### **5.11 El co-cultivo con CSM modula la fosforilación de Akt de CSH expandidas con citoquinas involucrada en la motilidad celular de CSH**

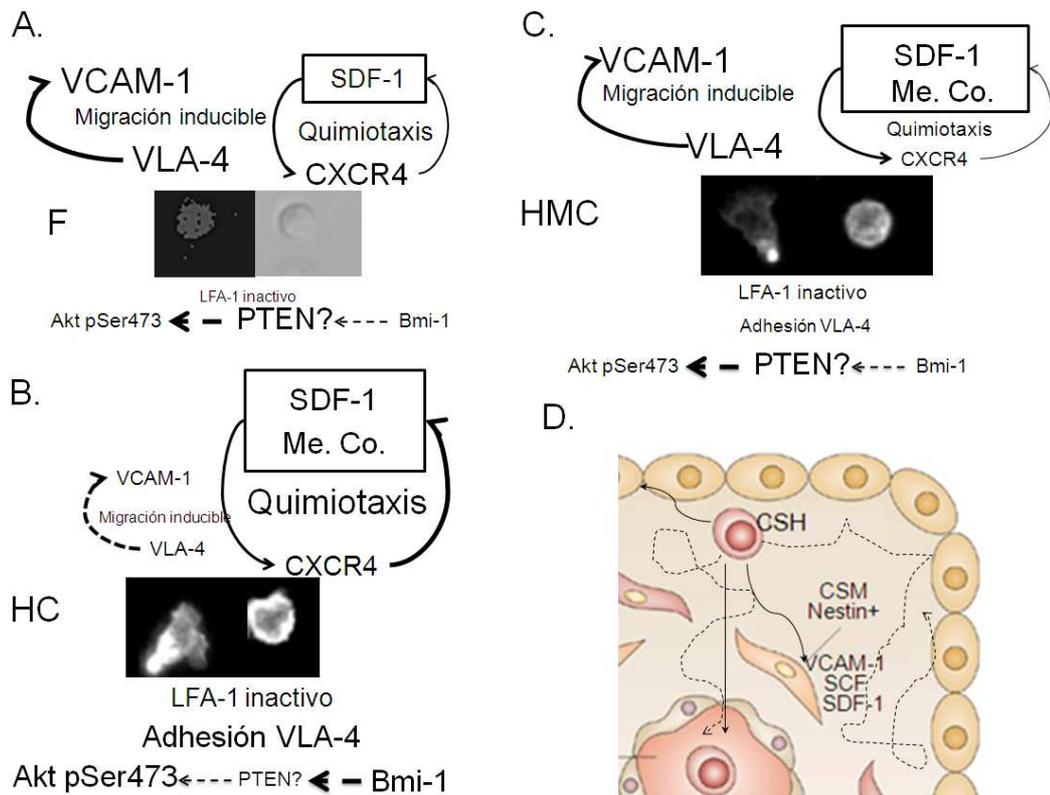
Se ha observado que una de las vías intracelulares que se activa durante el proceso de expansión de CSH es la de PI3K/Akt (Buitenhuis y Coffey, 2009; Bonig y cols, 2006; Giebel y cols, 2004). Esta vía inicialmente involucrada en el desarrollo de células B, regula la hematopoyesis participando en el proceso de decisión de linaje hematopoyético (Buitenhuis y Coffey, 2009). También es crucial en señalización a través de quimiorreceptores y la modulación de moléculas de adhesión como LFA-1 (Chung y cols, 2001). La estimulación de CSH con citoquinas de acción temprana induce la fosforilación de la serina 473 de Akt (Buitenhuis y cols, 2010), produciendo la polarización y proliferación de las

células (Giebel y cols, 2004). En nuestros ensayos, encontramos que las citoquinas inducen polarización de las células CD34<sup>+</sup> pero el co-cultivo con CSM revierte este efecto (Fig. 54, Tabla 9). Se observó que la activación de Akt inducida por las citoquinas se disminuía consistentemente por acción del co-cultivo con CSM (Fig. 58A). Las observaciones de este trabajo concuerdan con las de Buitenhuis y cols, que demuestran que la activación constitutiva de Akt en CSH va en detrimento de la migración inducida de progenitores hematopoyéticos, regulando positivamente la expresión de CD49d y la adhesión a células estromales (Buitenhuis y cols, 2010). Estos investigadores demostraron también que la activación constitutiva de Akt de CSH reduce la anidación a la MO y su inhibición aumenta esta anidación después de 22 y 44 h (Buitenhuis y cols, 2010). Dado que el efecto de disminución de la fosforilación de Akt se repite en células REH co-cultivadas con CSM, se confirma que la disminución de la fosforilación de Akt es por el efecto de la presencia de CSM (Fig. 58C). Fisiológicamente es la vía de la fosfatasa PTEN (del inglés, *Phosphate and Tensin Homologue deleted on chromosome 10*) la que modula la activación de la vía PI3K/Akt pues defosforila el fosfatidil-inositol (3,4,5) trifosfato (PIP3) inhibiendo la activación de PI3K (Buitenhuis y Coffey, 2009). La expresión de PTEN puede ser reprimida por Bmi-1, que se asocia directamente al locus genético de PTEN (Song y cols, 2009; Guo y cols, 2011). Aunque no valoramos la expresión directamente de PTEN, encontramos que las HC expresan alrededor de cuatro veces más Bmi-1 que las HMC (Fig. 35). Se sugiere que las diferencias en la fosforilación de Akt puedan ser producto de una expresión diferencial de PTEN secundaria a las diferentes cantidades encontradas en HC y HMC del represor Bmi-1. Tanto Bmi-1 como Akt han sido relacionados en procesos de diferenciación celular. Por ejemplo la activación constitutiva de Akt induce proliferación y subsecuente apoptosis de CSH además de la expansión de células de la línea mieloide (Kharas y cols, 2010). De manera interesante se observa cómo los genes relacionados con la habilidad de autorenovación y diferenciación hematopoyética también se relacionan con la motilidad y la adhesión celular.

En este trabajo se estableció que el co-cultivo de expansión de CSH con CSM modifica los patrones de adhesión, motilidad y migración celular. En la figura 59, se observan los esquemas del resultado de la migración en cada tratamiento probado. Se observó cómo las células CD34<sup>+</sup> recién aisladas responden a los estímulos migratorios de VCAM-1 y de SDF-1 (Fig. 59A). Estas células responden a ambos estímulos combinados y presentan un fenotipo redondeado con baja expresión de Bmi-1, LFA-1 inactiva y fosforilación de Akt (Fig. 59A). Por su parte las células expandidas solo con citoquinas (HC) reducen su respuesta a los estímulos individuales migratorios de VCAM-1 y SDF-1 (Fig. 59B). Sin embargo, al combinar el SDF-1 con otros factores presentes en el medio condicionado (Me.Co.) la respuesta quimiotáctica de HC es exagerada y la migratoria mediada por VCAM-1 es inhibida (Fig. 59B). En las células expandidas con citoquinas, HC, se observa una alta fosforilación de Akt, inactivación de LFA-1, adhesión mediada por VLA-4 y alta expresión de Bmi-1 (Fig. 59B). En el caso de las CSH expandidas con citoquinas y co-cultivadas con CSM, preservan un fenotipo redondeado migratorio mediado por VCAM-1 (Fig. 59C). Solo responden a estímulos quimiotácticos combinados pero en menor intensidad que HC ya que comparativamente expresan menos receptor CXCR4. Por otra parte el estímulo quimiotáctico combinado en conjunto con VCAM-1 permite una migración inducible en HMC y en contraposición con lo observado en HC (Fig. 59C). En las células expandidas con citoquinas y CSM, HMC, se observa una fosforilación de Akt intermedia, LFA-1 activa, adhesión mediada por VLA-4 disminuida y baja expresión de Bmi-1 (Fig. 59C).

De esta manera se establece que el co-cultivo de células CD34<sup>+</sup> y CSM revierte algunos de los efectos inducidos por las citoquinas permitiendo un patrón migratorio que se asemeja más al de las células CD34<sup>+</sup> recién aisladas.

Propiedades de adhesión, migración y motilidad de células stem hematopoyéticas expandidas con citoquinas de acción temprana en co-cultivo con células stem mesenquimales



**Figura 59. Vías migratorias de células CD34<sup>+</sup> frescas y en las condiciones HC y HMC.**

**A. Células frescas. B. HC C. HMC.** La dimensión de las letras y flechas determinan la importancia de la señal en cada condición. Efecto positivo (flechas continuas). Efecto negativo (flechas discontinuas). Medio condicionado (Me.Co.) que representa al SDF-1 más otros co-estímulos. **D.** Destinos de una CSH dentro de la MO. Se observa el endosteo, un sinusoide sanguíneo y las CSM Nestin<sup>+</sup>. CSH con motilidad aumentada (HC, flechas discontinuas) o migración dirigida (HMC, continuas). Modificado de la figura 3.

### 5.12 Aplicabilidad del co-cultivo en trasplantes hematológicos

La controversia con respecto al impacto *in vivo* de los cambios que se observan en las propiedades adhesivas y migratorias después de la expansión con citoquinas de células CD34<sup>+</sup> de SCU está todavía vigente (Zhai y cols, 2004; Herrera y cols, 2001, Wulf-Goldenberg y cols, 2008). Por ejemplo Zhai y cols, argumentan que las propiedades de la anidación se mantienen después de la expansión de células CD34 indicando un aumento en la expresión y funcionalidad de algunas moléculas de adhesión sin mostrar ensayos *in vivo* (Zhai y cols, 2004). Otros grupos de investigación muestran ensayos *in vivo* que sugieren que la anidación a MO se desvincula de la interacción mediada por VLA-4, como

efecto de la expansión con citoquinas de CSH (Bonig y cols, 2006; Foguene y cols, 2009). Estos ensayos evalúan la anidación entre 18 y 24 h después de la inyección de las células. Ahmed y cols, detectan un defecto en la anidación derivado de la expansión a las 20 h inyectando los mismos números de células CD34<sup>+</sup> antes y después de la expansión con citoquinas por 3, 4 y 5 días (Ahmed y cols, 2004). Estudios de cinética de la anidación de CSH a la MO muestran que la anidación a las 24 h es dependiente de VLA-4 (Ausami y cols, 2001). Otros reportes únicamente detectan un retardo en la repoblación medular tras la inoculación de células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas comparada con la de células frescas (Ramírez y cols, 2001; Guenechea y cols, 1999; Wulf-Goldenberg y cols, 2008). Este retardo de la repoblación medular ha sido relacionado con la alteración de la expresión y funcionalidad de VLA-4 y VLA-5, que podría regular la permanencia de progenitores en la MO después de un trasplante (Ramírez y cols, 2001). En humanos se observa el mismo efecto de retardo en la repoblación medular luego del trasplante de SCU expandida en cultivo líquido (revisión de Kelly y cols, 2009). En la práctica clínica la repoblación medular retardada induce complicaciones infecciosas secundarias por lo que se han buscado nuevas alternativas de expansión de SCU que están actualmente en evaluación.

Hasta ahora la alternativa de expansión que acelera la repoblación medular en trasplantes de SCU en humanos adultos ha sido el co-cultivo con CSM como soporte de expansión con citoquinas de las CSH de SCU (Kelly y cols, 2009; Robinson y cols, 2011). El co-cultivo con CSM mejora sustancialmente el xenotrasplante de células CD34<sup>+</sup> de SCU expandidas con citoquinas (Fei y cols, 2007). Fei y cols observaron que la repoblación de MO aumenta a un 50% usando células CD34<sup>+</sup> co-cultivadas con CSM y expandidas con citoquinas de acción temprana; comparándolo con un 9% usando células expandidas con las mismas citoquinas (Fei y cols, 2007). Recientemente Walenda y cols, reportaron que la expansión en co-cultivo con CSM aumenta la repoblación medular temprana (a un 20%) comparativamente con la de una repoblación afectada por el efecto de las citoquinas (6%) (Walenda y cols, 2011). Teniendo en cuenta estos hallazgos y la importancia de la interacción VLA-4/VCAM-1 en la anidación de las

células CD34<sup>+</sup>, nos permitimos especular que los efectos positivos del co-cultivo en trasplantes sean en parte debidos al restablecimiento de la jerarquía en la migración mediada por la interacción VLA-4/VCAM-1.

La localización intramedular de CSH es regulada por señales específicas de las células endoteliales, estromales y osteocitos. En las células expandidas la motilidad aumentada por efecto de los factores solubles puede ir en detrimento de localizaciones más dirigidas (HC, líneas discontinuas Fig. 59D). El patrón morfológico y los videos que muestran la baja motilidad en CSH co-cultivadas con CSM y expandidas con citoquinas permiten pensar en una estimulación quimiotáctica moderada pero modulable (Fig. 59D). Además el efecto de las CSM modulando señales como la de la fosforilación de Akt y la expresión de Bmi-1 que además de sus efectos en la motilidad celular juegan un papel en la autorenovación de CSH pueden determinar la localización específica de CSH y otros progenitores hematopoyéticos dentro de la MO (Fig. 59D).

El análisis de los fenotipos migratorios y adhesivos de los distintos progenitores hematopoyéticos puede esclarecer la relación entre los inmunofenotipos primitivos (como el de CD49f) y la localización dentro de micronichos en la MO.

