



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Potencial de autorrenovación y quiescencia de las células stem hematopoyéticas derivadas de sangre de cordón umbilical sometidas *in vitro* a un microambiente de nicho leucémico

Natalia del Pilar Vanegas Avendaño

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento Ciencias Fisiológicas
Bogotá D.C., Colombia

2017

Potencial de autorrenovación y quiescencia de las células stem hematopoyéticas derivadas de sangre de cordón umbilical sometidas *in vitro* a un microambiente de nicho leucémico

Natalia del Pilar Vanegas Avendaño

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Bioquímica

Director:

Ph.D. Jean Paul Vernot

Línea de Investigación:

Biología de Células Madre

Grupo de Investigación:

Fisiología Celular y Molecular

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Ciencias Fisiológicas

Bogotá D.C., Colombia

2017

La plenitud del conocimiento significa siempre una cierta comprensión de la profundidad de nuestra ignorancia, y siempre conduce a la humildad y la reverencia.

Robert Andrews Millikan

Agradecimientos

Le doy gracias a mis padres, por su apoyo, colaboración y esfuerzo.

A mis hermanos, por sus palabras de apoyo. A María José y Camilo por llenar mi vida de alegrías, risas y amor.

A Raúl por ser parte importante de mi vida, por estar cerca de mí y motivarme, por su paciencia y amor.

Agradezco la confianza, apoyo, dedicación e innumerables aportes a mi tutor Jean Paul Vernot, por darme la oportunidad de crecer como investigadora y desarrollar una visión crítica de la ciencia.

A mi compañera de estudio, de desesperación y de trabajo, Adriana, por motivarme, por ser parte de mi vida, gracias por su apoyo, comprensión y sobretodo su amistad.

A mis compañeros de laboratorio Ximena B, Paola O, Víctor S, Diana B, Paola R, Marcela C, Natalia O, David B, Anamaria M, Alejandra I, y a mi “prima” Diana V por su apoyo, entrenamiento, opiniones y colaboración.

A mis amigos, por confiar y creer en mí, y haber hecho de esta etapa una satisfacción más hacia el cumplimiento de mis metas.

Natalia

Resumen

Las células stem mesenquimales (MSC) y las leucémicas interactúan en el microambiente leucémico y afectan diferencialmente a las demás células del nicho. Esta interacción, tiene implicaciones importantes sobre la biología y la función de las células stem hematopoyéticas (HSC). Para estudiar este aspecto, se estableció un modelo *in vitro* de nicho leucémico (NL), realizando un co-cultivo de MSC normales con medio condicionado de células REH, una línea celular de leucemia linfoblástica aguda pre-B. En este NL, las HSC (células CD34+) que normalmente están en un estado quiescente, entran en ciclo celular y proliferan; por el contrario, solo una pequeña fracción de células entran en ciclo celular en el nicho normal bajo condiciones idénticas. Esta pérdida de la quiescencia se acompañó del incremento en la expresión de Ki-67 y de c-Myc, dos marcadores asociados a la proliferación celular. Además, dos reguladores centrales de la quiescencia GATA2 y p53 disminuyeron su expresión. Interesantemente, la expresión de dos genes involucrados en la autorrenovación de las células CD34+, Klf4 y EZH2, se vio afectada de manera importante. En cambio, la expresión de c-Kit, aumentó en las células CD34+ del NL cuando se comparó con el nicho normal; sin embargo, su expresión fue menor al compararlo con las células CD34+ frescas. Estos resultados muestran claramente que la quiescencia y la autorrenovación se afectan considerablemente en este NL, además, también se muestra que en el NL las MSC mostraron una morfología aplanada, con la aparición de pequeñas vacuolas citoplasmáticas, detención del crecimiento y fueron positivas para la actividad de β -galactosidasa asociada a la senescencia. La evaluación del medio condicionado leucémico mostró un incremento en las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-8, posibles efectores de los cambios observados en las células CD34+. Este NL *in vitro*, establecido sin células leucémicas, facilitará la evaluación de la expresión génica de las células CD34+ y el desarrollo de agentes terapéuticos que puedan neutralizar los factores solubles presentes y las vías de señalización celular involucradas en el funcionamiento defectuoso de las células CD34+.

Palabras clave: Nicho leucémico, células stem hematopoyéticas, células stem mesenquimales, quiescencia, autorrenovación, proliferación, microambiente.

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSC) and leukemic cells interact in the leukemic niche [1] in the bone marrow and differentially affect each other and other cells in the LN. These interactions have striking implications for the biology and function of hematopoietic stem cells (HSC). To study these relationships, an *in vitro* model of the LN was established by co-culturing normal MSC with REH-conditioned medium, a pre-B acute lymphoblastic leukemia cell line. When quiescent HSC (CD34+ cells) are cultured in this LN, they enter the cell cycle and proliferate. In contrast, only a small fraction of the CD34+ cells enter the cell cycle in a normal niche, under identical conditions. This loss of quiescence was accompanied by increased expression of Ki-67 and c-Myc, two proliferation-associated markers. Furthermore, two central regulators of quiescence, GATA2 and p53, decreased their expression. Interestingly, the expression of two genes involved in CD34+ self-renewal, Klf4 and the EZH2 enzyme, was significantly affected. In contrast, expression of c-Kit, the Stem Cell Factor (SCF) receptor, increased in the LN CD34+ cells when compared to the normal niche; however, its expression was lower when compared to freshly isolated CD34+ cells. These results clearly show that quiescence and self-renewal are significantly affected in this LN. Besides, it was also revealed that MSC in the LN exhibited a flattened morphology, with the appearance of small cytoplasmic vacuoles, stopped growing and were positive for the enzymatic activity of beta-galactosidase, which is known to be associated with cellular senescence. The evaluation of the leukemic-conditioned medium showed an increase in the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8, possible effectors of the changes observed in CD34+ cells. This *in vitro* LN, established without leukemic cells, will facilitate the evaluation of CD34+ cell gene expression and the development of therapeutic agents that could neutralize the soluble factors present in this niche and the cellular signaling pathways involved in the flawed functioning of CD34+ cells.

Keywords: Leukemic niche, hematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells, quiescence, self-renewal, proliferation, microenvironment.

Contenido

	Pág.
Resumen	V
Abstract	VI
Lista de figuras	IX
Lista de abreviaturas	X
Introducción.....	1
1. Marco Teórico	5
1.1 Nicho de células stem hematopoyéticas (HSC).....	5
1.2 Señales extracelulares que regulan la función de las HSC.....	6
1.3 Factores de transcripción que regulan a las HSC	8
1.4 Reguladores del ciclo celular de las HSC.....	11
1.5 Nicho de células stem leucémicas (LSC)	12
2. Justificación.....	18
3. Pregunta de investigación	19
4. Formulación de hipótesis.....	20
5. Objetivos.....	21
5.1 Objetivo general.....	21
5.2 Objetivos específicos	21
6. Métodos.....	22
6.1 Aislamiento de células CD34+ de Sangre de Cordón Umbilical (SCU)	22
6.2 Aislamiento y caracterización de las MSC de MO	23
6.3 Preparación de Medio Condicionado (MECO) de células REH (MECO-REH).....	24
6.4 Establecimiento del nicho leucémico (NL).....	24
6.5 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	25
6.6 Análisis de expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real - SYBR Green.....	25
6.7 Evaluación de la actividad de β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β GAL) ...	27
6.8 Evaluación de la migración de las células CD34+	27
6.9 Adhesión de células CD34+ a MSC	28

6.10	Expresión de moléculas de adhesión en células CD34+ después del co-cultivo	28
6.11	Expresión de marcadores primitivos en las células CD34+ después del co-cultivo	28
6.12	Capacidad clonogénica de las células CD34+	29
6.13	Determinación de citoquinas por citometría de flujo Cytometric Bead Array (CBA) ...	29
6.14	Análisis estadístico	30
7.	Resultados.....	31
7.1	Establecimiento del NL con MECO-REH.....	31
7.2	Proliferación de células CD34+ en el NL	32
7.3	Expresión de GATA2 y p53 en células CD34+ del NL	35
7.4	Expresión de genes asociados a la autorrenovación de las células CD34+	36
7.5	Evaluación de la capacidad multipotente de las células CD34+	37
7.6	El NL induce disminución en la migración y aumento de la adhesión de las células CD34+	38
7.7	Marcadores de células stem de las CD34+ en el NL	41
7.8	El NL induce senescencia en MSC.....	43
7.9	Caracterización parcial de los factores solubles presentes en el NL.....	44
8.	Discusión.....	45
9.	Conclusiones	50
10.	Bibliografía	51

Lista de figuras

	Pág.
Figura 7-1: Aislamiento y caracterización de células stem mesenquimales y células CD34+.....	32
Figura 7-2: El NL induce incremento en las fases S+G2/M del ciclo celular en células CD34+.....	33
Figura 7-3: El NL incrementa la proliferación de las células CD34+.....	34
Figura 7-4: GATA2 y p53 son regulados a la baja en células CD34+ de NL.....	35
Figura 7-5: Las células CD34+ de NL tienen una expresión génica anormal de moléculas asociadas a la autorrenovación.....	36
Figura 7-6: Reducción de la capacidad de formación de colonias primitivas de las células CD34+ en el NL.....	37
Figura 7-7: Disminución de la migración de las células CD34+ en un nicho leucémico <i>In Vitro</i>	38
Figura 7-8: Incremento de la capacidad de adhesión y expresión de moléculas de adhesión en las células CD34+ de NL.....	40
Figura 7-9: Marcadores de células stem y de diferenciación de células CD34+ en el NL.....	42
Figura 7-10: MECO-REH incrementa la actividad SA- β -Gal en las MSC de MO.....	43
Figura 7-11: Concentración de citoquinas pro-inflamatorias en el MECO-REH.....	44

Introducción

Las células stem hematopoyéticas (HSC) están en la cima de la jerarquía de las células de la sangre y se definen como las únicas células dentro del sistema hematopoyético que tienen la capacidad de autorrenovación a largo término y de diferenciación multipotente. La autorrenovación se entiende como la capacidad de dar origen a células hijas idénticas a las HSC sin diferenciarse, mientras que la multipotencia de las HSC se define como la capacidad de diferenciarse a todas las células sanguíneas funcionales [2]. La regulación del número, características y funciones de las HSC cumple un papel importante en la hematopoyesis tanto en condiciones normales como de estrés [3]. La hematopoyesis normal es un proceso estrictamente regulado que se logra a través de la autorrenovación de las HSC, la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas (HPC), y la maduración de las células diferenciadas [4]. Principalmente, las HSC existen dentro de un ambiente regulado en la medula ósea (MO), llamado nicho hematopoyético. Este, se refiere a un microambiente esencial *in vivo* que alberga las HSC y que regula su autorrenovación, quiescencia, diferenciación y proliferación. Estos nichos hematopoyéticos son complejos y lo conforman una amplia gama de tipos celulares que incluye células del revestimiento óseo (osteoblastos y osteoclastos), células stem mesenquimales (MSC), el endotelio sinusoidal, células estromales perivasculares y células inmunes; además, los factores de crecimiento que secretan, y componentes de la matriz extracelular (MEC) que juegan diferentes papeles en la regulación de las HSC [5]. En particular, las MSC son un componente importante del nicho hematopoyético, participan en el mantenimiento de las HSC en la MO conservando sus propiedades de autorrenovación y quiescencia (células multipotentes), por medio de interacciones intercelulares y de factores solubles (quimioquinas y citoquinas) que inhiben la proliferación y la diferenciación [6].