La capacidad de injertarse a la MO de la población celular KSL murina depende de que estas células expresen un inmunofenotipo CD49d<sup>intermedio</sup>, CD11a<sup>-</sup>, CD49e<sup>+</sup> (Orschell-Traycoff y cols, 2000). Los progenitores hematopoyéticos murinos aislados con base en la marcación con el clon 2D7 (anti-CD11a) no se injertan en la MO (Orschell-Traycoff y cols, 2000). Recientemente, se demostró que este clon únicamente detecta la conformación cerrada del LFA-1 (Wang y cols, 2009). En nuestros hallazgos la expresión de la conformación cerrada LFA-1 concurre con la pérdida del CD34 (Fig. 52) y el co-cultivo con CSM previene la inactivación de la molécula LFA-1 inducida por el cultivo de CSH con citoquinas (Fig. 50). Se necesitarían nuevos estudios para establecer si con solo la estabilización de la conformación cerrada de LFA-1 es suficiente para desfavorecer la anidación medular de CSH.

Además el estudio de los mecanismos propuestos de la modulación del fenotipo migratorio como la estimulación de CSH expandidas con VCAM-1 o ICAM-1 solubles o fijados puede brindar otras alternativas de expansión con miras a preservar los fenotipos migratorios más adecuados para la anidación medular.

Actualmente la terapia celular con CSH no solamente apunta a la repoblación hematopoyética de la MO sino a la recuperación de otros tejidos afectados, como el cardíaco (Kavanagh y Kalia, 2011). Se deben definir los mecanismos por los cuales las CSH migran a esos tejidos y no a otros, y la mejor manera de manipular las CSH para su anidación adecuada. Los resultados de este trabajo son potencialmente útiles para este fin, ya que se describen tres fenotipos migratorios de CSH, disponibles para la evaluación de patrones de anidación de CSH a diferentes tejidos. Proponemos que los mejores resultados que se han encontrado clínicamente con el trasplante de CSH expandidas en co-cultivo con CSM se deban en parte al restablecimiento de la jerarquía migratoria de las CSH permitiéndoles una localización intramedular adecuada.

## **6. Conclusión**

En conclusión, en este trabajo se desarrolló un método práctico de selección de muestras de SCU para el aislamiento costo-efectivo de células CD34<sup>+</sup> usando bajos volúmenes de SCU. En segundo lugar, se establecieron patrones de diferenciación celular hematopoyética en el cultivo de expansión que permitieron determinar que los tratamientos HC y HMC son comparables en cuanto a su diferenciación y proliferación a los tres días de cultivo. Por último, la determinación comparativa de las propiedades migratorias, adhesivas y de motilidad en las CSH frescas, expandidas con citoquinas en co-cultivo con CSM y sin él, permitió hacer un modelo explicativo (Fig. 59) que involucra la funcionalidad de VLA-4, CXCR4, LFA-1, Akt y Bmi-1 en CSH respuesta a la expansión y al co-cultivo con CSM.

## **7. Perspectivas**

Los pasos de la anidación a la MO (*homing - lodgment*) de CSH expandidas en co-cultivo con CSM, no han sido valorados aún en modelos de xenotrasplante. El desarrollo de estos ensayos requiere de infraestructura para el manejo de ratones inmunodeficientes, de la que desafortunadamente carecemos en nuestro ámbito. La implementación de esta infraestructura y la realización de estos ensayos *in vivo*, ampliaría los alcances de este trabajo permitiendo formular hipótesis que involucren nichos hematopoyéticos *in situ*.

La regulación de la motilidad de las células CD34<sup>+</sup> resulta de gran importancia en la anidación de las CSH a la MO. Las señales intracelulares participantes en esta modulación, como la vía PI3K/Akt, se han propuesto como blanco terapéutico para mejorar la anidación de CSH a la MO. En este trabajo se planteó que el incremento relativo en los niveles de Bmi-1, encontrado en las células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas, suprime la expresión de PTEN, dando como resultado un aumento relativo de la fosforilación de Akt y la motilidad celular (Fig. 59). Sin embargo, en este trabajo no comprobamos la expresión de PTEN en las condiciones de expansión y co-cultivo por lo que este sería el primer paso para la definición de la participación de PTEN en la modulación de la motilidad de las células CD34<sup>+</sup>. El segundo paso sería el silenciamiento de PTEN o de Bmi-1, a través de la transfección de ARNs de interferencia en células expandidas con citoquinas, para valorar la participación directa de estas vías en la motilidad de CSH. Dadas las dificultades para transfectar células primarias, se ha estandarizado previamente esta transfección con el sistema Nucleofector<sup>®</sup>, comparando la motilidad de células transfectadas y no transfectadas. Los ensayos realizados, que no han sido mostrados en este documento, demuestran que la transfección de vectores de expresión de proteína fluorescente verde, no afectan la motilidad basal de las células transfectadas, avalando inicialmente esta evaluación.

Por otra parte, sería interesante establecer si el incremento en la adhesión mediado por VLA-4 y la disminución de la migración mediada por VCAM-1 en las células CD34<sup>+</sup> expandidas con citoquinas, están determinados por la expresión de la molécula VLA-4 en una conformación estructural específica. De igual manera, establecer si el co-cultivo con CSM modifica el estado conformacional de VLA-4 en las células CD34<sup>+</sup> permitiría postular un mecanismo estructural que explicaría la funcionalidad observada.

El presente trabajo además de postular nuevos mecanismos que permiten explicar los avances terapéuticos en la expansión de CSH en co-cultivo con CSM, abre múltiples posibilidades en el estudio de las CSH y los efectos de su expansión en cultivo.

## Referencias

- Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Mönch K, Astrand-Grundström I, Sitnicka E, Sasaki Y, Jacobsen SE. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity*, 2001; 15:659-69.
- Alcorn MJ, Holyoake TL, Richmond L, Pearson C, Farrell E, Kyle B, Dunlop DJ, Fitzsimons E, Steward WP, Pragnell IB, Franklin IM. CD34-positive cells isolated from cryopreserved peripheral-blood progenitor cells can be expanded ex vivo and used for transplantation with little or no toxicity. *J. Clin. Oncol.*, 1996; 14:1839-47.
- Allsopp RC, Weissman IL. Replicative senescence of hematopoietic stem cells during serial transplantation: does telomere shortening play a role? *Oncogene*, 2002; 21:3270-3.
- Andersson O, Hellström-Westas L, Andersson D, Domellöf M. Effect of delayed versus early umbilical cord clamping on neonatal outcomes and iron status at 4 months: a randomised controlled trial. *B.M.J.*, 2011; 343:d7157.
- Ando K, Yahata T, Sato T, Miyatake H, Matsuzawa H, Oki M, Miyoshi H, Tsuji T, Kato S, Hotta T. Direct evidence for ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood*, 2006; 107:3371-7.
- Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell*, 2002; 109:39-45.
- Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, 2004; 118:149-61.
- Asaumi N, Omoto E, Mahmut N, Katayama Y, Takeda K, Shinagawa K, Harada M. Very late antigen-5 and leukocyte function-associated antigen-1 are critical for early stage hematopoietic progenitor cell homing. *Ann Hematol.*, 2001; 80:387-92.
- Avigdor A, Goichberg P, Shvitiel S, Dar A, Peled A, Samira S, Kollet O, HersHKoviz R, Alon R, Hardan I, Ben-Hur H, Naor D, Nagler A, Lapidot T. CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow. *Blood*, 2004; 103:2981-9.
- Ballen KK, Wilson M, Wu J, Ceredona AM, Hsieh C, Stewart FM, Popovsky MA, Quesenberry PJ. Bigger is better: maternal and neonatal predictors of hematopoietic potential of umbilical cord blood units. *Bone Marrow Transplant.*, 2001; 27:7-14.

Basu S, Broxmeyer HE. CCR5 ligands modulate CXCL12-induced chemotaxis, adhesion, and Akt phosphorylation of human cord blood CD34+ cells. *J Immunol.*, 2009; 183:7478-88.

Bauer N, Wilsch-Bräuninger M, Karbanová J, Fonseca AV, Strauss D, Freund D, Thiele C, Huttner WB, Bornhäuser M, Corbeil D. Haematopoietic stem cell differentiation promotes the release of prominin-1/CD133-containing membrane vesicles--a role of the endocytic-exocytic pathway. *EMBO Mol. Med.*, 2011; 3:398-409.

Beals CR, Edwards AC, Gottschalk RJ, Kuijpers TW, Staunton DE. CD18 activation epitopes induced by leukocyte activation. *J. Immunol.*, 2001; 167:6113-22.

Bennaceur-Griscelli A, Pondarré C, Schiavon V, Vainchenker W, Coulombel L. Stromal cells retard the differentiation of CD34(+)CD38(low/neg) human primitive progenitors exposed to cytokines independent of their mitotic history. *Blood*, 2001; 97:435-41.

Berenson RJ, Andrews RG, Bensinger WI, Kalamasz D, Knitter G, Buckner CD, Bernstein ID. Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J. Clin. Invest.*, 1988; 81:951-5.

Bernardo ME, Cometa AM, Locatelli F. Mesenchymal stromal cells: ¿a novel and effective strategy for facilitating engraftment and accelerating hematopoietic recovery after transplantation?. *Bone Marrow Transplant.*, 2011; [Epub ahead of print].

Bock TA. Assay systems for hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells*. 1997; 1:185-95.

Bonig H, Priestley GV, Papayannopoulou T. Hierarchy of molecular-pathway usage in bone marrow homing and its shift by cytokines. *Blood*, 2006; 107:79-86.

Bordeaux-Rego P, Luzo A, Costa FF, Olalla Saad ST, Crosara-Alberto DP. Both interleukin-3 and interleukin-6 are necessary for better ex vivo expansion of CD133+ cells from umbilical cord blood. *Stem Cells Dev.*, 2010; 19:413-22.

Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, 1983; 301:527-30.

Bresnick EH, Lee HY, Fujiwara T, Johnson KD, Keles S. GATA switches as developmental drivers. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285:31087-93.

Briquet A, Dubois S, Bekaert S, Dolhet M, Beguin Y, Gothot A. Prolonged ex vivo culture of human bone marrow mesenchymal stem cells influences their

supportive activity toward NOD/SCID-repopulating cells and committed progenitor cells of B lymphoid and myeloid lineages. *Haematologica*, 2010; 95:47-56.

Broxmeyer HE, Cooper S, Vadhan-Raj S. Cell cycle status of erythroid (BFU-E) progenitor cells from the bone marrows of patients on a clinical trial with purified recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Exp. Hematol.*, 1989; 17:455-9.

Brun AC, Björnsson JM, Magnusson M, Larsson N, Leveén P, Ehinger M, Nilsson E, Karlsson S. Hoxb4-deficient mice undergo normal hematopoietic development but exhibit a mild proliferation defect in hematopoietic stem cells. *Blood*, 2004; 103:4126-33.

Buitenhuis M, Coffey P. The role of the PI3K-PKB signaling module in regulation of hematopoiesis. *Cell Cycle*, 2009; 8:560-6.

Buitenhuis M, van der Linden E, Ulfman LH, Hofhuis FM, Bierings MB, Coffey PJ. Protein kinase B (PKB/c-akt) regulates homing of hematopoietic progenitors through modulation of their adhesive and migratory properties. *Blood*, 2010; 116:2373-84.

Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, Varnum-Finney B, Kobayashi H, Hooper AT, Seandel M, Shido K, White IA, Kobayashi M, Witte L, May C, Shawber C, Kimura Y, Kitajewski J, Rosenwaks Z, Bernstein ID, Rafii S. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010; 6:251-64.

Buza-Vidas N, Duarte S, Luc S, Bouriez-Jones T, Woll PS, Jacobsen SE. GATA3 is redundant for maintenance and self-renewal of hematopoietic stem cells. *Blood*, 2011; 118:1291-3.

Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringham FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 2003; 425:841-6.

Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*, 1980; 56:289-301.

Cerny J, Dooner M, McAuliffe C, Habibian H, Stencil K, Berrios V, Reilly J, Carlson J, Cerny AM, d'Hondt L, Benoit B, Lambert JF, Colvin G, Nilsson S, Becker P, Quesenberry P. Homing of purified murine lymphohematopoietic stem cells: a cytokine-induced defect. *J. Hematother. Stem Cell Res.*, 2002;11:913-22.

Chan JR, Hyduk SJ, Cybulsky MI. Alpha 4 beta 1 integrin/VCAM-1 interaction activates alpha L beta 2 integrin-mediated adhesion to ICAM-1 in human T cells. *J. Immunol.*, 2000;164:746-53.

Chan SL, Choi M, Wnendt S, Kraus M, Teng E, Leong HF, Merchav S. Enhanced in vivo homing of uncultured and selectively amplified cord blood CD34+ cells by cotransplantation with cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Stem Cells*, 2007; 25:529-36.

Chavakis E, Urbich C, Dimmeler S. Homing and engraftment of progenitor cells: a prerequisite for cell therapy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2008; 45:514-22.

Chen BP, Galy A, Kyoizumi S, Namikawa R, Scarborough J, Webb S, Ford B, Cen DZ, Chen SC. Engraftment of human hematopoietic precursor cells with secondary transfer potential in SCID-hu mice. *Blood*, 1994; 84:2497-505.

Chen CZ, Li M, de Graaf D, Monti S, Göttgens B, Sanchez MJ, Lander ES, Golub TR, Green AR, Lodish HF. Identification of endoglin as a functional marker that defines long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2002; 99:15468-73.