En condiciones de homeostasis, las HSC se encuentran en la fase G0 en el ciclo celular por las señales del nicho que preservan un estado quiescente como un mecanismo de protección contra el daño y el agotamiento celular [7]. Otras señales estimulan el desarrollo de células progenitoras, y por lo tanto su entrada en ciclo celular y proliferación [8]. En

células stem y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) de ratón se ha identificado la red molecular que regula la autorrenovación, la diferenciación y el mantenimiento de la quiescencia [9]. Se ha mostrado que el potencial de implantación (engraftment) a largo término reside principalmente en la fracción celular G0. Por lo tanto, un estado quiescente es fundamental para preservar las características funcionales claves y necesarias para el trasplante. En humanos se ha mostrado que las HSC en la fase G0 tienen una mejor adherencia a las MSC [10] y se ha demostrado previamente que en las HSC primitivas en co-cultivo con MSC se induce un fenotipo pro-migratorio dependiente de VCAM [11], sugiriendo que la fracción celular G0 tiene una mejor eficiencia de migración hacia la MO y de anidación [12]. La relación entre los reguladores del ciclo celular (citoquinas, ciclinas y reguladores de ciclinas, factores de transcripción, microRNA, etc.) y la autorrenovación de las HSC ha sido parcialmente elucidado [4, 13].

Las señales extracelulares del nicho responsables del mantenimiento y supervivencia de las HSC son conocidas. La señalización por el factor de células stem ó stem cell factor SCF/c-Kit, Angiopoyetina-1 ó Angiopoietin-1 Ang-1/Tie1/2 y Trombopoyetina ó Thrombopoietin TPO/c-MPL es esencial para el mantenimiento de la quiescencia, supervivencia y función de las HSC [2, 14, 15]. También, se ha reportado que el Factor derivado de células estromales-1 ó Stromal cell- derived factor-1 SDF-1/CXCL12 actúa no sólo como quimioatrayente esencial para la migración de las HSC a la MO (homing) de las HSC, sino también como un regulador de la quiescencia [16]. Del mismo modo, SDF-1 es un inhibidor del ciclo celular en células iniciadoras de cultivo a largo término y su reducción en la MO induce entrada en el ciclo celular [17]. La estimulación anormal de estos receptores podrían inducir la entrada en ciclo celular de las HSC y su posterior agotamiento [18]. La proliferación de las HSC pueden también ser inducida en situaciones de estrés o injuria hematopoyética, por ejemplo, en procesos de infección/inflamación, senescencia, leucemia, quimioterapia, irradiación, trasplante de MO, entre otros [19] [20].

De la misma manera, en trabajos iniciales se ha demostrado que los estímulos de la MO son también esenciales para el crecimiento y expansión de las células leucémicas [21] y que el crecimiento de éstas afecta la función de las HSC, tanto *in vivo* como *in vitro* [22]. Recientemente, esto se ha demostrado en modelos murinos, donde el nicho de la MO protege las células leucémicas de la quimioterapia y que la reducción en los niveles de SDF-1 inducida por el microambiente leucémico es responsable del daño en el homing y

la retención de las células CD34+ [23]. Todos estos resultados sugieren que el microambiente que soporta las células leucémicas afecta las propiedades de las HSC [9], por lo que éste podría constituirse en un blanco de intervención terapéutica.

En el presente estudio, evaluamos el potencial de autorrenovación y la regulación del ciclo celular en las células CD34+ en un nicho leucémico (NL) establecido *in vitro*. Mediante la incubación de células stem mesenquimales (MSC) con medio condicionado obtenido del cultivo de la línea celular de leucemia linfocítica aguda [24] denominada REH, y el posterior co-cultivo con las células CD34+, nosotros estudiamos la expresión génica de algunas moléculas importantes asociadas a la función de las HSC. En este sistema las HSC entraron en ciclo celular, incrementaron su proliferación y presentaron cambios significativos en la expresión de genes compatibles con la pérdida del potencial de autorrenovación de las HSC. Estas alteraciones son equivalentes a la pérdida de la homeostasis hematopoyética observada en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) [25], la cual va acompañada de un incremento en células progenitoras y diferenciadas.

1. Marco Teórico

1.1 Nicho de células stem hematopoyéticas (HSC)

La hematopoyesis es un proceso por el cual todos los linajes celulares de la sangre se producen jerárquicamente por una célula primitiva en la MO. Las HSC, únicas con capacidad de autorrenovación y de mantener la hematopoyesis a largo término están en la cima de esta jerarquía. De acuerdo con las necesidades del organismo y la homeostasis, son liberadas a la circulación y a los órganos periféricos donde se diferencian y completan su maduración para cumplir una función efectora particular [26, 27].

Las células stem residen en un microambiente especializado denominado “nicho hematopoyético”, el cual es importante funcionalmente para el desarrollo, mantenimiento, regeneración y protección ante varias amenazas. Se han sido identificados múltiples tipos celulares que le dan soporte a las HSC, que incluyen células perivasculares, endoteliales, reticulares abundantes en CXCL12 (CAR), osteoblastos, neuronas, entre otras. Estudios recientes han mostrado que las células estromales perivasculares, localizadas cerca de las HSC y de células endoteliales, tienen un papel crítico en la regulación de las HSC; estas células expresan altos niveles de CXCL12 y del factor de células stem (SCF). Otra célula del nicho hematopoyético es la estromal perivascular Lepr+, la cual también expresa CXCL12, SCF y fosfatasa alcalina (un marcador de células mesenquimales). Si se deletiona el SCF de las células estromales perivasculares Lepr+ se reduce el número de HSC en la médula ósea (MO) pero se incrementa significativamente la frecuencia de las HSC en el bazo, lo que indica que estas células mantienen un número constante de HSC en la MO. Las células perivasculares Nestin+, células tipo mesenquimal que expresan PDGFR- α y CD51, han sido sugeridas también como células importantes en el mantenimiento de las HSC [28]. Las células endoteliales también son un componente crucial del nicho, aunque también expresan CXCL12, la delección de CXCL12 de estas células resulta en una leve pérdida de la actividad de repoblación a largo término de las

HSC. Cuando se deleta el SCF en las células endoteliales, la frecuencia de LT-HSC en la MO se reduce significativamente, mientras que el conteo de células sanguíneas y la “celularidad” de la MO no se modifica [7]. La expresión del SCF en células endoteliales es fundamental para el mantenimiento de las HSC en la MO [7].

En condiciones normales, el nicho hematopoyético cumple un papel importante en homing y en la movilización de estas hacia la circulación sistémica; en condición de estrés, las HSC migran a otros nichos que promueven la proliferación y generan células diferenciadas [29, 30]. El proceso mediante el cual las HSC son reclutadas en el nicho hematopoyético comienza con la interacción célula-célula de las HSC con las células endoteliales de los sinusoides de la MO por medio de las moléculas de adhesión [31]. Las HSC expresan receptores para P- y E-selectinas endoteliales: Ligando de glicoproteína- 1 (CD162), CD44, y las integrinas $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$ y $\alpha 9\beta 1$, siendo importantes en el homing de las HSC ya demostrado en experimentos en ratones. La P- y E-selectina detienen en el endotelio las HSC que están circulando en los vasos periféricos; una vez que estas disminuyen la velocidad, se adhieren firmemente al endotelio a través de las integrinas y pueden transmigrar a través de este. Finalmente, las HSC pueden movilizarse a sus respectivos nichos por medio de la producción de quimioquinas producidas por las células estromales de la MO.

Aunque las moléculas de adhesión anteriormente mencionadas son utilizadas por las células del sistema inmune para movilizarse al sitio de la lesión, estas se expresan en el endotelio únicamente por un estímulo pro-inflamatorio; por el contrario la expresión de estas moléculas de adhesión en el endotelio de la MO es constante, permitiendo el homing de las HSC en situaciones basales [32-34].

1.2 Señales extracelulares que regulan la función de las HSC

En el nicho hematopoyético varias proteínas solubles y unidas a la membrana plasmática participan en la regulación de la autorrenovación y el mantenimiento de las HSC. Algunas señales pueden estimular a las HSC para que entren en ciclo celular y proliferen. En contraste, otras señales pueden mantener las HSC en estado quiescente para protegerlas

del daño celular. Algunos factores tienen efectos pleiotrópicos, por ejemplo, se ha reportado que CXCL12 no solo es quimioatrayente para el homing y la movilización de las HSC, sino también un regulador de la quiescencia [7].

En la matriz extracelular, la fibronectina, el colágeno y la laminina son ligandos para las integrinas que no sólo controlan el anclaje y la migración de las HSC, sino también activan las vías de transducción de señales en estas células. Se ha reportado que la interacción de las HSC con la fibronectina, aumenta el crecimiento y supervivencia de las HSC. En cultivos de MO a largo término, las HSC residen preferencialmente en la monocapa de células adherentes. La formación de células sanguíneas en estos cultivos puede ser bloqueada por inhibición específica de las interacciones entre las células estromales y las hematopoyéticas, lo que muestra la importancia de estas interacciones [4]. El SCF y la TPO son dos citoquinas fundamentales para las HSC. El SCF se une al receptor c-Kit en las HSC para mediar sus efectos. El cultivo *in vitro* de las HSC revela el papel fundamental del SCF en la supervivencia de las HSC y su sinergismo con un número de citoquinas, incluyendo las interleuquinas (IL) -3, -6, -11, -12 y -27 y la TPO. La inactivación parcial del receptor c-Kit induce una menor capacidad de autorrenovación y la pérdida del estado de quiescencia en las HSC. Se ha reportado que un nivel bajo de expresión de c-Kit marca las HSC más quiescentes en ratones adultos, y que éstas pueden originar HSC con niveles más altos de expresión de c-Kit [7]. La TPO es otra citoquina importante que regula las HSC, junto con su receptor Mpl han mostrado ser cruciales para el mantenimiento de la quiescencia y autorrenovación de las HSC [4]. Se ha observado en cultivos *in vitro* que la TPO puede expandir eficientemente el número de HSC en combinación con el SCF ó IL-3; por el contrario, cuando esta citoquina se inactiva o deletiona, se incrementan las HSC quiescentes [7].

Además de contribuir a la pronta definición de los diferentes tipos de células, estos reguladores de desarrollo pueden actuar directamente sobre las poblaciones de células stem más maduras. Las proteínas Wnt, Hedgehog, BMP y el ligando Notch estimulan la activación y translocación de factores de transcripción en el núcleo, donde activan o reprimen los genes implicados en el desarrollo de órganos. Las proteínas Wnt funcionan para estabilizar la β -catenina, que se transloca al núcleo e interactúa con el denominado "lymphoid enhancer-binding factor" (LEF) y el factor de células T ó T-cell factor (TCF) induciendo la expresión de los genes Myc y ciclina D [35].

La señalización por Notch está altamente conservada en varias especies. Existen cinco ligandos Dll1, 3, y 4, y Jag 1, 2 y cuatro receptores Notch 1-4. Se conoce el papel de la señalización de Notch en la regulación del desarrollo de las HSC y diferenciación de células mieloides, de células B y T y también en los procesos de estrés hematopoyético. Se ha demostrado su papel durante la homeostasis hematopoyética, siendo dispensable para el mantenimiento de las HSC, pero indispensable para los estados de estrés *in vivo* [7].

1.3 Factores de transcripción que regulan a las HSC

Los factores de transcripción son determinantes para el destino de las HSC, es por eso que se ha investigado sobre un número de factores de transcripción que son esenciales para la autorrenovación de las HSC. La autorrenovación es la capacidad de una HSC de dar origen a una o dos células hijas idénticas a ella, sin diferenciarse. Esta capacidad se confiere durante el desarrollo temprano, pero también se utiliza durante el desarrollo de los órganos maduros, ya que éstas células además no pierden la capacidad de diferenciación [2, 35]. Este potencial de autorrenovación de las HSC está regulado por varias vías de señalización intracelular, activadas por factores de crecimiento y morfógenos, como los ligandos de Notch, proteínas Wnt y morfogenéticas óseas (BMP), que desencadenan señales que están involucradas en el desarrollo de casi todos los órganos que han sido estudiados. En las fases posteriores del desarrollo fetal y adulto, estas vías tienen efectos sobre el proceso de autorrenovación, produciendo un aumento en el tamaño del “pool” de células stem. Por ejemplo, la adición de Wnt3A, angiopoyetin-like factors o prostaglandina E2 PGE2, incrementan el número de células que se injertan después del trasplante de MO [36].

Algunos factores de transcripción pueden jugar distintas funciones en la hematopoyesis embriogénica o adulta. Por ejemplo, runt-related transcription factor 1 (RUNX1) es esencial para el desarrollo de HSC en embriones, pero no lo es para el mantenimiento de las HSC adultas [7]. RUNX1 es un importante factor de transcripción, gen supresor de tumores involucrado en la patogénesis de leucemias precursoras de células B y mieloides agudas. Se han encontrado mutaciones de pérdida de función en RUNX1 en muestras de leucemia linfoblástica aguda de células T inmaduras (LLA-T), sugiriendo un papel como supresor de tumores en la transformación de células T.

Por otra parte, la expresión de la familia de genes Hox (homeo box) impacta sobre la autorrenovación de las HSC y su desregulación sobre la transformación leucémica [37]; sin embargo, está por determinar el papel preciso de los genes Hox en el proceso de autorrenovación, al igual que su participación en los procesos de diferenciación y proliferación de las HSC, por ejemplo, se ha demostrado que Hoxb4 es un importante regulador de la proliferación de las células hematopoyéticas [38], y que la expresión Hoxa9 lleva a un aumento de la diferenciación de linaje mieloide y la leucemogénesis [39]. Los factores que regulan la expresión de genes Hox, participan también en la leucemia. Estos incluyen genes PBX y CDX. Del mismo modo, la expresión de genes PBX, Cdx o Meis en las células hematopoyéticas de ratón conduce a una mayor autorrenovación [36].

Los roles de ciertas moléculas pequeñas en la autorrenovación se han estudiado ampliamente. Los miembros de la familia FoxO (FoxO1, FoxO3, FoxO4, y FoxO6) son efectores críticos corriente abajo de la vía PI3K/AKT y están involucrados en la regulación del ciclo celular, la apoptosis, y la diferenciación de las HSC. Se ha encontrado que FoxO3 es el más importante de los genes de la familia FoxO en HSC, y su delección disminuye el nivel de reconstitución en trasplantes seriados. Además, Wang et al., mostraron que las HSC usan la autofagia para protegerse de la apoptosis inducida por estrés metabólico; en este proceso de auto-rescate, FoxO induce la expresión de genes de pro-autofagia en las HSC. La familia FoxO juega un papel importante en el mantenimiento de las células en G0 y la resistencia al estrés de las HSC [7, 40].

El oncogen Myc esta activado en el 1% de las LLA-T como resultado de traslocaciones; sin embargo, es activado en LLA-T y funciona como un gen blanco directo de Notch1, promoviendo el crecimiento y proliferación celular [41].

La autorrenovación también está relacionada con el ciclo celular. El factor asociado a la cromatina, proteína del complejo Polycomb, Bmi-1, está implicado en el programa de autorrenovación y la regulación directa de la transcripción del regulador INK4A en el ciclo celular. Bmi-1, es esencial para la autorrenovación de las HSC y células neuronales, y su ausencia en ratones Bmi-1^{-/-} resulta en una progresiva pérdida posnatal de células stem causando falla en la hematopoyesis[42]. La autorrenovación se modula también por modificaciones epigenéticas. La transcripción de genes se altera mediante la modificación de las histonas y los factores de transcripción por procesos tales como la fosforilación,

acetilación, ubiquitilación, sumoilación y metilación, importantes para la autorrenovación [36].

El complejo represor polycomb 2 (PCR2) induce una modificación represora de la cromatina (histona H3 lisina 27 trimetilada (H3K27me3)). Estudios recientes reportaron mutaciones de pérdida de función y deleciones en EZH2 en hasta el 25% de LLA-T. Además, la ablación condicional de EZH2 en progenitores hematopoyéticos tempranos usando un modelo de ratón knockout condicional reveló una alta frecuencia de leucemias de células T espontáneas, estableciendo que el complejo PRC2 como un supresor de tumores en la patogénesis de LLA-T[41].

Las leucemias surgen de la transformación maligna de progenitores hematopoyéticos, como resultado de un proceso oncogénico de múltiples pasos que involucran la activación constitutiva de señales como Notch y alteraciones genéticas en factores de transcripción, señalización de oncogenes y genes supresores [41], que a la vez intervienen en las fases de desarrollo embrionario, tanto tempranas como tardías, además de regular las características stem de las HSC [36, 43, 44]:

Factor de crecimiento o modulador químico: ligandos Notch (RBPJ y NICD), proteínas WNT (β -catenina, TCFs, y LEF), BMPs (SMAD4): mantenimiento de células stem, Angiopoyetin- like factors, trombopoyetina, ligando Kit, ácido retinoico, PGE2. Eje Lin28-let7-Hmga2.

Reguladores del ciclo celular. INK4A (p16) y INK4C (p18). PTEN, p53 y c-Myc (disminuyen la autorrenovación).

CDX y proteínas HOX.

Incrementan la autorrenovación al sobreexpresarse: Hoxa7, Hoxa9, Hoxa10, Hoxb4.

Sobreexpresados en leucemia: CDX2, CDX4.

Factores de transcripción: GATA2 y 3, GF11, TEL, JUNB, SOX17, PU.1, Myb, CBP, ZFX, RUNX1, SCL, Foxo3a.

Factores asociados a la cromatina: Bmi-1, EZH2, MLL, RAE28.

Se conocen desde 2006, 5 factores de transcripción (Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4, NANOG) capaces de reprogramar un fibroblasto para convertirse en células stem pluripotentes

inducidas (iPS), que se asemejan a una célula stem embrionaria (ESC), es decir son capaces de des-diferenciar una célula adulta diferenciada. Este hallazgo sugiere que la sobreexpresión de factores de transcripción fundamentales pueden inducir tanto la pluripotencia como la autorrenovación [36].

1.4 Reguladores del ciclo celular de las HSC

Las HSC se mantienen en un número relativamente constante durante la vida, por el balance entre la autorrenovación y la diferenciación. En principio, las HSC se encuentran en la fase G0 en el ciclo celular en el nicho de la MO hipóxica bajo condiciones homeostáticas. Luego de su entrada en ciclo celular, las HSC dan origen a poblaciones progenitoras que se expanden masivamente para satisfacer las necesidades de células sanguíneas sobre la base diaria o en respuesta al estrés [7].

La regulación del ciclo celular de las HSC es determinante para la progresión de la hematopoyesis. La maquinaria molecular que gobierna el ciclo celular en los mamíferos consiste en una familia de proteínas quinasas serina/treonina llamadas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La activación de las CDKs requiere de la unión con subunidades regulatorias de ciclinas. La actividad del complejo CDK/ ciclina es regulada por los inhibidores de CDK. Este proceso es regulado por señales del microambiente donde ocurre la hematopoyesis, por lo tanto la caracterización de las citoquinas y factores de crecimiento presentes y los componentes de la matriz extracelular, y la manera como regulan la actividad de las HSC es esencial para el desarrollo de nuevas estrategias para la manipulación terapéutica de las HSC [4].

p16 se expresa en las células CD34+ y disminuye durante la diferenciación a progenitores, lo que sugiere que juega un papel en la quiescencia de las HSC. Sin embargo, ratones p16^{-/-} no mostraron anomalías en la hematopoyesis; se cree entonces que p16 no es indispensable para el mantenimiento de la quiescencia de las HSC, al menos en ratones jóvenes [4]. La delección del gen supresor de tumores p-16 está implicada en la leucemogénesis, jugando un papel importante en la regulación de la hematopoyesis normal. Existe evidencia de que la restauración de p16INK4a dentro de líneas celulares leucémicas deficientes de p16INK4a reduce su tasa de proliferación en cultivo y suprime su capacidad para formar colonias en cultivos sólidos. La acción de las proteínas INK4 y en

especial, p16, como supresores del crecimiento en la hematopoyesis normal, consistente con la delección de INK4, aumentan la tasa de crecimiento de las colonias de las células hematopoyéticas y la multiplicación de células progenitoras hematopoyéticas *in vitro*, dependiendo del nivel de la proteína p16INK4a en las células. Consistente con datos de las células CD34+ humanas, unidades formadoras de colonias- granulocitos macrofagos CFU-GM de ratones p16-/- incrementaron su tasa de crecimiento y su capacidad de “replateo” consistente con el requerimiento de incremento de la autorrenovación para la expansión clonal [45]. Estudios con ensayos de trasplantes competitivos con dilución limitante, mostraron un incremento en el número absoluto de células con capacidad de repoblar a largo término en animales viejos comparados con animales jóvenes deficientes de p16-/-; se concluye que la presencia de p16INK4a restringe el número de HSC. Varios reportes muestran una regulación a la alta de p16 bajo condiciones de estrés celular [4, 46]. Bajo estrés del trasplante seriado de MO, la expresión de Arf se incrementó dramáticamente en la población Lin-Kit+Sca1+, la expresión de Arf induce muerte celular. La ausencia dual de p16INK4a y Arf, ó sólo de Arf, no resulta en ningún defecto en el trasplante seriado en animales jóvenes [46].

Stepanova et al., encontraron que las HSC frescas de ratones Arf-/- o Ink4a-Arf-/- tenían capacidad de repoblar huéspedes irradiados con la misma eficiencia que las HSC tipo silvestre. La delección de Arf o Ink4a-Arf no mostró ningún efecto sobre la pérdida de las HSC en cultivo [42].

1.5 Nicho de células stem leucémicas (LSC)

El hallazgo de que sólo una minoría de las células tumorales son clonogénicas cuando se colocan en cultivo o se inoculan en ratones inmunodeficientes, permitió postular la existencia de las células stem cancerosas (CSC) [47]. Se demostró por primera vez en la leucemia mieloide aguda (LMA) [48] y posteriormente para muchos tipos de tumores. Diferentes experimentos sugieren que las propiedades del nicho hematopoyético para mantener las características y funciones de las HSC pueden ser explotadas por otros tipos celulares tumorales. Los conocimientos actuales sobre estos eventos, son derivados de co-cultivos entre las células leucémicas y las MSC. En este contexto las MSC pueden alterar su comportamiento, resultando en un incremento de la producción de citoquinas que inducen proliferación y supervivencia de las células leucémicas [49]. Las LSC son

capaces de generar clones leucémicos con una organización jerárquica similar a la de las HSC [50]. Se ha postulado que los mismos mecanismos moleculares que regulan la quiescencia de las HSC normales podrían facilitar la supervivencia de las LSC.