Chigaev A, Blenc AM, Braaten JV, Kumaraswamy N, Kepley CL, Andrews RP, Oliver JM, Edwards BS, Prossnitz ER, Larson RS, Sklar LA. Real time analysis of the affinity regulation of alpha 4-integrin. The physiologically activated receptor is intermediate in affinity between resting and Mn(2+) or antibody activation. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276:48670-8.

Chigaev A, Waller A, Amit O, Halip L, Bologa CG, Sklar LA. Real-time analysis of conformation-sensitive antibody binding provides new insights into integrin conformational regulation. *J Biol. Chem.*, 2009;284:14337-46.

Chigaev A, Zwartz G, Graves SW, Dwyer DC, Tsuji H, Foutz TD, Edwards BS, Prossnitz ER, Larson RS, Sklar LA. Alpha4beta1 integrin affinity changes govern cell adhesion. *J. Biol. Chem.*, 2003;278:38174-82.

Christensen JL, Wright DE, Wagers AJ, Weissman IL. Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells. *PLOS. Biol.*, 2004; 2:E75.

Chuang KP, Huang YF, Hsu YL, Liu HS, Chen HC, Shieh CC. Ligation of lymphocyte function-associated antigen-1 on monocytes decreases very late antigen-4-mediated adhesion through a reactive oxygen species-dependent pathway. *Blood*, 2004; 104:4046-53.

Chung CY, Funamoto S, Firtel RA. Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. *Trends Biochem. Sci.*, 2001; 26, 557–566

Chute JP, Saini AA, Chute DJ, Wells MR, Clark WB, Harlan DM, Park J, Stull MK, Civin C, Davis TA. Ex vivo culture with human brain endothelial cells increases the SCID-repopulating capacity of adult human bone marrow. *Blood*, 2002; 100:4433-9.

Civin CI, Almeida-Porada G, Lee MJ, Olweus J, Terstappen LW, Zanjani ED. Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells in vivo. *Blood*, 1996; 88:4102-9.

Cluitmans FH, Esendam BH, Landegent JE, Willemze R, Falkenburg JH. Constitutive in vivo cytokine and hematopoietic growth factor gene expression in the bone marrow and peripheral blood of healthy individuals. *Blood*, 1995; 85:2038-44.

Cormier F, Dieterlen-Lièvre F. The wall of the chick embryo aorta harbours M-CFC, G-CFC, GM-CFC and BFU-E. *Development*, 1988; 102:279-85.

Cornejo MG, Mabialah V, Sykes SM, Khandan T, Lo Celso C, Lopez CK, Rivera-Muñoz P, Rameau P, Tothova Z, Aster JC, DePinho RA, Scadden DT, Gilliland DG, Mercher T. Crosstalk between NOTCH and AKT signaling during murine megakaryocyte lineage specification. *Blood*, 2011; 118:1264-73.

Cumano A, Ferraz JC, Klaine M, Di Santo JP, Godin I. Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution. *Immunity*, 2001; 15:477-85.

D'Alessio F, Mirabelli P, Gorrese M, Scalia G, Gemei M, Mariotti E, Di Noto R, Martinelli P, Fortunato G, Paladini D, Del Vecchio L. Polychromatic flow cytometry analysis of CD34+ hematopoietic stem cells in cryopreserved early preterm human cord blood samples. *Cytometry*, 2011; 79:14-24.

Danet GH, Lee HW, Luongo JL, Simon MC, Bonnet DA. Dissociation between stem cell phenotype and NOD/SCID repopulating activity in human peripheral blood CD34(+) cells after ex vivo expansion. *Exp. Hematol.*, 2001; 29:1465-73.

de Wynter EA, Coutinho LH, Pei X, Marsh JC, Hows J, Luft T, Testa NG. Comparison of purity and enrichment of CD34+ cells from bone marrow, umbilical cord and peripheral blood (primed for apheresis) using five separation systems. *Stem Cells*, 1995; 13:524-32.

de Wynter EA, Ryder D, Lanza F, Nadali G, Johnsen H, Denning-Kendall P, Thing-Mortensen B, Silvestri F, Testa NG. Multicentre European study comparing selection techniques for the isolation of CD34+ cells. *Bone Marrow Transplant.*, 1999; 23:1191-6.

Delalat B, Pourfathollah AA, Soleimani M, Mozdarani H, Ghaemi SR, Movassaghpour AA, Kaviani S. Isolation and ex vivo expansion of human umbilical cord blood-derived CD34+ stem cells and their cotransplantation with or without mesenchymal stem cells. *Hematology*, 2009; 14:125-32.

Denning-Kendall P, Singha S, Bradley B, Hows J. Cytokine expansion culture of cord blood CD34+ cells induces marked and sustained changes in adhesion receptor and CXCR4 expressions. *Stem Cells*, 2003; 21:61-70.

Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J. Cell Physiol.*, 1977; 91:335-44.

Dieterlen-Lievre F. On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 1975; 33:607-19.

Dimitroff CJ, Lee JY, Rafii S, Fuhlbrigge RC Sackstein S. CD44 is a major selectin ligand on human hematopoietic progenitor cells. *J. Cell Biol.*, 2001; 153:1277-86.

Domen J, Cheshier SH, Weissman IL. The role of apoptosis in the regulation of hematopoietic stem cells: overexpression of BCL-2 increases both their number and repopulation potential. *J. Exp. Med.*, 2000; 191:253-64.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006; 8:315-7.

Donaldson C, Armitage WJ, Laundry V, Barron C, Buchanan R, Webster J, Bradley B, Hows J. Impact of obstetric factors on cord blood donation for transplantation. *Br. J. Haematol.*, 1999; 106:128-32.

Dooner M, Cerny J, Colvin G, Demers D, Pimentel J, Greer D, Abedi M, McAuliffe C, Quesenberry P. Homing and conversion of murine hematopoietic stem cells to lung. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2004;32:47-51.

Dorrell C, Gan OI, Pereira DS, Hawley RG, Dick JE. Expansion of human cord blood CD34(+)CD38(-) cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function. *Blood*, 2000; 95:102-10.

David G, Rao SG. Ex vivo expansion of stem cells from umbilical cord blood: expression of cell adhesion molecules. *Stem Cells*, 2002; 20:183-9.

Drbal K, Angelisová P, Cerný J, Hilgert I, Horejsí V. A novel anti-CD18 mAb recognizes an activation-related epitope and induces a high-affinity conformation in leukocyte integrins. *Immunobiology*, 2001; 203:687-98.

Driessen RL, Johnston HM, Nilsson SK. Membrane-bound stem cell factor is a key regulator in the initial lodgment of stem cells within the endosteal marrow region. *Exp. Hematol.*, 2003; 31:1284-91.

El-Badri NS, Wang BY, Cherry, Good RA. Osteoblasts promote engraftment of allogeneic hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.*, 1998; 26:110-6.

Epstein RB, Storb R, Ragde H, Thomas ED. Cytotoxic typing antisera for marrow grafting in littermate dogs. *Transplantation*, 1968; 6:45-58.

Ezine S, Weissman IL, Rouse RV. Bone marrow cells give rise to distinct cell clones within the thymus. *Nature*, 1984; 309:629-31.

Fei XM, Wu YJ, Chang Z, Miao KR, Tang YH, Zhou XY, Wang LX, Pan QQ, Wang CY. Co-culture of cord blood CD34(+) cells with human BM mesenchymal stromal cells enhances short-term engraftment of cord blood cells in NOD/SCID mice. *Cytherapy*, 2007; 9:338-47.

Fernández-Sánchez V, Pelayo R, Flores-Guzmán P, Flores-Figueroa E, Villanueva-Toledo J, Garrido E, Ruiz-Sánchez E, Alvarez-Sanchez E, Mayani H. In vitro effects of stromal cells expressing different levels of Jagged-1 and Delta-1 on the growth of primitive and intermediate CD34(+) cell subsets from human cord blood. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2011; 47:205-13.

Fibbe WE, Noort WA, Schipper F, Willemze R. Ex vivo expansion and engraftment potential of cord blood-derived CD34+ cells in NOD/SCID mice. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2001; 938:9-17.

Fleming WH, Alpern EJ, Uchida N, Ikuta K, Spangrude GJ, Weissman IL. Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells. *J. Cell Biol.*, 1993; 122:897-902.

Foguenne J, Di Stefano I, Giet O, Beguin Y, Gothot A. Ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells is associated with downregulation of alpha4 integrin- and CXCR4-mediated engraftment in NOD/SCID beta2-microglobulin-null mice. *Haematologica*, 2009; 94:185-94.

Foguenne J, Huygen S, Greimers R, Beguin Y, Gothot A. Modulation of homing properties of primitive progenitor cells generated by ex vivo expansion. *Haematologica*, 2005; 90:445-51.

Freise KJ, Schmidt RL, Gingerich EL, Veng-Pedersen P, Widness JA. The effect of anticoagulant, storage temperature and dilution on cord blood hematology parameters over time. *Int. J. Lab. Hematol.*, 2009; 31:496-504.

Frenette PS, Subbarao S, Mazo IB, von Andrian UH, Wagner DD. Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1998; 95:14423-8.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.*, 1970; 3:393-403.

Fukuda S, Broxmeyer HE, Pelus LM. Flt3 ligand and the Flt3 receptor regulate hematopoietic cell migration by modulating the SDF-1alpha(CXCL12)/CXCR4 axis. *Blood*, 2005; 105:3117-26.

Gao Z, Fackler MJ, Leung W, Lumkul R, Ramirez M, Theobald N, Malech HL, Civin CI. Human CD34+ cell preparations contain over 100-fold greater NOD/SCID mouse engrafting capacity than do CD34- cell preparations. *Exp. Hematol.*, 2001; 29:910-21.

Gasparoni A, Ciardelli L, Avanzini MA, Bonfichi M, di Mario M, Piazzini G, Martinotti L, Vanelli L, Rondini G, Chirico G. Immunophenotypic changes of fetal cord blood hematopoietic progenitor cells during gestation. *Pediatr. Res.*, 2000; 47:825-9.

Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet*, 1968; 2:1366-9.

Giebel B, Corbeil D, Beckmann J, Höhn J, Freund D, Giesen K, Fischer J, Kögler G, Wernet P. Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 2004; 104:2332-8.

Giet O, Huygen S, Beguin Y, Gothot A. Cell cycle activation of hematopoietic progenitor cells increases very late antigen-5-mediated adhesion to fibronectin. *Exp. Hematol.* 2001; 29:515-24.

Glauche I, Moore K, Thielecke L, Horn K, Loeffler M, Roeder I. Stem cell proliferation and quiescence--two sides of the same coin. *PLOS Comput. Biol.*, 2009; 5:e1000447.

Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, 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 a HLA identical sibling. *N. Engl. J. Med.*, 1989; 321:1174-8.

Gluckman E, Devergie A, Thierry D, Esperou-Bourdeau H, Traineau R, Gerrota J, Brossard Y, van Niffterik J, Benbunan M. Clinical applications of stem cell transfusion from cord blood and rationale for cord blood banking. *Bone Marrow Transplant.*, 1992; 9:114-7.

Goldfinger LE, Han J, Kiosses WB, Howe AK, Ginsberg MH. Spatial restriction of alpha4 integrin phosphorylation regulates lamellipodial stability and alpha4beta1-dependent cell migration. *J. Cell. Biol.*, 2003; 162:731-41..

Gothot A, Giet O, Huygen S, Beguin Y. Binding and migration across fibronectin and VCAM-1 of cycling hematopoietic progenitor cells. *Leuk. Lymphoma*, 2003; 44:1379-83.

Götze KS, Schiemann M, Marz S, Jacobs VR, Debus G, Peschel C, Oostendorp RA. CD133-enriched CD34(-) (CD33/CD38/CD71)(-) cord blood cells acquire CD34 prior to cell division and hematopoietic activity is exclusively associated with CD34 expression. *Exp. Hematol.*, 2007; 35:1408-14.

Guenechea G, Segovia JC, Albella B, Lamana M, Ramírez M, Regidor C, Fernández MN, Bueren JA. Delayed engraftment of nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice transplanted with ex vivo-expanded human CD34(+) cord blood cells. *Blood*, 1999; 93:1097-105.

Guo BH, Feng Y, Zhang R, Xu LH, Li MZ, Kung HF, Song LB, Zeng MS. Bmi-1 promotes invasion and metastasis, and its elevated expression is correlated with an advanced stage of breast cancer. *Mol. Cancer*, 2011;10:e10.

Hassall O, Maitland K, Fegan G, Thitiri J, Pole L, Mwakesi R, Denje D, Wambua K, Mandaliya K, Bates I. The quality of stored umbilical cord and adult-donated whole blood in Mombasa, Kenya. *Transfusion*, 2010; 50:611-6.

Herrera C, Sánchez J, Torres A, Bellido C, Rueda A, Alvarez MA. Early-acting cytokine-driven ex vivo expansion of mobilized peripheral blood CD34+ cells generates post-mitotic offspring with preserved engraftment ability in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Br. J. Haematol.*, 2001; 114:920-30.

Hidalgo A, Sanz-Rodríguez F, Rodríguez-Fernández JL, Albella B, Blaya C, Wright N, Cabañas C, Prósper F, Gutierrez-Ramos JC, Teixidó J. Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.*, 2001; 29:345-55.

Hirsch E, Iglesias A, Potocnik AJ, Hartmann U, Fässler R. Impaired migration but not differentiation of haematopoietic stem cells in the absence of beta1 integrins. *Nature*, 1996; 380:171-5.