En efecto, las MSC alteran la movilización, homing y adhesión de las LSC. La interacción entre las células de leucemia mieloide aguda (LMA) por medio de la integrina VLA-4 a través de ligandos como la fibronectina del microambiente juega un papel importante en la generación de la Enfermedad Mínima Residual [51]. La molécula de adhesión CD44 juega un papel importante en el homing de las LSC en el nicho hematopoyético, para conservar un estado primitivo [52]. CD44 está involucrada en la adhesión célula-célula y a la matriz extracelular a través de la interacción de varios ligandos como el ácido hialurónico y glucosaminoglicanos, altamente concentradas en el endostio [53]. La unión de las integrinas con su respectivo ligando activan vías de señalización que promueven la supervivencia celular. La quinasa unida a integrinas (ILK), interactúa directamente con β -catenina y fosforila Akt por un mecanismo dependiente de la fosfatidil-inositol 3 quinasa (PI3K). El contacto directo de las células leucémicas con las MSC induce la activación de la vía de señalización ILK/Akt/GSK3 β , la cual modula la vía de señalización de Notch y STAT3 promoviendo la supervivencia de las células leucémicas [54].

Se conoce que las interacciones entre las HSC y las células del nicho mantienen la capacidad de autorrenovación y de diferenciación de las células stem. Diferentes estudios han demostrado la dependencia de las HSC normales como también las leucémicas sobre tipos específicos de células del nicho. Usando un modelo de trasplante Nalm-6 pre-B LLA y biopsias de MO de pacientes, se encontró que las células leucémicas prefieren situarse en regiones vasculares con abundante CXCL12 y E-selectina [55].

La noción de que las LSC comparten las funciones stem (en inglés stemness) de las HSC ha impulsado estudios sobre la interacción entre células leucémicas y el microambiente de la MO. Recientemente, usando modelos animales de leucemia, se reportaron cambios en el número de MSC y osteoblastos, similar a lo observado en pacientes con LMA con una significativa pérdida de la población de MSC, asociada con la pérdida de la colonización y la autorrenovación [50]. Aunque las HSC inducen cambios transcripcionales en las MSC, los blastos leucémicos reprograman el transcriptoma de las MSC de una manera diferente a las HSC, regulando a la baja genes que promueven el ciclo celular y sobre-regulando genes relacionados con la expresión de citoquinas. Las MSC alteradas restablecen el

nicho por la alteración de la expresión de moléculas como JAG1 y CXCL12. Consecuentemente, las MSC leucémicas suprimen las funciones de las hematopoyéticas normales mientras comparten la actividad leucemogénica y la quimioresistencia de las células leucémicas, contribuyendo al dominio de las células leucémicas sobre su contraparte las HSC normales en la MO [56]. Los mecanismos celulares y moleculares responsables de los cambios en el estroma en paciente con LMA no están aún bien definidos. Estudios recientes en modelos animales demostraron una excesiva secreción de citoquinas [57-59]; sin embargo, estudios recientes demuestran subtipos heterogéneos de MSC en la MO que exhiben diferente función en el nicho, jugando un papel diferente en el mantenimiento y autorrenovación de las HSC, como en el microambiente para las LSC, llevando a una heterogeneidad en el nicho estromal. El remodelamiento del microambiente de la MO inducido por la leucemia es una parte intrínseca de la leucemogénesis[50].

Las células leucémicas presentan un impacto negativo sobre las células hematopoyéticas normales. Al menos tres posibles escenarios para explicar los efectos negativos se han descrito: Primero, las células leucémicas secretan citoquinas o sustancias que inhiben el crecimiento normal y función de las células hematopoyéticas normales (independiente del nicho); segundo, las células leucémicas compiten con las células normales por el mismo espacio (dependiente del nicho, sin alteración del nicho); y tercero, las células leucémicas remodelan el nicho de la MO para favorecer la supervivencia o crecimiento de las células leucémicas sobre las células hematopoyéticas normales (dependiente del nicho, con alteraciones del nicho). Aunque cada uno de estos mecanismos puede ser válido para ciertos tipos de leucemia o en una etapa específica del desarrollo de la leucemia, es probable que ciertos mecanismos coexistan y cooperen para mantener o promover el estado de la enfermedad o su progresión [60].

Por otra parte, se ha demostrado que el crecimiento de las células leucémicas crea un microambiente tumoral e interrumpe la hematopoyesis normal [61]. Las células leucémicas migran al nicho vascular por un mecanismo dependiente de SDF-1. Estas ocupan los mismos espacios anatómicos que las HSC en MO [62]. Esto da como resultado un desplazamiento de las HSC a otros nichos laterales atípicos. En el modelo murino, después de un mes del trasplante de células leucémicas, la producción de SDF-1 en el nicho vascular disminuyó significativamente. Las células HSC migraron a los nichos leucémicos

a través de un mecanismo independiente de SDF-1. Por el contrario, estas se movilizaron por un gradiente de concentración dependiente de SCF, secretado en abundancia por las células leucémicas en el nicho leucémico [63].

Las células leucémicas producen altos niveles de stem cell factor (SCF) por lo que las HSC normales son atraídas hacia regiones de una carga mayor de crecimiento de células leucémicas, por lo que las HSC disminuyen su número y su capacidad para movilizarse hacia la circulación periférica en respuesta a la estimulación de la citoquina [60].

Otras investigaciones en modelos experimentales han demostrado que el nicho hematopoyético puede ser transformado en un microambiente que favorece la proliferación de las LSC y desplaza las HSC a nichos alternos alterando su funcionalidad [64]. Es decir que las células del estroma influenciadas por las células leucémicas pierden la función principal de mantener la quiescencia de las HSC, sin embargo, el mecanismo molecular de esta desregulación aún se desconoce.

En un reporte reciente, Schepers et al., describieron cómo las células mieloides malignas reprograman los osteoblastos del endostio de la MO dentro del nicho de la MO pro-inflamatorio que soporta las LSC creando un ambiente hostil para las HSC normales [59]. La transformación leucémica de células normales se puede desencadenar por alteraciones del microambiente de la MO, como se ha observado en un paciente con síndrome de falla de la MO (anemia aplásica) [65], sugiriendo que la disfunción estromal primaria puede resultar en enfermedad neoplásica secundaria, soportando el concepto de oncogénesis inducida por el nicho.

Las LSC reciben soporte del nicho de la MO para su supervivencia, lo cual puede asociarse con desregulación de este nicho por señales que promueven la proliferación. Se ha demostrado que la señalización de beta-catenina tiene un rol central en la autorrenovación de células stem de LMA y leucemia mieloide crónica (LMC). Zhao et al. demostraron que la delección de beta-catenina causa una profunda reducción en la capacidad de los ratones de desarrollar LMC-ABL [66]. Wang et al. mostraron en un modelo murino que las LSC derivadas de leucemia inducidas por MLL-AF9 requerían la vía de señalización Wnt/beta-catenina para la autorrenovación [67]. Entonces, la activación de las vías de autorrenovación a través de la señalización Wnt/beta-catenina podría ser causada por un

estímulo del microambiente [61]. Recientemente, se mostró que el eje N-cadherina y Wnt- β -catenina juega un rol importante en la protección de las LSC de LMC mediada por el microambiente a partir del tratamiento con un inhibidor de tirosina quinasa, sugiriendo este eje como potencial blanco para la erradicación de la leucemia residual en paciente con LMC [68].

Por otra parte, las células de mieloma inhiben la activación de Wnt en el microambiente a través de la liberación de Dickkopf homólogo-1 (DKK1) soluble, el cual causa un incremento en la concentración de RANKL y una disminución en la producción de osteoprotegerina, resultando en un incremento de la activación de osteoclastos y la destrucción ósea [69]. La activación de NF- κ B o la ausencia del inhibidor I κ B α en células mielopoyéticas cambia el compartimiento no-hematopoyético, resultando en un incremento en el número de células hematopoyéticas displásicas con progresión a LMA secundaria vía regulación positiva de la expresión perinatal de Jag-1 en hepatocitos I κ B α Δ/Δ y activación de Notch1 en neutrófilos [70]. Estos hallazgos indican que un desorden hematopoyético premaligno puede ser iniciado por células no-hematopoyéticas con inactivación I κ B α , seguramente vía activación de Notch. La activación de Jagged/Notch resulta en un incremento en el número de HSC y expansión del nicho [1]. Adicionalmente, otros estudios han mostrado que el supresor de tumor FBXW7, que regula negativamente los niveles de la ciclina E, Notch y c-Myc, juega un papel en el mantenimiento de la quiescencia de las HSC y reprime la actividad oncogénica potencial de las HSC [71].

El balance entre células hematopoyéticas primitivas y maduras es gobernado por concentraciones específicas de quimoquinas y citoquinas en la MO. La alteración de los factores solubles o de su concentración puede cambiar la función de las células normales, especialmente de las HSPC, incluyendo su homing, retención y diferenciación, como lo demuestran ensayos descritos donde el plasma de MO leucémica fue capaz de suprimir la proliferación de las HSC [57]. Zhang et al., reportaron que las células leucémicas disminuyeron la expresión de CXCL12 en MO de LMC e incrementaron la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), llevando a un defecto en el homing y retención de las HSC en la MO. También demostraron que las concentraciones de varios factores solubles incrementaron en la MO de LMC, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-1 α , IL-1 β y TNF- α , y estos fueron capaces de alterar la función de las HSC y aumentar la proliferación de las

células leucémicas. Por otra parte, también se han encontrado altos niveles de IL-6, tanto en ratones como en humanos con LMC, siendo capaz de alterar la funcionalidad de las HSPC normales [60].

Esto pone de relieve la necesidad de establecer un sistema de cultivo que 1) se asemeje al nicho leucémico in vivo, 2) permita hacer una evaluación de las características y funcionalidad de las HSC sin interferencias con células leucémicas, y 3) permita entender los cambios inducidos en las HSC, en particular las bases biológicas y moleculares de sus propiedades stem, esto es la autorrenovación y la quiescencia.

2. Justificación

La investigación en HSC es muy prometedora para la regeneración del tejido hematopoyético afectado por la isquemia, la inflamación ó la degeneración. Las HSC son una única población de células stem multipotentes que han sido identificadas como potenciales candidatas para el tratamiento de un gran número de condiciones patológicas. La información sobre las bases biológicas de las células stem, sigue siendo insuficiente para entender los mecanismos de diferenciación y desarrollo de las células hematopoyéticas. Además, no es claro cómo los mecanismos de mantenimiento y funcionalidad usados por las células stem se afectan durante el proceso de la leucemogénesis. Estudiar el potencial de autorrenovación y la quiescencia de las células CD34+ a partir de un modelo *in vitro* de NL, utilizando medio condicionado de células leucémicas (REH) en co-cultivo con MSC, nos permitirá entender las bases moleculares, al igual que los factores intrínsecos (autónomos) y extrínsecos que regulan la autorrenovación y la quiescencia en un microambiente leucémico. Esto es de particular interés no solo en la biología del nicho en condiciones normales y patológicas, sino también como una herramienta en la búsqueda de nuevas terapias. La utilización de medio condicionado de células leucémicas nos permitirá evaluar el papel de los factores secretados al medio e identificar dianas moleculares implicadas en la hematopoyesis normal y leucémica, que permitan una mayor comprensión de la contribución del nicho de la MO para el proceso leucémico y proporcionen nuevos blancos para la destrucción de las LSC, sin afectar la autorrenovación normal de las HSC.

3.Pregunta de investigación

¿Cómo se altera el potencial de autorrenovación y la quiescencia de las células stem hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical en un modelo *in vitro* de nicho leucémico?

4. Formulación de hipótesis

El contacto de las HSC con un microambiente aberrante, el nicho leucémico, modifica sus propiedades stem, en términos de potencial de autorrenovación y quiescencia.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar en un sistema *in vitro* de nicho leucémico la quiescencia y el potencial de autorrenovación de las CD34+ aisladas de sangre de cordón umbilical.

5.2 Objetivos específicos

- 5.2.1. Establecer un sistema *in vitro* de nicho leucémico con medio condicionado de células de leucemia linfoblástica aguda (REH) que facilite la evaluación de las CD34+
- 5.2.2. Analizar las fases del ciclo celular de las células CD34+ en el nicho leucémico *in vitro*.
- 5.2.3. Evaluar y comparar la expresión de genes asociados a la quiescencia de las células CD34+ (GATA2 y p53) en el nicho leucémico.
- 5.2.4. Determinar la expresión de genes involucrados en la autorrenovación de las células CD34+ (GATA2 y 3, Sox17, Runx-1, Foxo3a, Lin28, Smad4, Ang1, Tie2, Hoxb4, Bmi-1, Hoxa7, EZH2, c-Kit, Klf4, Oct4, Sox2, c-Myc, NANOG) en el nicho leucémico.
- 5.2.5. Evaluar los efectos del nicho leucémico sobre la migración dirigida, la adhesión a MSC, los marcadores primitivos y de diferenciación y la capacidad multipotente de las células CD34+.

6. Métodos

6.1 Aislamiento de células CD34+ de Sangre de Cordón Umbilical (SCU)

Las muestras de SCU se obtuvieron de gestantes con un único parto a término, sin complicaciones y sin comorbilidades, después de obtener el consentimiento informado y de acuerdo con las guías aprobadas por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia. Las células mononucleares totales (CMT) se aislaron en gradiente de densidad en Ficoll-Hypaque y las células CD34+ se purificaron usando un kit de aislamiento CD34+ MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). Las CMT se resuspendieron en buffer fosfato salino PBS (1X), albumina sérica bovina al 7.5% BSA y ácido etilendiaminotetraacético EDTA a 2 mM y se incubaron con FcR Blocking Reagent human por 15 min a 4°C. Posteriormente, se incubaron con anticuerpos monoclonales conjugados con perlas magnéticas contra CD34 (clone QBEND 10) por 50 min a 4°C. Se realizó la separación de la suspensión celular por medio de columnas LS (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) previamente lavadas con buffer de lavado (PBS-BSA-EDTA), realizando la retención de las células CD34+ por inmunomagnetismo. Después se realizaron múltiples lavados de la columna con BSA-EDTA-PBS, la columna se removió del magneto, recuperando las células CD34+. Las células se pasaron por segunda vez por una nueva columna repitiendo los pasos de purificación. La pureza se evaluó por citometría de flujo usando un anticuerpo anti-CD34 conjugado a allophycocyanin (APC) (anti-human, clone AC136, Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) y la viabilidad celular (>95%) por exclusión del colorante Azul de Tripan al 0.4%.

Se realizó la tinción con el colorante Wright sobre las células CD34 purificadas, realizando el extendido de la suspensión sobre una lámina portaobjetos. Se dejó secar al ambiente y

se cubrió completamente el portaobjetos con el colorante Wright gota a gota por un tiempo de 5 a 8 minutos para fijar las células. Luego, se agregó directamente al colorante un volumen igual de Buffer Giordano o agua desionizada, para ajustar el pH. Se esperó por 10 min la formación del brillo metálico. Finalmente, se lavó con abundante agua hasta que el extendido sobre el portaobjetos tomará un color rosado a simple vista. Se dejó secar al ambiente y se observó al microscopio en objetivo 100X de inmersión.

6.2 Aislamiento y caracterización de las MSC de MO

Las MSC de aspirado de MO, previamente aisladas y criopreservadas en el laboratorio, se cultivaron, expandieron y caracterizaron de acuerdo con los criterios de la International Society for Cell Therapy (morfología, expresión de marcadores y la capacidad para diferenciarse a osteocitos, condrocitos y adipocitos) [12], para su uso posterior en nuestros experimentos entre los pases 3-5. Después del pase 3, las células adherentes se tripsinizaron y se marcaron con los siguientes anticuerpos monoclonales: CD73 conjugado a ficoeritrina phycoerythrin (PE) (mouse anti-human, clone AD2, BD Pharmingen, San José, CA, USA), CD105 conjugado a alofococianina allophycocyanin (APC) (anti-human, clone SN6, Invitrogen, Frederick, MD, USA), CD90 conjugado a isotiocianato de fluoresceína Fluorescein isothiocyanate (FITC) (mouse anti-human, clone F15-42-1, Abcam, Cambridge, MA, USA), y CD44 conjugado a FITC (anti-human, clone MEM-85, Invitrogen, Frederick, MD, USA). Además, el anticuerpo específico para leucocitos CD45 conjugado a PerCEP (mouse anti-human, clone 2D1, BD Biosciences, San José, CA, USA) y CD34 conjugado a APC (anti-human, clone AC136, Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). Los datos se adquirieron usando el Citómetro de Flujo FACS Aria II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). FACS Diva software y FlowJo, se usaron para el análisis de datos.

La capacidad de diferenciación a diferentes linajes mesenquimales se determinó usando inducciones y coloraciones específicas [72]. 2×10^4 MSC en pase 3 se cultivaron en una placa de 24 pozos en medio de cultivo Iscove's Modified Dulbecco's Medium IMDM hasta alcanzar una confluencia del 80%. Para la diferenciación adipogénica, las células se cultivaron por 14 días en medio de inducción adipogénico Minimum Essential Medium MEM α suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, dexametasona a 1 mM, isobutilmetilxantina a 0.5 mM, indometacina a 200 μ M, e insulina a 10 μ g/mL (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) y medio de mantenimiento (MEM α , suplementado con SFB al

10% e insulina a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$); se realizó cambio de medio cada tercer día. La diferenciación osteogénica se indujo por incubación con el medio de inducción osteogénico suplementado con MEM α suplementado con SFB al 10%, dexametasona a 100nM, ascórbico-2-fosfato a 0.2 mM, y β -glicerofosfato a 10 mM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) por dos semanas. Finalmente, para la diferenciación condrogénica, las células se cultivaron en medio de inducción condrogénica MEM α y TGF β -1 a 10 ng/mL (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 28 días. Las células se lavaron con PBS (1X), se fijaron con Formalina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 10 minutos a TA, y se colorearon con 0.35% de solución Oil Red O (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) para la diferenciación adipogénica, fosfatasa alcalina (AP staining kit, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) para diferenciación osteogénica o con 0.1% de Safranin O (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) para diferenciación condrogénica. Las células se examinaron en un microscopio invertido (Eclipse Model TS-100, Nikon, Konan, Minato-ku, Tokyo, Japan) y se hizo un registro fotográfico con una cámara Power Shot A460 Zoom Browser EX software (Canon, Melville, NY, USA).

6.3 Preparación de Medio Condicionado (MECO) de células REH (MECO-REH)

La línea celular REH fue obtenida de American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA) y fue caracterizada por citometría de flujo por la presencia de CD44, CD133, CD38, CD45, y CD19 (datos no mostrados). 2×10^5 células REH/mL se cultivaron en medio RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) suplementado con piruvato de sodio al 1%, aminoácidos no esenciales MEM 100X al 1% y SFB al 1% por 24 h a 37°C y 5% CO₂ en frascos de cultivos de 75 cm². Seguido, las células REH se centrifugaron a 500g por 7 min, el sobrenadante se colectó y se filtró a través de filtros de membrana de 0,22 μm de tamaño y se usó fresco en todos los experimentos.

6.4 Establecimiento del nicho leucémico (NL)

Las MSC al 80% de confluencia se co-cultivaron por 3 días con MECO-REH fresco. Después de la adición del MECO-REH, se detuvo la división celular de las MSC y éstas no incrementaron su número (datos no mostrados). Se realizó recambio de MECO-REH fresco al segundo día de co-cultivo con MSC. Después de tres días, el MECO-REH se

removió con cuidado de todos los pozos y se añadieron a este NL las células CD34+ recién aisladas (frescas) a una densidad de hasta 100.000 células /mL. Simultáneamente, las CD34+ frescas a partir de SCU se colocaron sobre una monocapa de MSC a la misma confluencia del 80%, para el establecimiento del nicho normal (NN) al 10% de SFB (NN10). Se tuvo como control un NN al 1% de SFB (NN1) en las mismas condiciones de cultivo del NN. Para la comparación entre nuestro NL con MECO-REH y el NL con células REH[73], este último se estableció al igual con MSC al 80% de confluencia co-cultivadas por tres días con $3-5 \times 10^4$ células REH. Después de tres días, la mayoría de células REH fueron removidas empleando una pipeta y con lavados con PBS (1X) frío y PBS más 1 mM EDTA (1X). Igualmente, 100,000 células CD34+/mL se co-cultivaron con las células MSC-REH. Las evaluaciones de las células CD34+ en los diferentes nichos se realizaron después de 3 días de co-cultivo.

6.5 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Las células CD34+ frescas y obtenidas a partir de ambos NNs y del NL después del co-cultivo con MSC por tres días, se fijaron con formaldeído al 4% y se permeabilizaron con Triton X-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) al 0.1% por 10 min a TA. Las células se marcaron por 30 min a TA con el anticuerpo monoclonal Ki-67 conjugado a APC (anti-human, clone Ki-67, Biologend) y se incubó con Hoechst 33342 (2'-[4-ethoxyphenyl-5-4-methyl-1-piperazinyl-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride trihydrate) (Hoechst 33342, Invitrogen, Eugene, OR, USA) (contenido 2n ADN, G0/G1; contenido >2n ADN, S-G2-M) por 45 min a 37°C. Finalmente, los sobrenadantes se removieron y las células se resuspendieron en PBS (1X) para la evaluación por citometría (FACSAria™ II, BD Biosciences). FlowJo y FCS Express For Cytometry Data Analysis Softwares v5.0 (De Novo Software, Glendale, CA, USA) se utilizaron para el análisis de datos.