Hiwase SD, Dyson PG, To LB, Lewis ID. Cotransplantation of placental mesenchymal stromal cells enhances single and double cord blood engraftment in nonobese diabetic/severe combined immune deficient mice. *Stem Cells*, 2009; 27:2293-300.

Hofmeister CC, Zhang J, Knight KL, Le P, Stiff PJ. Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche. *Bone Marrow Transplant.*, 2007; 39:11-23.

Hogan CJ, Shpall EJ, Keller G. Differential long-term and multilineage engraftment potential from subfractions of human CD34+ cord blood cells transplanted into NOD/SCID mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 2002; 99:413-8.

Holyoake TL, Alcorn MJ, Richmond L, Farrell E, Pearson C, Green R, Dunlop DJ, Fitzsimons E, Pragnell IB, Franklin IM. CD34 positive PBPC expanded ex vivo may not provide durable engraftment following myeloablative chemoradiotherapy regimens. *Bone Marrow Transplant.*, 1997; 19:1095-101.

Holyoake TL, Nicolini FE, Eaves CJ. Functional differences between transplantable human hematopoietic stem cells from fetal liver, cord blood, and adult marrow. *Exp Hematol.* 1999; 27:1418-27.

Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells.*, 2006; 24:1030-41.

Hosen N, Yamane T, Muijtjens M, Pham K, Clarke MF, Weissman IL. Bmi-1-green fluorescent protein-knock-in mice reveal the dynamic regulation of bmi-1 expression in normal and leukemic hematopoietic cells. *Stem Cells*, 2007; 25:1635-44.

Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, Iwasaki H, Nakamura Y, Gomei Y, Suda T. Knockdown of N-cadherin suppresses the long-term engraftment of hematopoietic stem cells. *Blood*, 2010; 116:554-63.

Hows JM, Marsh JC, Bradley BA, Luft T, Coutinho L, Testa NG, Dexter TM. Human cord blood: ¿a source of transplantable stem cells? *Bone Marrow Transplant.*, 1992; 9:105-8.

Huang GP, Pan ZJ, Jia BB, Zheng Q, Xie CG, Gu JH, McNiece IK, Wang JF. Ex vivo expansion and transplantation of hematopoietic stem/progenitor cells supported by mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *Cell Transplant.*, 2007; 16:579-85.

Huygen S, Giet O, Artisien V, Di Stefano I, Beguin Y, Gothot A. Adhesion of synchronized human hematopoietic progenitor cells to fibronectin and vascular

cell adhesion molecule-1 fluctuates reversibly during cell cycle transit in ex vivo culture. *Blood*, 2002; 15; 100:2744-52.

Huyhn A, Dommergues M, Izac B, Croisille L, Katz A, Vainchenker W, Coulombel L. Characterization of hematopoietic progenitors from human yolk sacs and embryos. *Blood*, 1995; 86:4474-85.

Ivanović Z, Bartolozzi B, BeRNAbai PA, Cipolleschi MG, Milenkovic P, Praloran V, DelloSbarba P. A simple, one-step clonal assay allows the sequential detection of committed (CFU-GM-like) progenitors and several subsets of primitive (HPP-CFC) murine progenitors. *Stem Cells*, 1999; 17:219-25.

Iwama A, Oguro H, Negishi M, Kato Y, Morita Y, Tsukui H, Ema H, Kamijo T, Katoh-Fukui Y, Koseki H, van Lohuizen M, Nakauchi H. Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1. *Immunity*, 2004; 21:843-51.

Jaatinen T, Laine J. Isolation of hematopoietic stem cells from human cord blood. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.*, 2007; Chapt. 2: Unit 2A.2.

Jacobsen K, Kravitz J, Kincade PW, Osmond DG. Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: in vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma-irradiated mice. *Blood*, 1996; 87:73-82.

Jakubowski A, Rosa MD, Bixler S, Lobb R, Burkly LC. Vascular cell adhesion molecule (VCAM)-Ig fusion protein defines distinct affinity states of the very late antigen-4 (VLA-4) receptor. *Cell Adhes. Commun.*, 1995; 3:131-42.

Jang YK, Jung DH, Jung MH, Kim DH, Yoo KH, Sung KW, Koo HH, Oh W, Yang YS, Yang SE. Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Ann. Hematol.*, 2006; 85:212-25.

Jaroscak J, Goltry K, Smith A, Waters-Pick B, Martin PL, Driscoll TA, Howrey R, Chao N, Douville J, Burhop S, Fu P, Kurtzberg J. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the Aastrom Replicell System. *Blood*. 2003; 101:5061-7.

Jetmore A, Plett PA, Tong X, Wolber FM, Breese R, Abonour R, Orschell-Traycoff CM, Srour EF. Homing efficiency, cell cycle kinetics, and survival of quiescent and cycling human CD34(+) cells transplanted into conditioned NOD/SCID recipients. *Blood*, 2002; 99:1585-93.

Jo DY, Ralfi S, Hamada T, Moore MA. Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stromal cell-derived factor-1. *J Clin Invest.*, 2000; 105:101-11.

Johnsen HE, Baech J, Nicolaisen K. Validation of the Nordic flow cytometry standard for CD34+ cell enumeration in blood and autografts: report from the third workshop. *J. Hematother.*, 1999; 8:15-2.

Johnson GR, Moore MA. Role of stem cell migration in initiation of mouse foetal liver haemopoiesis. *Nature*, 1975; 258:726-8.

Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology*, 2008; 47:126-31.

Jönsson JI, Xiang Z, Pettersson M, Lardelli M, Nilsson G. Distinct and regulated expression of Notch receptors in hematopoietic lineages and during myeloid differentiation. *Eur J Immunol.*, 2001; 31:3240-7.

Jordan ET, Collins M, Terefe J, Ugozzoli L, Rubio T. Optimizing electroporation conditions in primary and other difficult-to-transfect cells. *J. Biomol. Tech.*, 2008;19:328-34.

Jung Y, Wang J, Havens A, Sun Y, Wang J, Jin T, Taichman RS. Cell-to-cell contact is critical for the survival of hematopoietic progenitor cells on osteoblasts. *Cytokine*, 2005; 32:155-62.

Jung Y, Wang J, Schneider A, Sun YX, Koh-Paige AJ, Osman NI, McCauley LK, Taichman RS. Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone*, 2006; 38:497-508.

Kavanagh DP, Kalia N. Hematopoietic stem cell homing to injured tissues. *Stem Cell Rev.*, 2011;7:672-82.

Kawada H, Ando K, Tsuji T, Shimakura Y, Nakamura Y, Chargui J, Hagihara M, Itagaki H, Shimizu T, Inokuchi S, Kato S, Hotta T. Rapid ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitors using a novel culture system. *Exp. Hematol.*, 1999; 27:904-15.

Kawashima I, Zanjani ED, Almada-Porada G, Flake AW, Zeng H, Ogawa M. CD34+ human marrow cells that express low levels of Kit protein are enriched for long-term marrow-engrafting cells. *Blood*, 1996; 87:4136-42.

Kekarainen T, Mannelin S, Laine J, Jaatinen T. Optimization of immunomagnetic separation for cord blood-derived hematopoietic stem cells. *BMC Cell Biol.*, 2006; 7:30e.

Kelly SS, Sola CB, de Lima M, Shpall E. Ex vivo expansion of cord blood. *Bone Marrow Transplant.*, 2009; 44:673-81.

Kiel MJ, Acar M, Radice GL, Morrison SJ. Hematopoietic stem cells do not depend on N-cadherin to regulate their maintenance. *Cell Stem Cell*, 2009; 4:170-9.

Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008; 8:290-301.

Kiel MJ, Radice GL, Morrison SJ. Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance. *Cell Stem Cell*, 2007; 1:204-17.

Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*, 2005; 121:1109-21.

Kim I, Kim YJ, Métais JY, Dunbar CE, Larochelle A. Transient silencing of PTEN in human CD34(+) cells enhances their proliferative potential and ability to engraft immunodeficient mice. *Exp. Hematol.*, 2012; 40:84-91.

Kobayashi H, Butler JM, O'Donnell R, Kobayashi M, Ding BS, Bonner B, Chiu VK, Nolan DJ, Shido K, Benjamin L, Rafii S. Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat. Cell Biol.*, 2010; 12:1046-56.

Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J. Clin. Oncol.*, 2000; 18:307-16.

Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Shmelkov SV, Ramos CA, Zhang F, Rafii S. Tie2 activation contributes to hemangiogenic regeneration after myelosuppression. *Blood*, 2005; 106:505-13.

Kurtzberg J. Umbilical cord blood: a novel alternative source of hematopoietic stem cells for bone marrow transplantation. *J. Hematother.*, 1996; 5:95-6.

Labastie MC, Cortés F, Roméo PH, Dulac C, Péault B. Molecular identity of hematopoietic precursor cells emerging in the human embryo. *Blood*, 1998; 92:3624-35.

Lam BS, Adams GB. Hematopoietic stem cell lodgment in the adult bone marrow stem cell niche. *Int. J. Lab. Hematol.*, 2010; 32:551-8.

Lanza F, Campioni D, Moretti S, Dominici M, Punturieri M, Focarile E, Pauli S, Dabusti M, Tieghi A, Bacilieri M, Scapoli C, De Angeli C, Galluccio L, Castoldi G.

CD34(+) cell subsets and long-term culture colony-forming cells evaluated on both autologous and normal bone marrow stroma predict long-term hematopoietic engraftment in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Exp. Hematol.*, 2001; 29:1484-93.

Lanza F, Healy L, Sutherland DR. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 2001; 15:1-13.

Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JC, Bhatia M, Lapidot T, Moritz T, Murdoch B, Xiao XL, Kato I, Williams DA, Dick JE. Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat. Med.*, 1996; 2:1329-37.

Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang MJ, Champlin RE, Stevens C, Barker JN, Gale RP, Lazarus HM, Marks DI, van Rood JJ, Scaradavou A, Horowitz MM. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2004; 351:2265-75.

Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, Shpall EJ, McCarthy P, Atkinson K, Cooper BW, Gerson SL, Laughlin MJ, Loberiza FR Jr, Moseley AB, Bacigalupo A. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2005; 11:389-98.

Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, Remberger M, Sundberg B, Arvidson J, Ljungman P, Lönnies H, Nava S, Ringdén O. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia*, 2007; 21:1733-8.

Lecchi L, Perego L, Garcea F, Ratti I, Brasca M, Dotti D, Cimoni S, Pezzali I, Celeste T, Giovanelli S, Butti B, De Fazio N, Lopa R, Rebullia P. Ten-year quality control of a semiautomated procedure of cord blood unit volume reduction. *Transfusion*, 2009; 49:563-9.

Lee KY, Fong BS, Tsang KS, Lau TK, Ng PC, Lam AC, Chan KY, Wang CC, Kung HF, Li CK, Li K. Fetal stromal niches enhance human embryonic stem cell-derived hematopoietic differentiation and globin switch. *Stem Cells Dev.*, 2011; 20:31-8.

Lee ST, Maeng H, Chwae YJ, Oh DJ, Kim YM, Yang WI. Effect of mesenchymal stem cell transplantation on the engraftment of human hematopoietic stem cells and leukemic cells in mice model. *Int. J. Hematol.*, 2008; 87:327-37.

Lemischka IR, Moore KA. Stem cells: interactive niches. *Nature*, 2003; 425:778-9.

Lessard J, Baban S, Sauvageau G. Stage-specific expression of polycomb group genes in human bone marrow cells. *Blood*, 1998; 91:1216-24.

Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*, 2003; 423:255-60.

Li N, Feugier P, Serrurier B, Latger-Cannard V, Lesesve JF, Stoltz JF, Eljaafari A. Human mesenchymal stem cells improve ex vivo expansion of adult human CD34+ peripheral blood progenitor cells and decrease their allostimulatory capacity. *Exp. Hematol.*, 2007; 35:507-15.

Lichterfeld M, Martin S, Burkly L, Haas R, Kronenwett R. Mobilization of CD34+ haematopoietic stem cells is associated with a functional inactivation of the integrin very late antigen 4. *Br. J. Haematol.*, 2000; 110:71-81.

Lidington EA, Moyes DL, McCormack AM, Rose ML. A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. *Transpl. Immunol.*, 1999; 7:239-46.

Liu LQ, Sposato M, Liu HY, Vaudrain T, Shi MJ, Rider K, Stevens Z, Visser J, Deng HK, Kraus M. Functional cloning of IGFBP-3 from human microvascular endothelial cells reveals its novel role in promoting proliferation of primitive CD34+CD38- hematopoietic cells in vitro. *Oncol. Res.*, 2003; 13:359-71.

Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1951; 12:197-201.

Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1998; 95:9448-53.

Ma Q, Shimaoka M, Lu C, Jing H, Carman CV, Springer TA. Activation-induced conformational changes in the I-domain region of lymphocyte function-associated antigen 1. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277:10638-41.

Magnon C, Frenette PS. Hematopoietic stem cell trafficking. *Stem Book*, 2008.

Maillard I, Koch U, Dumortier A, Shestova O, Xu L, Sai H, Pross SE, Aster JC, Bhandoola A, Radtke F, Pear WS. Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008; 2:356-66.

Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell*, 2007; 1:635-45.

Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J. Cell Physiol.*, 1998; 176:57-66.

Mancini SJ, Mantei N, Dumortier A, Suter U, MacDonald HR, Radtke F. Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood*, 2005; 105:2340-2.

Mañes S, Mira E, Gómez-Mouton C, Zhao ZJ, Lacalle RA, Martínez-A C. Concerted activity of tyrosine phosphatase SHP-2 and focal adhesion kinase in regulation of cell motility. *Mol. Cell Biol.*, 1999; 19:3125-35.