6.6 Análisis de expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real - SYBR Green

Las células CD34+ frescas y las CD34+ obtenidas de los NNs o del NL se lavaron con PBS (1X) y el RNA total se extrajo con TRizol reagent (Life Technologies Corporation, Invitrogen, Carlsbad, CA 92008 USA). El RNA obtenido se cuantificó por métodos fluorogénicos (NanoDrop 2000C UV-Vis spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) y se almacenó a -70°C hasta su análisis; se realizó una evaluación

cualitativa por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El DNA genómico contaminante se removió de las muestras de RNA con DNase I Kit (Life Technologies Corporation, Invitrogen, Carlsbad, CA 92008 USA). La transcripción reversa se realizó usando High Capacity Kit (Life Technologies Corporation, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a partir de 1000 ng RNA. La qRT-PCR se realizó en el equipo 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con el SYBR Green Master Mix (Life Technologies Corporation, Applied Biosystems, Woolston Warrington, UK). Las reacciones se hicieron por triplicado para cada muestra y en tres experimentos independientes. El volumen total de la reacción fue de 20 μ L (incluyendo 0,5 μ L cDNA, SYBR Green, y 0.1 mM de primers). Los niveles relativos de expresión génica se normalizaron a los niveles del transcrito RPS18 y se calcularon usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Se realizó un tamizaje de 19 genes seleccionados. Las secuencias de los primers se determinaron usando BLAST Basic Local Alignment Search Tool basadas en publicaciones previas; los primers forward y reverse utilizados se enlistan a continuación: GATA2 forward, 5'-CGTTCCTGTTTCAGAAAGGC-3'; reverse, 5'-GTTCTGCCCATTCATCTTGT-3'; Runx.1 forward, 5'-CTGTGTAGGGGAGCCACATT-3'; reverse, 5'-CTTGTCTCCACTGAGGCACA-3'; p53 forward, 5'-CTGCCCTCAACAAGATGTTTTG-3'; reverse, 5'-CTATCTGAGCAGCGCTCATGG-3'; Foxo3a forward, 5'-TCTACGAGTGGATGGTGCGTT-3'; reverse, 5'-CGACTATGCAGTGACAGGTTGTG-3'; Smad4 forward, 5'-ACAAGTCAGCCTGCCAGTATACT-3'; reverse, 5'-GGTGGTAGTGCTGTTATGATGGTAAG-3'; Angpt1 forward, 5'-CTCCCTTCCAGCAATAAGTGT-3'; reverse, 5'-AGCCCGACAGTCAGTGGAGT-3'; Tie2 forward, 5'-CTGTGAAGGGCGAGTTCGA-3'; reverse, 5'-TGGTAGGAAGGAAGCTTGTGAC-3'; p16 forward, 5'-GAAGGTCCCTCAGACATCCCC-3'; reverse, 5'-CCCTGTAGGACCTTCGGTGAC-3'; EZH2 forward, 5'-TTGTTGGCGGAAGCGTGAAAATC-3'; reverse, 5'-TCCCTAGTCCCGCGCAATGAGC-3'; CD34 forward, 5'-AAACTACAACACCTAGTACCCTTGGAA-3'; reverse, 5'-GAATTTGACTGTGTTTTCTGTGATG-3'; c-Kit forward, 5'-ATTTTCTCTGCGTTCTGCTCCTAC-3'; reverse, 5'-GCCCACGCGGACTATTAAGTCTGAT-3'; CXCR4 forward, 5'-GCATGACGGACAAGTACAGGCT-3'; reverse, 5'-AAAGTACCAGTTTGCCACGGC-3'; Notch1 forward, AATGTGGATGCCGCAGTTGT;

reverse, GATGTCCCGGTTGGCAAAG; Bmi-1 forward, 5'-TAAGCATTGGGCCATAGT-3'; reverse, 3'-ATTCTTTCCGTTGGTTGA-5'; Hoxb4 forward, TACCCTGGATGCGCAA; reverse, CAGGTAGCGGTTGTAGTGAAATTC; c-Myc forward, 5'-GAGCTGTTTGAAGGCTGGATTT-3'; reverse, 3'-TCCTGTGGTGAAGTTCACGTT-5'; Oct-4 forward, AGTTTGTGCCAGGGTTTTTTG; reverse, CTTCACCTTCCCTCCAACC; Klf4 forward, TATGACCCACACTGCCAGAA; reverse, TGGGAACTTGACCATGATTG; NANOG forward, CCTGTGATTTGTGGGCCT; reverse, GACAGTCTCCGTGTGAGGCAT; RPS18 forward, GATGGGCGGCGGAAAATA; reverse, GTACTGGCGTGGATTCTGCATA.

6.7 Evaluación de la actividad de β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β GAL)

La actividad de SA- β GAL se evaluó en las MSC después de la incubación con MECO-REH en las mismas condiciones como se describió anteriormente. Para este propósito se utilizó el kit Cellular senescence assay kit (KAA002, Millipore, Darmstadt, Germany). Las MSC se sembraron por duplicado en placas de 24 pozos, se lavaron con PBS (1X), y se fijaron con formalina por 10 min a TA. Luego las MSC se lavaron con PBS (1X) y se incubaron a 37°C con el sustrato β -gal en un buffer ácido (pH 6.0) y bajo condiciones hipóxicas, se examinaron con un microscopio invertido (Nikon, Modelo TS-100) y se tomó registro fotográfico Power Shot A460 Zoom Browser EX software (Canon, Melville, NY, USA). El desarrollo de un color azul perinuclear se registró como senescencia.

6.8 Evaluación de la migración de las células CD34+

Los filtros transwell (Corning Costar, Tewksbury, MA, USA) con 5 μ m en el tamaño del poro, 6.5 mm de diámetro, insertados en una placa de 24 pozos se incubaron por 1 hora a 37°C con el buffer de migración (RPMI 1640 y BSA al 2%). 5×10^4 células CD34+ del NN10, NN1 y NL en 100 μ L de buffer de migración se adicionaron en la cámara superior. La cámara inferior se llenó con 600 μ L de buffer de migración que contenía el factor derivado de células estromales-1 α recombinante (rhSDF-1 α , Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) a una concentración de 100 ng/ml. Después de 4 h a 37°C en una incubadora a 5% de CO₂, las células que migraron a la cámara inferior se recogieron y se contaron en el citometro de flujo FACSAria II (BD Biosciences, San José, CA, USA). El número de células

que migraron se normalizaron a los controles no estimulados, los experimentos se realizaron por duplicado.

6.9 Adhesión de células CD34+ a MSC

Para los ensayos de adhesión a MSC, 6×10^4 MSC/mL se cultivaron por 24 h a 37°C y 5% CO₂ hasta el 80% de confluencia. Seguido, 1×10^5 células CD34+ obtenidas de los diferentes nichos se co-cultivaron con MSC por 4 h. Las células no-adherentes se removieron cuidadosamente con dos lavados con PBS (1X). Las células se incubaron con medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con SFB al 10%, piruvato de sodio al 1% y aminoácidos no esenciales al 1%. Se realizó registro fotográfico y el conteo con el Software ImageJ 1.47v.

6.10 Expresión de moléculas de adhesión en células CD34+ después del co-cultivo

Las células CD34+ se recogieron por repetidos pipeteos después de tres días en los nichos, se lavaron en PBS (1X), y se marcaron con los anticuerpos monoclonales CD49d conjugado a APC (mouse anti-human, clone 9F10, BD Pharmingen, San José, CA, USA), CD49e conjugado a PE (mouse anti-human, clone IIA1, BD Pharmingen, San José, CA, USA), CD44 conjugado a FITC (anti-human, clone MEM-85, Invitrogen, Frederick, MD, USA), y CD54 conjugado a APC (anti-human, clone REA266, Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) y se hizo lectura por citometría de flujo. La discriminación entre las pocas MSC presentes y las células CD34+ fue posible usando las diferentes señales forward scatter y side scatter. Las células muertas se excluyeron durante la adquisición y análisis de datos (gate: forward scatter intermedio y side scatter bajo). El software FlowJo (v10.0, FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA) y Paint-a-Gate (Pro v1.0, Becton Dickinson Biosciences, Sunnyvale, CA, USA) se utilizaron para el análisis de datos.

6.11 Expresión de marcadores primitivos en las células CD34+ después del co-cultivo

Las células CD34+ del NN o NL se lavaron con PBS (1X), y se marcaron con anticuerpos monoclonales CD34 conjugado a APC (anti-human, clone AC136, Miltenyi Biotec, Auburn,

CA, USA), CD133 conjugado a PE (anti-human, clone AC133, Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), CD38 conjugado a FITC (anti-human, clone IB6, Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), y CD117 conjugado a PE (anti-human, clone AC126, Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) y se analizaron por citometría de flujo como se describió anteriormente.

6.12 Capacidad clonogénica de las células CD34+

La detección y cuantificación de progenitores hematopoyéticos humanos en el NN y NL se realizaron con el ensayo de formación de colonias. Para esto, 0.5×10^3 CD34+/1.1mL se cultivaron por 10-15 días en medio completo con Eritropoyetina (EPO) para formación de colonias (StemMACS HSC-CFU Media, Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). Las colonias de progenitores eritroides y brotes eritroides (UFC-E y UFB-E), progenitores macrófago-granulocito (UFC-MG; UFC- G y UFC-M), y progenitores multipotenciales granulocito, eritrocito, macrófago y megacariocito (UFC-GEMM) se caracterizaron morfológicamente (www.stemcell.com) y se cuantificaron por microscopio invertido.

6.13 Determinación de citoquinas por citometría de flujo Cytometric Bead Array (CBA)

Para la determinación de la concentración de las citoquinas pro-inflamatorias en el sobrenadante de los diferentes cultivos se utilizó Cytometric Bead Array Kit (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, USA) para citoquinas inflamatorias humanas acopladas a perlas inmunomagnéticas, según las instrucciones del proveedor. Los sobrenadantes se obtuvieron a partir de 1) MSC después de tres días de cultivo en IMDM suplementado con SFB al 10%, piruvato de sodio al 1%, aminoácidos no esenciales MEM al 1% (GIBCO-Life Technologies, Grand Island, NY, USA); 2) MSC cultivadas en las mismas condiciones excepto por SFB al 1%; 3) células REH cultivadas en RPMI 1640 suplementado con SFB al 10%, piruvato de sodio al 1%, aminoácidos no esenciales MEM al 1%; 4) MECO-REH preparado como se indicó previamente; 5) el co-cultivo de MSC con células REH, y 6) MSC con MECO-REH. La concentración de citoquinas se evaluó por citometría de Flujo (FACSAria™ II). Se utilizaron softwares FlowJo y FCAP Array v3.0 s (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, USA) para el análisis de datos.

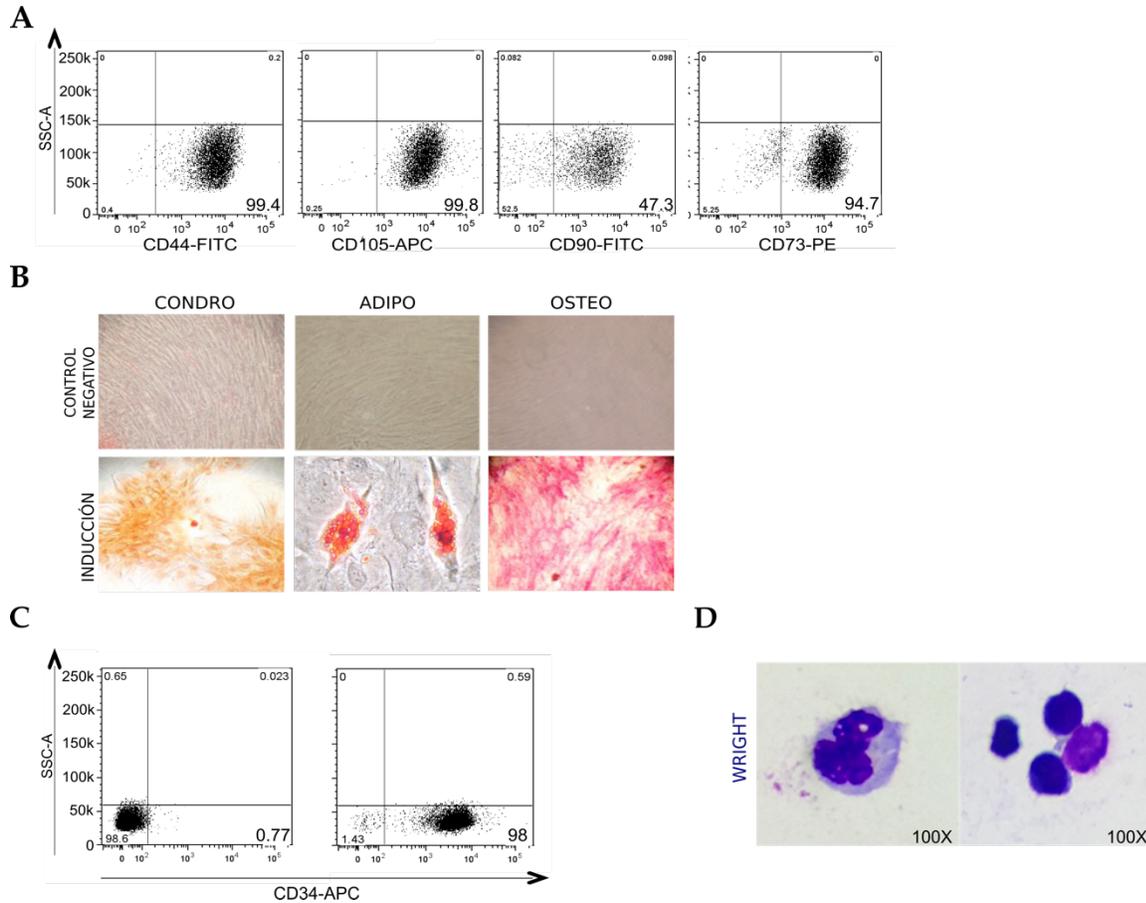
6.14 Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como la media \pm SEM, y se analizaron usando Student t test y Kruskal-Wallis test (non-parametric one-way ANOVA). La comparación se realizó con la prueba Dunn's multiple comparison. Para los cálculos matemáticos y la elaboración de gráficas se utilizó el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). El valor de $p < 0.05$ se definió como estadísticamente significativo.