Matsui Y, Zsebo KM, Hogan BL. Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit. *Nature*, 1990; 347:667-9.

Matsumoto K, Yasui K, Yamashita N, Horie Y, Yamada T, Tani Y, Shibata H, Nakano T. In vitro proliferation potential of AC133 positive cells in peripheral blood. *Stem Cells*, 2000;18:196-203.

Mayani H, Lansdorp PM. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells*, 1998; 16:153-65.

Mazo IB, Massberg S, von Andrian UH. Hematopoietic stem and progenitor cell trafficking. *Trends Immunol.*, 2011; 32:493-503.

Mazo IB, Quackenbush EJ, Lowe JB, von Andrian UH. Total body irradiation causes profound changes in endothelial traffic molecules for hematopoietic progenitor cell recruitment to bone marrow. *Blood*, 2002; 99:4182-91.

Mazo IB, von Andrian UH. Adhesion and homing of blood-borne cells in bone marrow microvessels. *J. Leukoc. Biol.*, 1999; 66:25-32.

McGrath KE, Koniski AD, Maltby KM, McGann JK, Palis J. Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4. *Dev. Biol.*, 1999; 213:442-56.

McNiece IK, Bertoncello I, Kriegler AB, Quesenberry PJ. Colony-forming cells with high proliferative potential (HPP-CFC). *Int. J. Cell Cloning*, 1990; 8:146-60.

McNiece IK, Stewart FM, Deacon DM, Temeles DS, Zsebo KM, Clark SC, Quesenberry PJ. Detection of a human CFC with a high proliferative potential. *Blood*, 1989; 74:609-12.

Medvinsky A, Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*, 1996; 86:897-906.

Mendes SC, Robin C, Dzierzak E. Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny. *Development*, 2005; 132:1127-36.

Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, 2010; 466:829-34.

Milner LA, Bigas A. Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood*, 1999; 93:2431-48.

Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 1990; 11:231-8.

Minegishi N, Ohta J, Yamagiwa H, Suzuki N, Kawauchi S, Zhou Y, Takahashi S, Hayashi N, Engel JD, Yamamoto M. The mouse GATA-2 gene is expressed in the para-aortic splanchnopleura and aorta-gonads and mesonephros region. *Blood*, 1999; 93:4196-207.

Minegishi N, Suzuki N, Yokomizo T, Pan X, Fujimoto T, Takahashi S, Hara T, Miyajima A, Nishikawa S, Yamamoto M. Expression and domain-specific function of GATA-2 during differentiation of the hematopoietic precursor cells in midgestation mouse embryos. *Blood*, 2003; 102:896-905.

Miyake K, Weissman IL, Greenberger JS, Kincade PW. Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. *J. Exp. Med.*, 1991; 173:599-607.

Möbest D, Goan SR, Junghahn I, Winkler J, Fichtner I, Hermann M, Becker M, de Lima-Hahn E, Henschler R. Differential kinetics of primitive hematopoietic cells assayed in vitro and in vivo during serum-free suspension culture of CD34+ blood progenitor cells. *Stem Cells*, 1999; 17:152-61.

Moore MA, Metcalf D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br. J. Haematol.*, 1970; 18:279-96.

Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*, 1994; 1:661-73.

Mourcin F, Grenier N, Mayol JF, Lataillade JJ, Sotto JJ, Hérodin F, Drouet M. Mesenchymal stem cells support expansion of in vitro irradiated CD34(+) cells in the presence of SCF, FLT3 ligand, TPO and IL3: potential application to autologous cell therapy in accidentally irradiated victims. *Radiat Res.*, 2005; 164:1-9.

Müller-Hermelink HK, Gülden M, Bathmann R. Restitution of the thymus in lethally irradiated mice after transplantation of syngeneic or allogeneic bone marrow. *Immunobiology*, 1984; 167:462-82.

Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 1996; 382:635-8.

Nielsen JS, McNagny KM. CD34 is a key regulator of hematopoietic stem cell trafficking to bone marrow and mast cell progenitor trafficking in the periphery. *Microcirculation*, 2009; 16:487-96.

Nilsson SK, Dooner MS, Quesenberry PJ. Synchronized cell-cycle induction of engrafting long-term repopulating stem cells. *Blood*, 1997; 90:4646-50.

Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, Kruger M, van Bezooijen RL, de Paus RA, Heemskerk MH, Löwik CW, Falkenburg JH, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp. Hematol.*, 2002; 30:870-8.

Notta F, Doulatov S, Dick JE. Engraftment of human hematopoietic stem cells is more efficient in female NOD/SCID/IL-2R $\gamma$ c-null recipients. *Blood*, 2010; 115:3704-7.

Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poeppl A, Jurisica I, Dick JE. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science*, 2011; 333:218-21.

Ohishi K, Varnum-Finney B, Bernstein ID. The notch pathway: modulation of cell fate decisions in hematopoiesis. *Int. J. Hematol.*, 2002; 75:449-59.

Okuno Y, Huettner CS, Radomska HS, Petkova V, Iwasaki H, Akashi K, Tenen DG. Distal elements are critical for human CD34 expression in vivo. *Blood*, 2002; 100:4420-6.

Orschell-Traycoff CM, Hiatt K, Dagher RN, Rice S, Yoder MC, Srour EF. Homing and engraftment potential of Sca-1(+)lin(-) cells fractionated on the basis of adhesion molecule expression and position in cell cycle. *Blood*, 2000; 96:1380-7.

Oshima M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Nakajima-Takagi Y, Sugiyama F, Koseki H, Kyba M, Iwama A, Osawa M. Genome-wide analysis of target genes regulated by HoxB4 in hematopoietic stem and progenitor cells developing from embryonic stem cells. *Blood*, 2011; 117:e142-50.

Pafumi C, Milone G, Maggi I, Russo A, Farina M, Pernicone G, Bandiera S, Giardina P, Mangiafico L, Mancari R, Calogero AE, Cianci A. Early clamping of umbilical cord blood and foetal CD34 enrichment. *Acta Med. Austriaca*, 2001; 28:141-4.

Page KM, Zhang L, Mendizabal A, Wease S, Carter S, Gentry T, Balber AE, Kurtzberg J. Total colony-forming units are a strong, independent predictor of neutrophil and platelet engraftment after unrelated umbilical cord blood transplantation: a single-center analysis of 435 cord blood transplants. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2011; 17:1362-74.

Papayannopoulou T, Craddock C, Nakamoto B, Priestley GV, Wolf NS. The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1995; 92:9647-51.

Papayannopoulou T, Nakamoto B. Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 1993; 90:9374-8.

Papayannopoulou T, Priestley GV, Nakamoto B, Zafiropoulos V, Scott LM. Molecular pathways in bone marrow homing: dominant role of alpha(4)beta(1) over beta(2)-integrins and selectins. *Blood*, 2001; 98:2403-11.

Papayannopoulou T, Priestley GV, Nakamoto B. Anti-VLA4/VCAM-1---induced mobilization requires cooperative signaling through the kit/mkit ligand pathway. *Blood*, 1998; 91:2231-9.

Park IK, Morrison SJ, Clarke MF. Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J. Clin. Invest.*, 2004; 113:175-9.

Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL, Morrison SJ, Clarke MF. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature*, 2003; 423:302-5.

Passegué E, Wagers AJ. Regulating quiescence: new insights into hematopoietic stem cell biology. *Dev. Cell.*, 2006; 10:415-7.

Pedro Z. Andrade, Francisco dos Santos, Graça Almeida-Porada, Cláudia Lobato da Silva and Joaquim M. S. Cabral. Systematic delineation of optimal cytokine concentrations to expand hematopoietic stem/progenitor cells in co-culture with mesenchymal stem cells. *Mol. BioSyst.*, 2010; 6:1207-1215

Peirson SN, Butler JN, Foster RG. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res.*, 2003; 31:e73.

Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, Petit I, Franitza S, Grabovsky V, Slav MM, Nagler A, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*, 2000; 95:3289-96.

Pellegatta F, Radaelli A, Ferrero E, Toninelli E, Vidal MJ, Chierchia SL, et al. Inducible nitric oxide synthase modulates fibronectin production in the EA.hy926 cell line and cultured human umbilical vein endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1994; 24:1014-19

Perdomo-Arciniegas AM, Vernot JP. Co-culture of hematopoietic stem cells with mesenchymal stem cells increases VCAM-1-dependent migration of primitive hematopoietic stem cells. *Int. J. Hematol.* 2011;94:525-32.

Perdomo-Arciniegas AM, Vernot JP. Optimised cord blood sample selection for small-scale CD34+ cell immunomagnetic isolation. *Mol. Med. Report.*, 2012; 5:749-52.

Pevny L, Lin CS, D'Agati V, Simon MC, Orkin SH, Costantini F. Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development*, 1995; 121:163-72.

Pietras EM, Warr MR, Passegué E. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *J. Cell. Biol.*, 2011; 195:709-20.

Ploemacher RE, Brons RH. Separation of CFU-S from primitive cells responsible for reconstitution of the bone marrow hemopoietic stem cell compartment following irradiation: evidence for a pre-CFU-S cell. *Exp. Hematol.*, 1989; 17:263-6.

Porter JC, Hogg N. Integrin cross talk: activation of lymphocyte function-associated antigen-1 on human T cells alters alpha4beta1- and alpha5beta1-function. *J. Cell Biol.*, 1997; 138:1437-47.

Potocnik AJ, Brakebusch C, Fässler R. Fetal and adult hematopoietic stem cells require beta1 integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow. *Immunity*, 2000; 12:653-63.

Prosper F, Stroncek D, Verfaillie CM. Phenotypic and functional characterization of long-term culture-initiating cells present in peripheral blood progenitor collections of normal donors treated with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, 1996; 88:2033-42.

Puri KD, Finger EB, Gaudernack G, Springer TA. Sialomucin CD34 is the major L-selectin ligand in human tonsil high endothelial venules. *J. Cell Biol.*, 1995; 131:261-70.

Qian H, Georges-Labouesse E, Nyström A, Domogatskaya A, Tryggvason K, Jacobsen SE, Ekblom M. Distinct roles of integrins alpha6 and alpha4 in homing of fetal liver hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 2007; 110:2399-407.

Qian H, Tryggvason K, Jacobsen SE, Ekblom M. Contribution of alpha6 integrins to hematopoietic stem and progenitor cell homing to bone marrow and collaboration with alpha4 integrins. *Blood*, 2006; 107:3503-10.

Radtko F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald HR, Aguet M. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity*, 1999; 10:547-58.

Ramírez M, Segovia JC, Benet I, Arbona C, Güenechea G, Blaya C, García-Conde J, Bueren JA, Prosper F. Ex vivo expansion of umbilical cord blood (UCB) CD34(+) cells alters the expression and function of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins. *Br. J. Haematol.*, 2001; 115:213-21.

Ramshaw HS, Rao SS, Crittenden RB, Peters SO, Weier HU, Quesenberry PJ. Engraftment of bone marrow cells into normal unprepared hosts: effects of 5-fluorouracil and cell cycle status. *Blood*, 1995; 86:924-9.

Randall TD, Lund FE, Howard MC, Weissman IL. Expression of murine CD38 defines a population of long-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Blood*, 1996; 87:4057-67.

Reya T, Morrison S, Clarke M, Weissman I. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001; 414:105-11.

Robinson SN, Ng J, Niu T, Yang H, McMannis JD, Karandish S, Kaur I, Fu P, Del Angel M, Messinger R, Flagge F, de Lima M, Decker W, Xing D, Champlin R, Shpall EJ. Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant.*, 2006; 37:359-66.

Robinson SN, Simmons PJ, Yang H, Alousi AM, Marcos de Lima J, Shpall EJ. Mesenchymal stem cells in ex vivo cord blood expansion. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2011; 24:83-92.

Rocha V, Labopin M, Sanz G, Arcese W, Schwerdtfeger R, Bosi A, Jacobsen N, Ruutu T, de Lima M, Finke J, Frassoni F, Gluckman E, Acute Leukemia Working Party of European Blood and Marrow Transplant Group, Eurocord-Netcord Registry. Outcomes after transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2004; 351:2276-85.

Rodrigues NP, Janzen V, Forkert R, Dombkowski DM, Boyd AS, Orkin SH, Enver T, Vyas P, Scadden DT. Haploinsufficiency of GATA-2 perturbs adult hematopoietic stem-cell homeostasis. *Blood*, 2005; 106:477-84.

Rubinstein P. Cord blood banking for clinical transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 2009; 44:635-42. .

Ryser MF, Thieme S, Bornhäuser M, Lehmann R, Brenner S. Serum albumin strongly influences SDF-1 dependent migration. *Int. J. Hematol.*, 2009; 89:269-75.

Sagar BM, Rentala S, Gopal PN, Sharma S, Mukhopadhyay A. Fibronectin and laminin enhance engraftability of cultured hematopoietic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006; 350:1000-5.

Sánchez-Madrid F, del Pozo MA. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.*, 1999; 18:501-11.

Sanz MA. Cord-Blood Transplantation in Patients with Leukemia —A Real Alternative for Adults. *N. Eng. J. Med.*, 2004; 35:2328-30.

Sarkar S, Svoboda M, de Beaumont R, Freedman AS. The role of Akt and RAFTK in beta1 integrin mediated survival of precursor B-acute lymphoblastic leukemia cells. *Leuk. Lymphoma*, 2002; 43:1663-71.

Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ, Lawrence HJ, Largman C, Lansdorp PM, Humphries RK. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev.*, 1995; 9:1753-65.

Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.*, 2008; 3:1101-8.

Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 1978; 4:7-25.

Schroeder T, Kohlhof H, Rieber N, Just U. Notch signaling induces multilineage myeloid differentiation and up-regulates PU.1 expression. *J. Immunol.*, 2003; 170:5538-48.

Schweitzer KM, Dräger AM, van der Valk P, Thijsen SF, Zevenbergen A, Theijssmeijer AP, van der Schoot CE, Langenhuijsen MM. Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues. *Am. J. Pathol.*, 1996; 148:165-75.

Scott LM, Priestley GV, Papayannopoulou T. Deletion of alpha4 integrins from adult hematopoietic cells reveals roles in homeostasis, regeneration, and homing. *Mol. Cell Biol.*, 2003; 23:9349-60.

Shi-Xia X, Xian-Hua T, Xiang-Feng T. Unrelated umbilical cord blood transplantation and unrelated bone marrow transplantation in children with hematological disease: a meta-analysis. *Pediatr. Transplant.*, 2009; 13:278-84.

Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, Kotb M, Gillies SD, King M, Mangada J, Greiner DL, Handgretinger R. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J. Immunol.* 2005; 174:6477-89.

Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan TV, Greiner DL, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J. Immunol.*, 1995; 154:180-91.

Sieburg HB, Cho RH, Müller-Sieburg CE. Limiting dilution analysis for estimating the frequency of hematopoietic stem cells: uncertainty and significance. *Exp. Hematol.*, 2002; 30:1436-43.

Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG, Seed B. Molecular cloning of a cADN encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. *J. Immunol.*, 1992; 148:267-71.

Singh N, Phillips RA, Iscove NN, Egan SE. Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis. *Exp. Hematol.*, 2000; 28:527-34.

Sivaraman T, Arulkumaran S. Delayed umbilical cord clamping: potential for change in obstetric practice. *B.J.O.G.*, 2011; 118:767.

Smith A, Carrasco YR, Stanley P, Kieffer N, Batista FD, Hogg N. A talin-dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes. *J. Cell Biol.*, 2005; 170:141-51.

Song LB, Li J, Liao WT, Feng Y, Yu CP, Hu LJ, Kong QL, Xu LH, Zhang X, Liu WL, Li MZ, Zhang L, Kang TB, Fu LW, Huang WL, Xia YF, Tsao SW, Li M, Band V, Band H, Shi QH, Zeng YX, Zeng MS. The polycomb group protein Bmi-1 represses the tumor suppressor PTEN and induces epithelial-mesenchymal transition in human nasopharyngeal epithelial cells. *J. Clin. Invest.*, 2009; 119:3626-36.

Sovalat H, Racadot E, Hénon P, Fuchs P, Lewandowski H, Billot M. Comparative analysis of class I, II and III epitope-detecting CD34 monoclonal antibodies by quantitative flow cytometry. *Hematol. Cell Ther.*, 1998; 40:259-68.

Srouf EF, Abonour R, Cornetta K, Traycoff CM. Ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells: ¿are we there yet?. *J. Hematother.*, 1999; 8:93-102.

Steen R, Egeland T. CD34 molecule epitope distribution on cells of haematopoietic origin. *Leuk. Lymphoma*, 1998; 30:23-30.

Steen R, Tjønnfjord GE, Gaudernack G, Brinch L, Egeland T. Differences in the distribution of CD34 epitopes on normal haematopoietic progenitor cells and leukaemic blast cells. *Br. J. Haematol.*, 1996; 94:597-605.

Summers YJ, Heyworth CM, de Wynter EA, Hart CA, Chang J, Testa NG. AC133+ G0 cells from cord blood show a high incidence of long-term culture-initiating cells and a capacity for more than 100 million-fold amplification of colony-forming cells in vitro. *Stem Cells*, 2004; 22:704-15.

Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood*, 1989; 74:1563-70.

Szilvassy SJ, Meyerrose TE, Ragland PL, Grimes B. Homing and engraftment defects in ex vivo expanded murine hematopoietic cells are associated with downregulation of beta1 integrin. *Exp. Hematol.*, 2001;29:1494-502.

Tang RH, Tng E, Law SK, Tan SM. Epitope mapping of monoclonal antibody to integrin alphaL beta2 hybrid domain suggests different requirements of affinity states for intercellular adhesion molecules (ICAM)-1 and ICAM-3 binding. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280:29208-16.

Tavassoli M, Hardy CL. Molecular basis of homing of intravenously transplanted stem cells to the marrow. *Blood*, 1990; 76:1059-70.

Tavian M, Biasch K, Sinka L, Vallet J, Péault B. Embryonic origin of human hematopoiesis. *Int. J. Dev. Biol.*, 2010; 54:1061-5.

Tavian M, Coulombel L, Luton D, Clemente HS, Dieterlen-Lièvre F, Péault B. Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood*, 1996; 87:67-72.

Tavian M, Robin C, Coulombel L, Péault B. The human embryo, but not its yolk sac, generates lympho-myeloid stem cells: mapping multipotent hematopoietic cell fate in intraembryonic mesoderm. *Immunity*, 2001; 15:487-95.

Teixidó J, Hemler ME, Greenberger JS, Anklesaria P. Role of beta 1 and beta 2 integrins in the adhesion of human CD34hi stem cells to bone marrow stroma. *J. Clin. Invest.*, 1992; 90:358-67.

Thomas DE, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N. Engl. J. Med.*, 1957; 257:491-6.

Till JE, McCulloch EA. Direct measurement of the radiation sensitivity of normal bone marrow cells. *Radiat. Res.*, 1961; 14:213-22.

Tolar J, Le Blanc K, Keating A, Blazar BR. Concise review: hitting the right spot with mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*, 2010; 28:1446-55.

Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW, Orkin SH. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*, 1994; 371:221-6.

Tsai FY, Orkin SH. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood*, 1997; 89:3636-43.

Tung SS, Parmar S, Robinson SN, De Lima M, Shpall EJ. Ex vivo expansion of umbilical cord blood for transplantation. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2010; 23:245-57.

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8:726-36.

Urciuoli P, Passeri S, Ceccarelli F, Luchetti B, Paolicchi A, Lapi S, Nocchi F, Lamanna R, Iorio M, Vanacore R, Mazzoni A, Scatena F. Pre-birth selection of umbilical cord blood donors. *Blood Transfus.*, 2010;8:36-43.

Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, van Lohuizen M. Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell*, 2004; 118:409-18.

van de Wiel-van Kemenade E, van Kooyk Y, de Boer AJ, Huijbens RJ, Weder P, van de Kastele W, Melief CJ, Figdor CG. Adhesion of T and B lymphocytes to extracellular matrix and endothelial cells can be regulated through the beta subunit of VLA. *J. Cell Biol.*, 1992; 117:461-70.

van der Lugt NM, Domen J, Linders K, van Roon M, Robanus-Maandag E, te Riele H, van der Valk M, Deschamps J, Sofroniew M, van Lohuizen M, et al. Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene. *Genes Dev.*, 1994; 8:757-69.

Van Overstraeten-Schlögel N, Beguin Y, Gothot A. Role of stromal-derived factor-1 in the hematopoietic-supporting activity of human mesenchymal stem cells. *Eur. J. Haematol.*, 2006;76:488-93.

Vanheusden K, Van Coppennolle S, De Smedt M, Plum J, Vandekerckhove B. In vitro expanded cells contributing to rapid severe combined immunodeficient repopulation activity are CD34+38-33+90+45RA-. *Stem Cells*, 2007; 25:107-14.

Varnum-Finney B, Xu L, Brashem-Stein C, Nourigat C, Flowers D, Bakkour S, Pear WS, Bernstein ID. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med.*, 2000; 6:1278-81.

Wang Y, Li D, Nurieva R, Yang J, Sen M, Carreño R, Lu S, McIntyre BW, Molldrem JJ, Legge GB, Ma Q. LFA-1 affinity regulation is necessary for the activation and proliferation of naive T cells. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284:12645-53.

Wagner W, Roderburg C, Wein F, Diehlmann A, Frankhauser M, Schubert R, Eckstein V, Ho AD. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells*. 2007; 25:2638-47.

Wagner W, Saffrich R, Ho AD. The stromal activity of mesenchymal stromal cells. *Transfus. Med. Hemother.*, 2008; 35:185-93

Walenda T, Bokermann G, Ventura Ferreira MS, Piroth DM, Hieronymus T, Neuss S, Zenke M, Ho AD, Müller AM, Wagner W. Synergistic effects of growth factors and mesenchymal stromal cells for expansion of hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp. Hematol.*, 2011; 39:617-28.

Walenda T, Bork S, Horn P, Wein F, Saffrich R, Diehlmann A, Eckstein V, Ho AD, Wagner W. Co-culture with mesenchymal stromal cells increases proliferation and maintenance of haematopoietic progenitor cells. *J. Cell Mol. Med.*, 2010; 14:337-50.

Walker L, Carlson A, Tan-Pertel HT, Weinmaster G, Gasson J. The notch receptor and its ligands are selectively expressed during hematopoietic development in the mouse. *Stem Cells*, 2001; 19:543-52.

Walker L, Lynch M, Silverman S, Fraser J, Boulter J, Weinmaster G, Gasson JC. The Notch/Jagged pathway inhibits proliferation of human hematopoietic progenitors in vitro. *Stem Cells*, 1999; 17:162-71.

Wang MW, Consoli U, Lane CM, Durett A, Lauppe MJ, Champlin R, Andreeff M, Deisseroth AB. Rescue from apoptosis in early (CD34-selected) versus late (non-CD34-selected) human hematopoietic cells by very late antigen 4- and vascular cell adhesion molecule (VCAM) 1-dependent adhesion to bone marrow stromal cells. *Cell Growth Differ.*, 1998; 9:105-12.

Wang Y, Li D, Nurieva R, Yang J, Sen M, Carreño R, Lu S, McIntyre BW, Molldrem JJ, Legge GB, Ma Q. LFA-1 affinity regulation is necessary for the activation and proliferation of naive T cells. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284:12645-53.

Weaver CH, Hazelton B, Birch R, Palmer P, Allen C, Schwartzberg L, West W. An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after administration of myeloablative chemotherapy. *Blood*, 1996; 86:3961-69.

Weekx SF, Van Bockstaele DR, Plum J, Moulijn A, Rodrigues I, Lardon F, De Smedt M, Nijs G, Lenjou M, Loquet P, Berneman ZN, Snoeck HW. CD34++ CD38- and CD34+ CD38+ human hematopoietic progenitors from fetal liver, cord blood, and adult bone marrow respond differently to hematopoietic cytokines depending on the ontogenic source. *Exp. Hematol.*, 1998; 26:1034-42.

Weinmaster G. The ins and outs of notch signaling. *Mol. Cell Neurosci.*, 1997; 9:91-102.

Weinstein R, Riordan MA, Wenc K, Kreczko S, Zhou M, Dainiak N. Dual role of fibronectin in hematopoietic differentiation. *Blood*, 1989; 73:111-6.

Whitlock CA, Tidmarsh GF, Muller-Sieburg C, Weissman IL. Bone marrow stromal cell lines with lymphopoietic activity express high levels of a pre-B neoplasia-associated molecule. *Cell*, 1987; 48:1009-21.

Williams DA. Ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells--robbing Peter to pay Paul? *Blood*, 1993; 81:3169-72.

Wilpshaar J, Bhatia M, Kanhai HH, Breese R, Heilman DK, Johnson CS, Falkenburg JH, Srour EF. Engraftment potential of human fetal hematopoietic cells in NOD/SCID mice is not restricted to mitotically quiescent cells. *Blood*, 2002; 100:120-7.

Wilpshaar J, Falkenburg JH, Tong X, Noort WA, Breese R, Heilman D, Kanhai H, Orschell-Traycoff CM, Srour EF. Similar repopulating capacity of mitotically active and resting umbilical cord blood CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Blood*. 2000; 96:2100-7.

Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006; 93-106.

Wineman J, Moore K, Lemischka I, Müller-Sieburg C. Functional heterogeneity of the hematopoietic microenvironment: rare stromal elements maintain long-term repopulating stem cells. *Blood*, 1996; 87:4082-90.

Wulf-Goldenberg A, Eckert K, Fichtner I. Cytokine-pretreatment of CD34(+) cord blood stem cells in vitro reduces long-term cell engraftment in NOD/SCID mice. *Eur. J. Cell. Biol.*, 2008; 87:69-80.

Yahata T, Ando K, Sato T, Miyatake H, Nakamura Y, Muguruma Y, Kato S, Hotta T. A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood*, 2003; 101:2905-13.

Yamamura K, Ohishi K, Masuya M, Miyata E, Sugimoto Y, Nakamura S, Fujieda A, Araki H, Katayama N. Ex vivo culture of human cord blood hematopoietic stem/progenitor cells adversely influences their distribution to other bone marrow compartments after intra-bone marrow transplantation. *Stem Cells*, 2008; 26:543-9.

Yang L, Bryder D, Adolfsson J, Nygren J, Månsson R, Sigvardsson M, Jacobsen SE. Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood*, 2005; 105:2717-23.

Yednock TA, Cannon C, Vandevort C, Goldbach EG, Shaw G, Ellis DK, Liaw C, Fritz LC, Tanner LI. Alpha 4 beta 1 integrin-dependent cell adhesion is regulated by a low affinity receptor pool that is conformationally responsive to ligand. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270:28740-50.

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 1997; 90:5002-12.

Yoo JH, Lee DG, Choi SM, Choi JH, Park YH, Kim YJ, Kim HJ, Lee S, Kim DW, Lee JW, Min WS, Shin WS, Kim CC. Infectious complications and outcomes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in Korea. *Bone Marrow Transplant*, 2004; 34:497-504.

Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 2003; 425:836-41.

Zhang Y, Chai C, Jiang XS, Teoh SH, Leong KW. Co-culture of umbilical cord blood CD34+ cells with human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.*, 2006; 12:2161-70.

## **ANEXOS**

### **ANEXO 1**

#### **CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL PARA EL PROYECTO:**

Propiedades de adhesión, migración y motilidad de células *stem* hematopoyéticas expandidas con citoquinas de acción temprana en co-cultivo con células *stem* mesenquimales

#### **INVITACION**

El laboratorio de Fisiología Celular y Molecular de la Universidad Nacional de Colombia lo invita a que contribuya con la sangre del cordón umbilical de su hijo recién nacido como donante en este estudio.

#### **PROPÓSITO**

Todos los años, miles de personas desarrollan una enfermedad grave de la médula ósea como leucemia o nacen con alteraciones genéticas que comprometen su capacidad y calidad de vida. Para ellos, la terapia más frecuente es un trasplante de médula ósea, sin embargo, la realización de un trasplante de médula ósea es costosa y además es muy difícil encontrar donantes compatibles. En la sangre del cordón umbilical se encuentran células primitivas de las cuales se pueden obtener células sanguíneas que podrían llegar a utilizarse en futuros trasplantes después de realizar investigaciones exhaustivas sobre su comportamiento.

Para llevar a cabo esta tarea se necesita la colaboración de muchas personas, por lo que les proponemos su participación, aceptando donar desinteresadamente sangre del cordón umbilical, después del nacimiento de su hijo, esto con el fin de contribuir a las investigaciones de interés terapéutico acerca de la sangre de cordón umbilical.

Las células de la sangre de un feto antes de su nacimiento circulan por el cuerpo, el cordón umbilical y la placenta. Esta sangre brinda oxígeno y nutrientes desde la madre al niño. Cuando el bebé nace, se separa de la madre y la placenta, pinzando el cordón umbilical en dos sitios y cortando el cordón que queda en medio de las dos pinzas. Después de unos minutos del nacimiento, la placenta sale y habitualmente la placenta y cordón se desechan.

La sangre del cordón umbilical se recoge después del nacimiento del niño y tras el corte del cordón umbilical; este procedimiento es de rutina durante el parto y

será realizado por personal especializado (Médico y/o Enfermera Jefe). El proceso de recolección de la sangre del cordón es sencillo. La recolección de la sangre no cambiará el procedimiento habitual del parto. En partos vaginales, después del nacimiento del niño, pinzamiento y corte del cordón, el niño se retira del área. Es muy importante que tenga en cuenta que **LA TOMA DE LA MUESTRA DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL NO REPRESENTA NINGÚN PELIGRO NI PARA LA MADRE NI PARA EL BEBE.** Del cordón que normalmente es desechado se pueden recuperar entre 10 y 70 ml, muestra que se tomará para este estudio.

En esta investigación se aislarán las células madre extraídas del cordón umbilical para el estudio de su funcionalidad y su proceso de desarrollo y la muestra será manipulada bajo la normatividad ética enunciada en la resolución 008430 capítulo IV de 1993 expedida por el Ministerio de Salud.

### **SU PAPEL DENTRO DEL PROYECTO**

Siendo voluntario para donar la sangre de cordón umbilical de su hijo, usted estará de acuerdo con lo siguiente:

Usted permitirá que la sangre del cordón umbilical y el cordón sean usados para investigar la funcionalidad de estas células **exclusivamente** dentro del proyecto arriba mencionado.

### **LOS POSIBLES BENEFICIOS PARA USTED Y SU HIJO**

Su participación en este estudio no lo beneficiará a usted ni a su hijo directamente en ningún modo. Sin embargo, uno de los propósitos de este proyecto es contribuir al conocimiento en el área de las ciencias médicas básicas en Colombia y divulgar los resultados en aras de impulsar a otros grupos a trabajar en estas áreas de investigación.

Puede ser un beneficio para usted contribuir al conocimiento en esta área, lo cual puede ayudar al tratamiento en personas con enfermedades terminales.

### **ALTERNATIVAS DE PARTICIPACIÓN**

Tiene usted la libertad de no aceptar esta invitación.

### **SEGURIDAD**

No hay riesgos físicos para el niño o la madre al incorporarse como donante a este proyecto de investigación. Se conservará la confidencialidad del donante y sus padres.

### **REEMBOLSOS A USTED**

No se le pagará a usted por la donación realizada. La donación es totalmente

voluntaria y altruista.

### **GASTOS**

No tendrá que cubrir ningún gasto de colección, procesamiento o análisis de la muestra.

### **CONFIDENCIALIDAD**

Su identidad no será revelada en ninguna forma, o declaración escrita como resultado de su participación en el proyecto.

### **PREGUNTAS O DUDAS**

Si tiene preguntas o alguna duda sobre esta solicitud o sobre el proyecto en general, por favor remítalas al Departamento de \_\_\_\_\_ de la Facultad de \_\_\_\_\_ de la Universidad \_\_\_\_\_ al Dr. \_\_\_\_\_, director del proyecto o a la Dra. \_\_\_\_\_ co-investigadora del proyecto.

**SU FIRMA ABAJO INDICA QUE USTED HA LEIDO Y ENTENDIDO EL CONSENTIMIENTO INFORMADO, QUE HA TENIDO LA OPORTUNIDAD DE HACER PREGUNTAS, QUE SE LE HA DADO LA INFORMACIÓN MAS PRECISA QUE HA SIDO POSIBLE Y QUE ESTA DE ACUERDO EN PARTICIPAR COMO DONANTE DE LA SANGRE DEL CORDÓN UMBILICAL DE SU HIJO PARA EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN MENCIONADO.**

Madre  
Nombre:  
CC:

Padre  
Nombre:  
CC:

Teléfono del domicilio: \_\_\_\_\_

FECHA: \_\_\_\_\_

Persona que suministró la información:

\_\_\_\_\_  
Nombre:  
CC:  
Papel dentro del Proyecto

## ANEXO 2

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRA DE MÉDULA ÓSEA

#### INFORMACIÓN

En las últimas décadas la **médula ósea** se ha convertido en una fuente terapéutica para enfermedades de diverso origen. La investigación sistemática sobre la aplicabilidad de sus componentes ha retribuido en beneficio de gran cantidad de pacientes. El trasplante de médula ósea como terapia en leucemia es uno de los ejemplos más conocidos de su utilización. Es conocido que estas terapias de reemplazo de médula ósea son efectivas gracias a que dentro de la médula ósea hay **células madre** capaces de sustituir las células “enfermas” y dando origen a unas células hijas “sanas”. Sin embargo las propiedades de estas células madre no se han esclarecido completamente y son objeto de intensa investigación en muchas partes del mundo. El **Grupo de Fisiología Celular y Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia** está interesado en el estudio de las propiedades de las células madre aisladas de médula ósea por lo que solicita su colaboración en esta investigación con la donación de una pequeña muestra de médula ósea de su hijo.

Entre 1 ml y 5 ml de muestra de médula ósea será colectada por los **médicos del servicio de Ortopedia del Hospital La Misericordia** durante la cirugía para la que ha sido programado. La obtención de esta muestra **NO implicará un riesgo adicional al de la cirugía a la que su hijo o hija será sometido(a)**. Su participación en este estudio será voluntaria y confidencial. La muestra colectada será usada únicamente en investigación básica. La obtención de esta muestra no le representará ningún gasto adicional ni tampoco usted será retribuido económicamente por esta donación.

Si tiene preguntas o dudas sobre el proyecto por favor remítalas a las personas responsables de este estudio en la Oficina 430, División de Fisiología de la Facultad de Medicina de la **Universidad Nacional de Colombia** (sede Bogotá) los doctores **Jean Paul Vernot** coordinador del grupo de fisiología celular y molecular y **Ana María Perdomo Arciniegas** médica investigadora del grupo (teléfono 3165000 ext. 15057) o al Dr. Armando Amador, médico especialista en Ortopedia del servicio de Ortopedia del Hospital de la Misericordia.

#### APROBACIÓN DE DONACIÓN VOLUNTARIA

Procedimiento quirúrgico: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

Nombre del padre/madre o acudiente: \_\_\_\_\_

C.C. \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Declaro que:

1. Entiendo que la donación de médula ósea para este estudio es libre y voluntaria.
2. Entiendo que el procedimiento para la donación de una muestra de hasta 5 ml de médula ósea NO implicará un riesgo adicional al del procedimiento quirúrgico de Ortopedia al que mi hijo/hija/representado será sometido.
3. Entiendo que la muestra de médula ósea será usada con fines investigativos.
4. Entiendo que la información referente a mi hijo/hija/representado será manejada de manera confidencial y que será protegida mi identidad.
5. Entiendo que NO recibiré ningún estímulo económico por esta donación.
6. He leído y comprendido toda la información entregada, he tenido la oportunidad de formular preguntas y se me han resuelto mis inquietudes.

En consecuencia he decidido libremente la donación de una muestra de médula ósea,

\_\_\_\_\_  
Firma Padre/Madre/Acudiente

\_\_\_\_\_  
Cédula de Ciudadanía

\_\_\_\_\_  
Firma Testigo

\_\_\_\_\_  
Cédula de Ciudadanía

\_\_\_\_\_  
Firma Testigo

\_\_\_\_\_  
Cédula de Ciudadanía

**AUTORIZACIÓN DE ALMACENAMIENTO DE MUESTRA Y USO EN OTROS ESTUDIOS**

**Marque la decisión al respecto de que su muestra sea usada en estudios posteriores:**

- Autorizo a que la muestra donada sea almacenada y usada en otros estudios de investigación básica siempre y cuando la información obtenida respecto a mi persona sea confidencial.**
- Deseo que la muestra sea desechada después del estudio mencionado.**

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Cédula de Ciudadanía

## ANEXO 3

### Inhibición de PKC en la diferenciación de células stem hematopoyéticas a células dendríticas: efecto sobre marcadores de superficie, Rel-B e ICAM-1\*



Carolina Martínez, Ana María Perdomo, Hernando del Castillo, Jean Paul Vernot  
Grupo de Fisiología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia

#### INTRODUCCIÓN

Las células dendríticas (CD) juegan un papel crucial en la inducción de la respuesta inmune primaria. CD pueden generarse *in vitro* a partir de progenitores hematopoyéticos CD34<sup>+</sup> y monocitos con las citoquinas (CQs) GM-CSF, IL-4 y TNF $\alpha$  (Caux y col, 1996). Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en este proceso no han sido bien establecidos. A pesar de que estas CQs activan múltiples vías de señalización intracelular, se ha demostrado que la proteína quinasa C (PKC) tiene un papel predominante (Davis y col., 1998). Otros estudios, han relacionado al factor transcripcional Rel-B en la diferenciación terminal, la maduración y activación de las CD (Carrasco y col, 1993; Clark y col, 1999).

En este trabajo se determinó el papel de PKC durante la diferenciación de células CD34<sup>+</sup> de sangre de cordón umbilical hacia CD. Para esto, utilizamos PMA como activador directo de PKC, y un péptido quimérico (HKPS) como inhibidor de PKC (conformado por un dominio permeable a células (HK) acoplado a una secuencia pseudosustrato (PS) reguladora de las isoformas clásicas de PKC (Perdomo-Arciniegas y col, 2008). Como control utilizamos la inducción de la diferenciación con CQs. Se evaluó la presencia de moléculas de superficie características de CD, la expresión intracelular de Rel-B y la transcripción de los genes Rel-B e ICAM-1.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

##### Células y cultivos

Se obtuvo sangre de cordón umbilical, previo consentimiento informado, en el Instituto Materno Infantil de Bogotá. Las células mononucleares se separaron en gradiente de Ficoll-Hypaque y las CD34<sup>+</sup> se aislaron por separación inmunomagnética (Miltenyi Biotec Inc.). Las células se expandieron por 14d (RPMI 1640 con SFB inactivado, 10%) con Stem Cell Factor, Trombopoyetina y FLT3L a 50ng/ml (US Biological). Posteriormente, se indujo la diferenciación hacia CD usando GM-CSF, IL4 (50 ng/ml) y TNF $\alpha$  (10 ng/ml) o PMA (5 ng/ml) por 8d. Para los ensayos de inhibición de PKC las células se incubaron con péptidos (20  $\mu$ M) por 1 h, previo a la adición de los estímulos para inducir la diferenciación.

##### Péptidos

HKPS: AAVALLPAVLALLAPKRGALRQY y el control con una secuencia cargo irrelevante, HKSC: AAVALLPAVLALLAPKYQRGLA se sintetizaron en GL Biochem (Shanghai Ltd).

##### Determinación de inmunofenotipo

AcMc anti-CD80(PE), CD83(PE), CD86(FITC), HLA-DR (FITC) y controles de isotipo (Caltag). Las adquisiciones se realizaron en FACSCalibur y los datos se analizaron con CellQuestPro.

##### Western Blot

AcMc anti-Rel-B (Zymed®), y anti-IgG murino (cabra) conjugado con fosfatasa alcalina.