7. Resultados

7.1 Establecimiento del NL con MECO-REH

Se estableció un NL *in vitro* por incubación de MSC (Figura 7-1A y 7-1B) con MECO-REH durante 3 días. Se determinó previamente que este NL simula correctamente un NL con células REH en las mismas condiciones [73]. En ese nicho establecido con células REH, las células leucémicas fueron difíciles de separar de las MSC por su fuerte adhesión, y por lo tanto se hizo difícil la evaluación molecular de las HSC después de añadirlas a ese NL con células REH. Por lo tanto, el establecimiento de un nicho leucémico sin células leucémicas (sin células REH) fue esencial para el estudio de la expresión génica en las células CD34+. La adición de MECO-REH fresco varias veces durante el período de incubación aseguró una permanente exposición a los factores solubles presentes en el MECO-REH, simulando la secreción permanente de las células REH. Después de 3 días de incubación, el MECO-REH se removió y las células CD34+ frescas (>95% pureza y >95% viabilidad celular) (Figura 7-1C y 7-1D) se añadieron por 3 días más, y se realizaron las evaluaciones posteriores. Como controles, las células CD34+ se co-cultivaron con MSC a la misma confluencia y en un medio de cultivo normal con SFB al 10% (NN10) o al 1% (NN1). Para la comparación, se realizaron las evaluaciones de las células CD34+ a partir de las CD34+ frescas en cada experimento.

Figura 7-1: Aislamiento y caracterización de células stem mesenquimales y células CD34+.

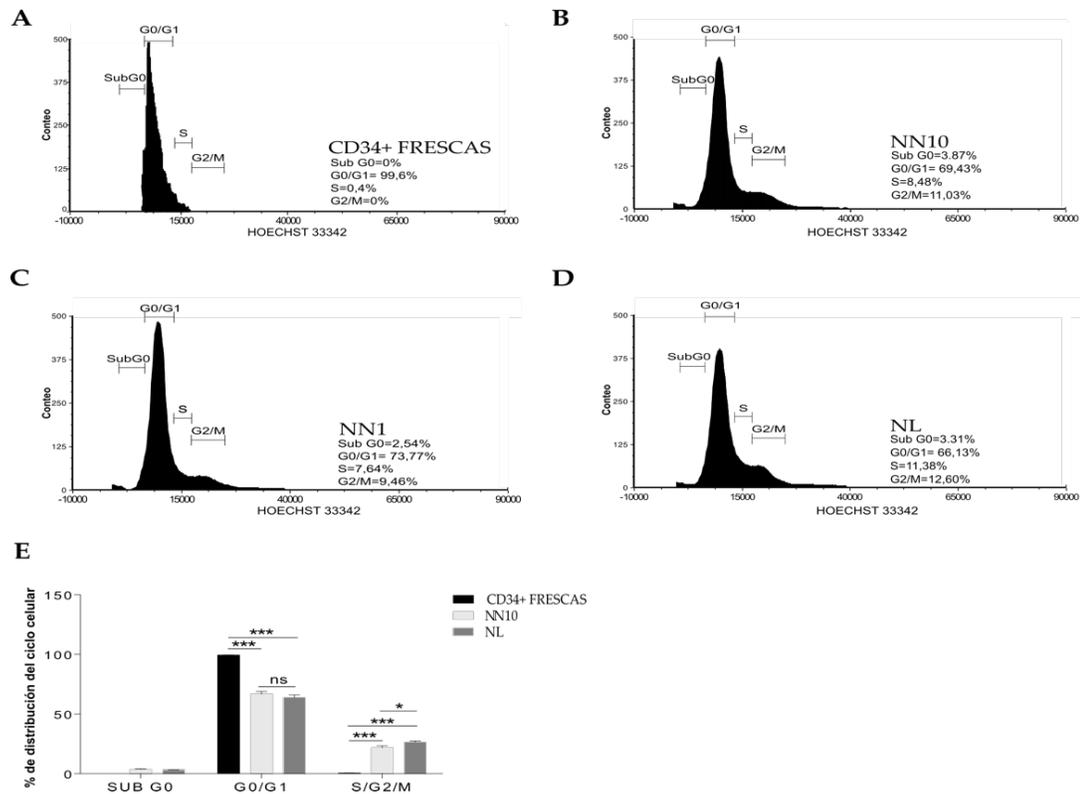
(A) Análisis de citometría de flujo mostrando la expresión de marcadores de superficie en las MSC (CD44, CD105, CD90, CD73) en ausencia de la expresión de CD45 y CD34 (no se muestra). Se muestra el porcentaje de positividad de cada marcador. **(B)** Diferenciación condro-, adipo-, y osteogénica de MSC de MO. **(C)** Las células CD34+ se aislaron de SCU humana por selección positiva. La evaluación de la pureza de las células CD34+ se realizó por citometría de flujo (>95% en todos los experimentos). **(D)** Microfotografía a 100X de células CD34+ purificadas teñidas con el colorante Wright. Se muestra un experimento representativo.

7.2 Proliferación de células CD34+ en el NL

Se realizó el análisis del ciclo celular por medio del colorante Hoechst 33342 en células CD34+ frescas y CD34+ obtenidas de los diferentes nichos (NN10, NN1 y NL). En las células frescas, casi toda la población (99.6%) se encontró en la fase G0/G1 del ciclo

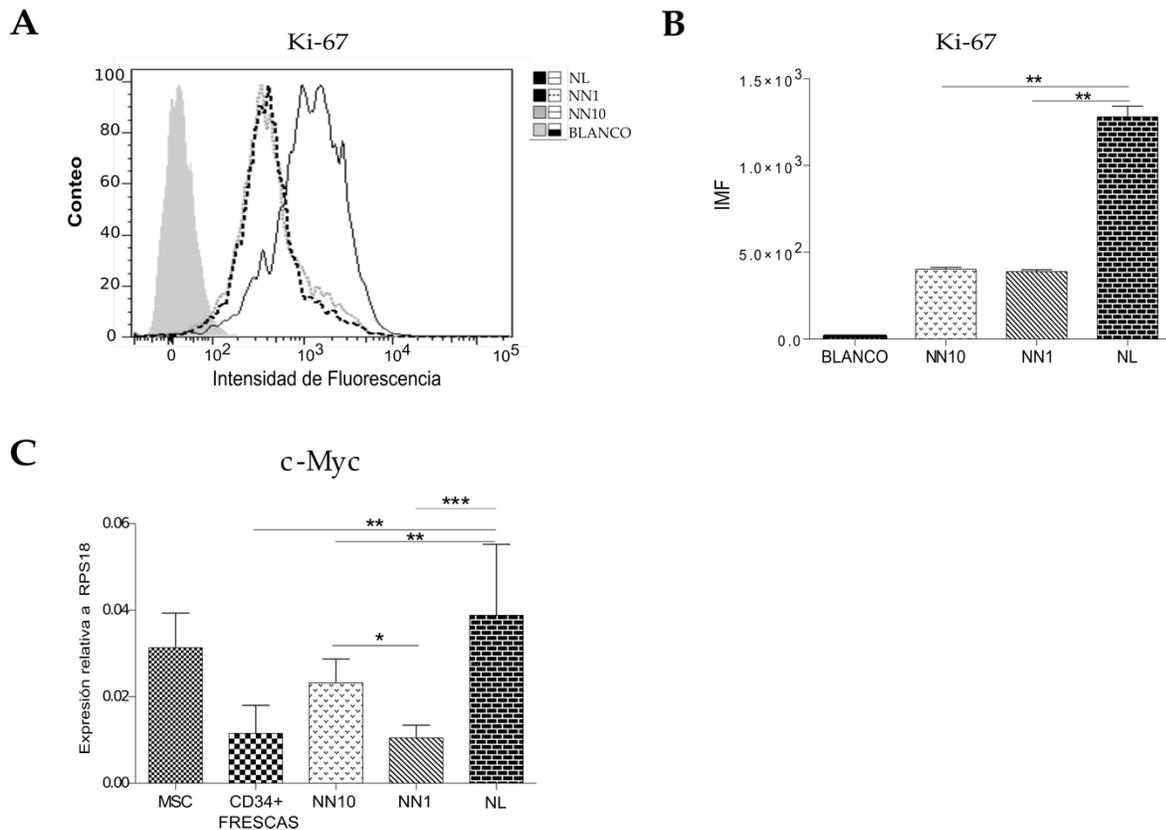
celular (Figura 7-2A), mientras que en el NN10 y NN1 esta población estuvo cercana al 70% (Figura 7-2B y 7-2C). Como se esperaba, la disminución de la concentración del SFB redujo las células en las fases S- y G2/M. Interesantemente, se observó un leve incremento en la población S/G2/M en las CD34+ obtenidas del NL cuando se comparó con el NN (24% vs 17% NN1 y 19,5% NN10). Puesto que después de este corto tiempo (3 días) no es posible ver grandes diferencias en la proliferación celular debido al tiempo de doblaje poblacional (DP) de las células CD34+ en co-cultivo con MSC, se evaluó el antígeno nuclear Ki-67 asociado a la proliferación celular. Se observó un incremento claro de Ki-67 en las células CD34+ del NL mientras que no se encontró ninguna diferencia entre NN1 y NN10 (Figura 7-3A y 7-3B). Además, se determinó un incremento la expresión de c-Myc en el NL, un factor de transcripción asociado a proliferación y diferenciación a progenitores [74] (Figura 7-3C). Por lo tanto, las células CD34+ en el NL entran en ciclo celular sugiriendo que el control ejercido por las MSC sobre la proliferación normal de las CD34+ se pierde en estas condiciones.

Figura 7-2: El NL induce incremento en las fases S+G2/M del ciclo celular en células CD34+.



Las células CD34+ frescas **(A)** ó CD34+ de los diferentes nichos, NN10 **(B)** NN1 **(C)** y NL **(D)** se marcaron con Hoechst 33342 para la evaluación del ciclo celular por citometría de flujo (FACS AriaTM II, BD Biosciences). Las áreas bajo los histogramas se usaron para determinar el porcentaje de las células en las fases sub-G0, G0/G1, S y G2/M del ciclo celular. **(E)** Histograma de la distribución del ciclo celular de las células CD34+ frescas ó CD34+ de NN y NL marcadas con Hoechst 33342. (FACS Aria II, BD Biosciences). (ns: no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ non-parametric one-way ANOVA). Se muestra un experimento representativo.