##### RT-PCR en tiempo real

Se analizó expresión de Rel-B e ICAM-1 por qRT-PCR usando los controles  $\beta$ -actina, GAPDH y RPS18. Se usó el kit Power SyberGreen y el equipo 7500 (Applied Biosystems).

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### Inmunofenotipo y morfología de células CD34 inducidas con GM-CSF, IL4 y TNF $\alpha$ o PMA

Las células estimuladas se caracterizaron morfológicamente y fenotípicamente en diferentes tiempos del cultivo comparando con el vehículo (DMSO) del PMA y con el día 0 (d0) de inducción. En células estimuladas con PMA se evidenciaron cambios morfológicos tempranos (d1 de inducción), las células se adherieron a la caja de cultivo y emitieron prolongaciones citoplasmáticas. Esto no se observó en el cultivo con el vehículo y en las células estimuladas con CQs estos cambios fueron menos notorios y se vieron de manera tardía (d7) (Fig 1). Las células cultivadas con CQs o PMA expresaron en el d8 CD80, CD83, CD86 y HLA-DR. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas lo cual evidencia la capacidad del PMA para imitar los efectos de los factores de crecimiento usados tradicionalmente para la inducción de células madre hematopoyéticas hacia CD (Fig 2).

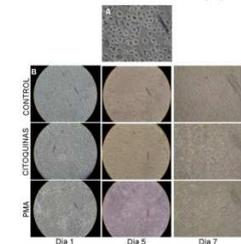


Figura 1. Cultivos de CD34 en diferentes días de inducción con CQs o PMA. A. D14 cultivo de expansión. B. Células CD34 en diferentes condiciones de estimulación (experimento representativo, n=5). Control DMSO 0.001%, CQs: GM-CSF (50 ng/ml), IL-4 (50 ng/ml) y TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), PMA (5 ng/ml).

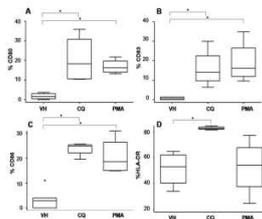


Figura 2. Porcentaje de expresión de CD80, CD83, CD86 y HLA-DR al d7 de inducción con CQs y PMA. Los cambios en la expresión de marcadores fueron estadísticamente significativos en células estimuladas con CQs o PMA con respecto a las células no estimuladas del cultivo control (\*p=0.05).

##### Expresión de Rel-B e ICAM-1 en CD generadas a partir de células hematopoyéticas

Se examinó la expresión intracelular de Rel-B y la transcripción de los genes Rel-B e ICAM-1 con los diferentes tratamientos usados en células CD34<sup>+</sup>. Se evidenció un aumento de casi 3

veces (CQs) y de 2 veces (PMA) en la expresión de Rel-B (Fig 3). En la tabla 1 se muestra el cambio en el nivel de expresión de Rel-B y de ICAM1 determinados qRT-PCR.

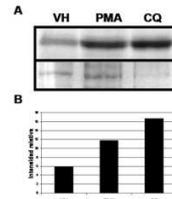


Figura 3. Expresión de Rel-B en CD34 estimuladas con PMA y CQs por 7d.

A. Arriba: Western blot de Rel-B en los extractos de CSH incubadas con PMA o DMSO 0,001% (VH), o CQs (CQ) GM-CSF, IL-4 y TNF $\alpha$ . Abajo: control de carga. B. Intensidad relativa de Rel-B normalizada con respecto al control de carga (A, abajo).

GEN	ESTIMULO	
	CQ	PMA
Rel-B	161%	62%
ICAM-1	1.346%	1.954%

Tabla 1. Expresión de Rel-B e ICAM-1 en respuesta a los estímulos. Los porcentajes son con respecto a la expresión en el control (células sin estímulo).

##### Inhibición de PKC en el proceso de diferenciación

Se evidenció que la expresión relativa de CD80 y CD83 disminuye en células tratadas con HKPS y estimuladas con PMA. Por el contrario, la expresión de CD86 aumentó y la de HLA-DR no varió (Fig 4). Existe entonces una tendencia de HKPS a revertir los efectos inducidos por el PMA. En las células tratadas con CQs los diferentes péptidos mostraron una gran variabilidad en los efectos mostrados en la expresión de los marcadores.

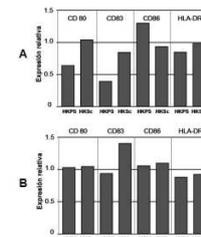


Figura 4. Expresión relativa de CD80, CD83, CD86 y HLA-DR en células CD34 estimuladas con PMA o CQs y tratadas con HKPS y HKSC.

Se estableció un cultivo control de células estimuladas sin tratamiento previo con péptidos; la expresión de los marcadores en los diferentes casos se normalizó con respecto a la expresión de éstos en células no tratadas con péptidos. A. Inducción a CD con PMA y tratamiento con HKPS o HKSC. B. Inducción a CD con citoquinas y tratamiento con HKPS o HKSC.

##### Inhibición de la expresión de Rel-B con el péptido HKPS

En células sin estimulación, se evidenció una disminución relativa de la expresión de Rel-B en células tratadas con HKPS (I.R. 0,16) con respecto al control (DMSO) (I.R. 0,73) y a HKSC (I.R. 0,86). En células estimuladas con PMA, el tratamiento previo con HKPS o HKCS disminuyó la expresión de Rel-B en 23% y 17%, respectivamente. Por el contrario, en células estimuladas con CQs, HKPS no modificó o indujo un ligero aumento en la expresión Rel-B (Fig 5). La inhibición de la expresión de Rel-B por HKPS se evidenció únicamente en células sin estimular o en células estimuladas con PMA. Es probable que la estimulación con CQs, que activa de manera simultánea distintas vías de señalización intracelular, sea más difícil de inhibir que la activación preferencial de PKC por PMA.

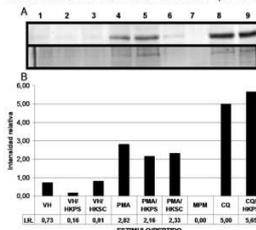


Figura 5. Expresión de Rel-B en células estimuladas con PMA y CQs y tratadas con HKPS y HKSC.

A. Western blot de Rel-B en extractos de células CD34 incubadas con DMSO (VH 1-3), PMA (4-6) y CQs (8, 9). Los diferentes tratamientos con péptidos se muestran abajo. Camil 7: MPM; Abajo: control de carga. B. Intensidad relativa de Rel-B normalizada con respecto al control de carga.

#### CONCLUSIONES

Las células stem hematopoyéticas CD34 de sangre de cordón umbilical estimuladas con PMA durante 7d expresan moléculas de superficie características de CD, aumentan la transcripción del factor transcripcional Rel-B y la molécula de adhesión ICAM-1. El PMA imita los efectos de GM-CSF e IL4 en el modelo de diferenciación de progenitores hematopoyéticos hacia CD, sugiriendo que PKC juega un papel en ese proceso. La inhibición de PKC mediante el uso del péptido quimérico HKPS revierte el efecto mostrado por el PMA y las CQs. Esta inhibición es más notoria al modular los efectos de una estimulación específica que compromete menos moléculas de señalización (PKC) que una como la estimulación con GM-CSF, IL4 que activa simultáneamente distintas vías de señalización intracelular.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Carrasco y col., 1993. Expression of *relB* transcripts during lymphoid organ development-specific expression in dendritic antigen-presenting cells. *Development*, 118, 1221-1231.  
Caux y col 1996. CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J. Exp. Med.*, 184:695-706.  
Clark y col 1999. Expression of the RelB transcription factor correlates with the activation of human dendritic cells. *Immunology*, 98:189-96  
Davis y col. 1998. Phorbol esters induce differentiation of human CD34 hemopoietic progenitors to dendritic cells: evidence for protein kinase C-mediated signaling. *J. Immunol.* 160, 3689-3697.  
Perdomo-Arciniegas y col. 2008. Novel chimeric peptide inhibits protein kinase C and induces apoptosis in human immune cells. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 14:64-74.

\* Este proyecto fue financiado parcialmente por DIB-UNAL y Colciencias.

ANEXO 4

**Human bone marrow mesenchymal stromal cells modulate CD54 and CXCR4 expression in cytokine-expanded human cord blood haematopoietic stem cells.**



Perdomo-Arciniegas AM<sup>1</sup>, Rodríguez-Pardo VM<sup>2</sup>, del Castillo H<sup>1</sup>, Vernot JP<sup>1</sup>.

1. Cellular and Molecular Laboratory, Faculty of Medicine, Universidad Nacional de Colombia.  
2. Haematology Laboratory, Faculty of Sciences, Pontificia Universidad Javeriana.

- ❖ Ex-vivo cytokine-expanded haematopoietic stem cells lose their homing and engraftment properties during the culture period.
- ❖ This effect has been partially explained by cytokine regulation of haematopoietic stem cell adhesion molecules and chemokine receptors.
- ❖ In an attempt to improve the CB-HSC expansion conditions, mesenchymal stromal cells have been used as culture co-adjuvants as they interact closely in vivo with HSC in the bone marrow microenvironment.
- ❖ Co-culturing of CB-HSC with bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSC) enhances HSC engraftment.

**Aim**

- ❖ To evaluate the BM-MSC modulation upon expression of adhesion molecules, CXCR4 and self-renewal associated molecules in cytokine-expanded CB-HSC.

**Materials and methods**

- ❖ BM-MSC were isolated by adherence from human bone marrow samples. Differentiation to osteoblasts, chondrocytes and adipocytes was proven.
- ❖ CB-HSC were isolated by positive CD34 immunomagnetic selection from mononuclear umbilical cord blood cells. High purity CB-HSC were stained with CFSE for samples further analysed by flow cytometry.
- ❖ CB-HSC culture conditions:



Fig 1. Culture conditions.

- ❖ Freshly isolated or 3rd day cultured CD34<sup>+</sup> cells were analysed for CD54, CD49d, CD44 and CXCR4 expression by flow cytometry. mRNA was also extracted and qRT-PCR was performed for Notch-1, Frizzled-1, STAT3 and STAT5. Migration assays were also performed.

**Results**

- ❖ CB-HSC CD54 expression was maintained by BM-MSC co-culture and reduced by cytokine-stimulation.

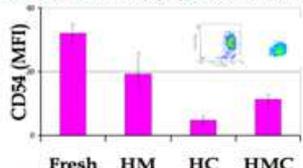


Fig 2. CD54 median fluorescence intensity (MFI) in CB-HSC freshly isolated or CFSE<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup> cultured CB-HSC at mentioned conditions (Fig1)

- ❖ CB-HSC CD49d expression was increased by cytokines while CD44 expression was maintained among treatments.

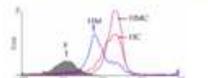



Fig 3. CD49d expression at different culture conditions. Fig 4. CD44 expression at different culture conditions.

- ❖ CB-HSC CXCR4 expression as well as SDF-1 migration is downmodulated by BM-MSC co-culture.

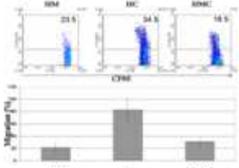


Fig 5. CB-HSC CXCR4 expression (upper panel) and SDF-1 gradient migration (lower panel) at different culture conditions.

- ❖ SDF-1 treatment induced intercellular adhesion in co-cultured CB-HSC with BM-MSC.



Fig 6. Intercellular adhesion in CB-HSC co-cultured before or after SDF-1 application.

- ❖ Notch-1 and Stat5A were upregulated in co-cultured hCB-HSC plus cytokines compared to freshly isolated hCB-HSC.

	Notch-1	Stat5A
HM	0.33 (± 0.01)	0.28 (± 0.017)
HC	0.23 (± 0.27)	0.23 (± 0.21)
HMC	0.3 (± 0.03)	0.4 (± 0.04)

Table 1. Notch-1 and Stat5A fold RNA expression of cultured CB-HSC compared to freshly isolated hCB-HSC.

**Conclusions**

- ❖ CB-HSC CD54 expression was maintained by BM-MSC co-culture and reduced by cytokine-stimulation.
- ❖ CB-HSC CD49d expression was increased by cytokines and CD44d expression was maintained among treatments.
- ❖ CB-HSC CXCR4 expression as well as SDF-1 migration is downmodulated by BM-MSC co-culture however SDF-1 treatment induced intercellular adhesion in co-cultured CB-HSC with BM-MSC.
- ❖ Notch-1 and Stat-5A appear to be up-regulated in co-cultured cells plus cytokines compared to freshly isolated CB-HSC.

**Acknowledgments**

- ❖ Thanks to members of the staff at the Instituto Materno Infantil and Hospital San Ignacio for their assistance in collecting samples. This study was supported by grants from COLCIENCIAS (RC401-2006) and Universidad Nacional de Colombia's DIB.

## Artículo 1

**Perdomo-Arciniegas** AM, Vernot JP. [Optimised cord blood sample selection for small-scale CD34+ cell immunomagnetic isolation.](#) Mol Med Report. 2012;5(3):749-52.

*Propiedades de adhesión, migración y motilidad de células stem hematopoyéticas expandidas con citoquinas de acción temprana en co-cultivo con células stem mesenquimales*

## **Artículo 2**

**Perdomo-Arciniegas AM, Vernot JP.** [Co-culture of hematopoietic stem cells with mesenchymal stem cells increases VCAM-1-dependent migration of primitive hematopoietic stem cells.](#) Int. J. Hematol., 2011; 94: 525-32.