Figura 7-3: El NL incrementa la proliferación de las células CD34+.



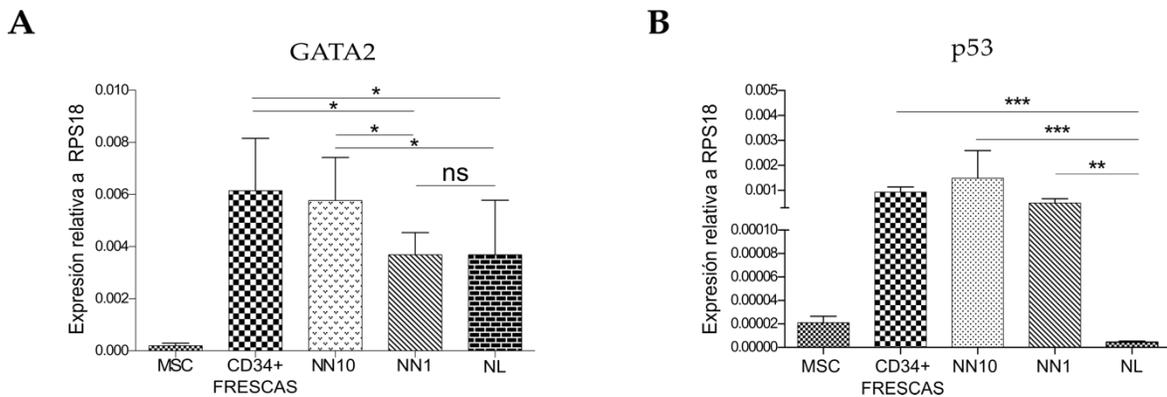
La proliferación de las células CD34+ en los diferentes nichos se evaluó por la detección del marcador nuclear Ki-67 con un anticuerpo monoclonal anti-Ki-67 conjugado a FITC por citometría de flujo (FACS AriaTM II, BD Bioscience) **(A)** Histograma representativo que muestra la intensidad de fluorescencia de Ki-67. **(B)** Cuantificación de la Intensidad Media

de Fluorescencia (IMF) a partir de 2 experimentos independientes por duplicado. **(C)** qRT-PCR para la evaluación de la expresión de c-Myc. Las barras representan el error estándar de la media \pm SEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (non-parametric one-way ANOVA).

7.3 Expresión de GATA2 y p53 en células CD34+ del NL

Se cree que GATA2 y p53 son reguladores centrales de la homeostasis de la hematopoyesis en especial de la quiescencia de las células CD34+ [75]. GATA2 y p53 se expresaron en las células CD34+ frescas y su expresión fue muy baja en las MSC (Figura 7-4A y 7-4B) y en las células REH. Comparadas con células del NN10, las células CD34+ del NL mostraron una baja expresión de GATA2 mientras que no se encontraron diferencias al compararlas con las de NN1 (Figura 7-4A). Por el contrario, la expresión de p53 se redujo de manera significativa en las células CD34+ del NL comparado a las células CD34+ frescas ó las CD34+ de NN10 o NN1 (Figura 7-4B).

Figura 7-4: GATA2 y p53 son regulados a la baja en células CD34+ de NL.

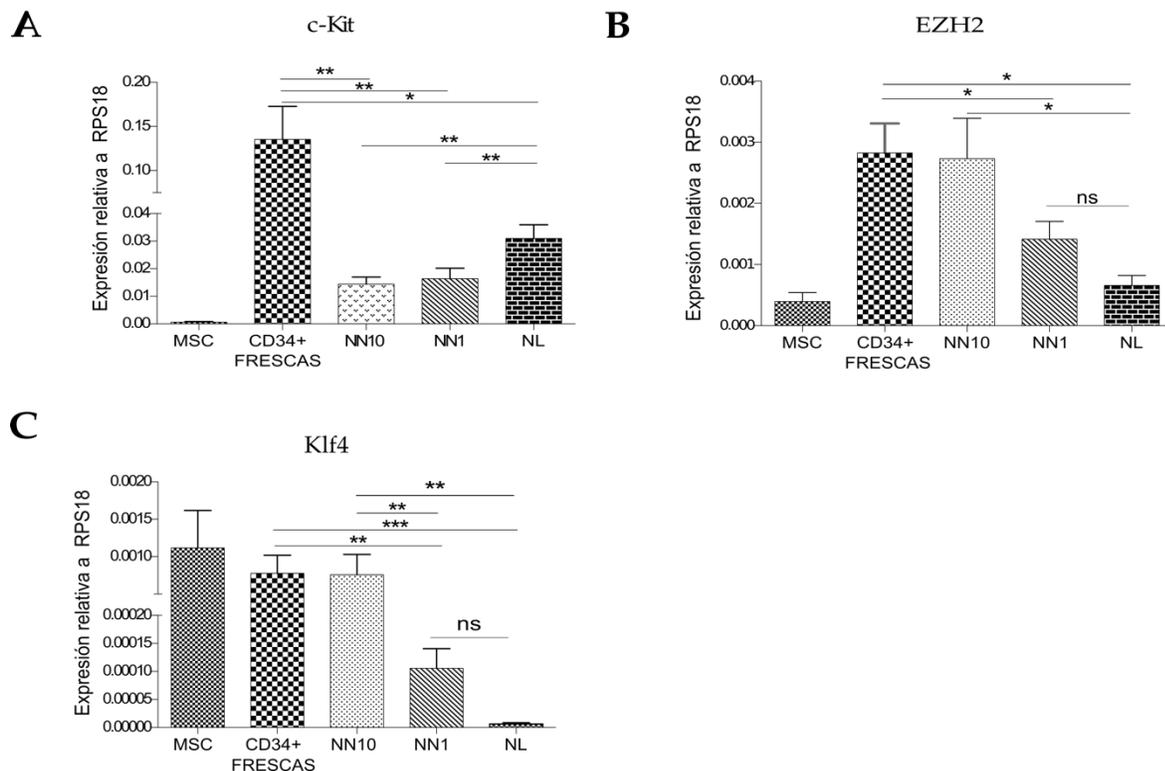


La expresión génica de GATA2 y p53 se analizó por qRT-PCR en células CD34+ a partir de los diferentes nichos comparado con las células frescas. La expresión del gen RPS18 se utilizó para normalizar los datos. **(A)** Expresión del mRNA de GATA2. **(B)** Expresión del mRNA de p53. Las barras representan el error estándar de la media \pm SEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (non-parametric one-way ANOVA). Las muestras se procesaron por triplicado (n=3).

7.4 Expresión de genes asociados a la autorrenovación de las células CD34+

También se realizó el análisis de expresión génica de otros 15 genes involucrados en la autorrenovación de las células CD34+ incluyendo Runx1, FoxO3a, SMAD4, Angpt1, Tie2, p16, Notch1, Bmi-1, HoxB4, OCT4 y NANOG [4, 7, 76, 77]. Sólo tres genes se expresaron diferencialmente en el NN y NL. EZH2, una enzima histona-lisina N-metiltransferasa, y Klf4, un factor de transcripción de reprogramación, mostraron una menor expresión en el NL comparado al NN (Figura 7-5B y 7-5C). Ninguna diferencia se observó en la expresión de EZH2 y Klf4 entre el NN10 y las células CD34+ frescas. Por el contrario, c-Kit, el receptor para el SCF, tuvo un incremento mayor a 2 veces en el NL comparado con el NN (Figura 7-5A), pero comparado a las células CD34+ frescas su expresión fue de sólo un tercio. Interessantemente, estos tres genes se expresaron altamente en células CD34+ frescas, sugiriendo que el microambiente leucémico afecta su expresión.

Figura 7-5: Las células CD34+ de NL tienen una expresión génica anormal de moléculas asociadas a la autorrenovación.

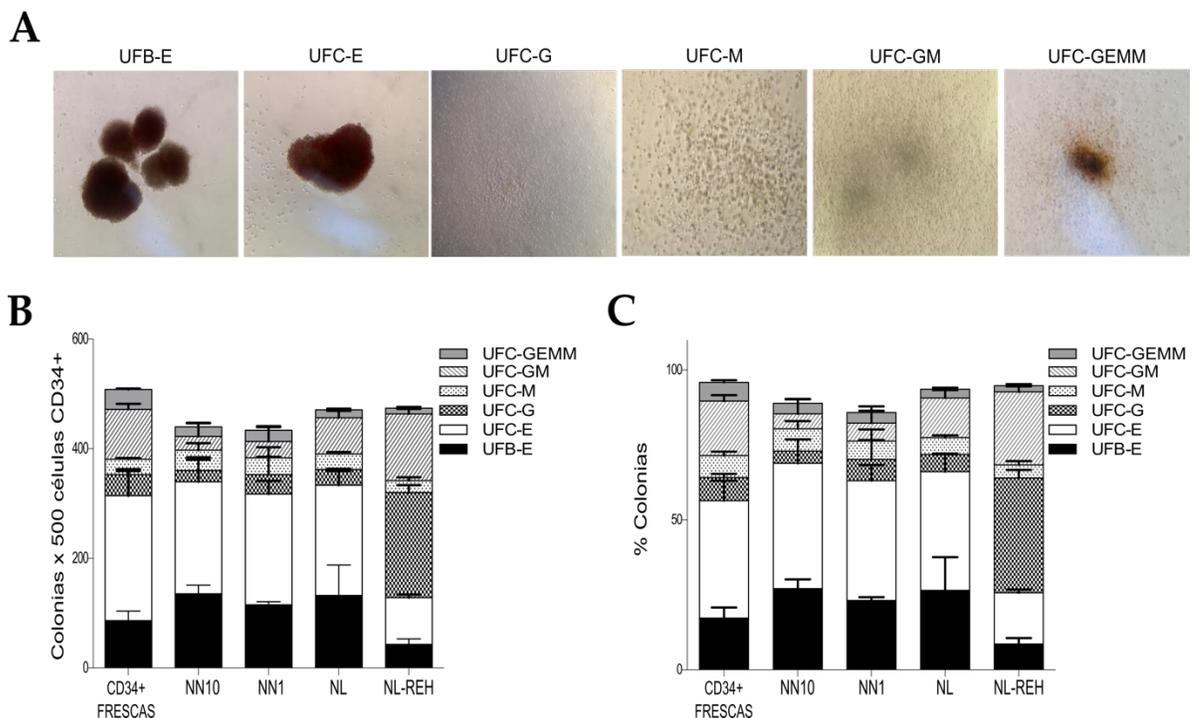


Análisis por qRT-PCR de (A) c-Kit (B) EZH2 y (C) Klf4 en células CD34+ co-cultivadas con MSC y MECO-REH. Los resultados se normalizaron al housekeeping gene RPS18. Las barras representan el error estándar de la media \pm SEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (non-parametric one-way ANOVA). Las muestras se procesaron por triplicado (n=3).

7.5 Evaluación de la capacidad multipotente de las células CD34+

El trabajo de investigación en el grupo ha demostrado que la multipotencialidad de las células CD34+ se afecta notoriamente en el NL con las células REH, con una disminución significativa en el número y % de colonias de progenitores primitivos (UFC-GEMM), acompañado de un incremento de otras colonias de progenitores más diferenciados como UFC-GM y UFB-E [73]. En el presente trabajo, se quiso evaluar si el NL establecido con MECO-REH simulaba los efectos sobre la multipotencialidad de las células CD34+ encontrado en el NL con células REH. Los resultados fueron muy similares para dos diferentes muestras de SCU (Figura 7-6).

Figura 7-6: Reducción de la capacidad de formación de colonias primitivas de las células CD34+ en el NL.

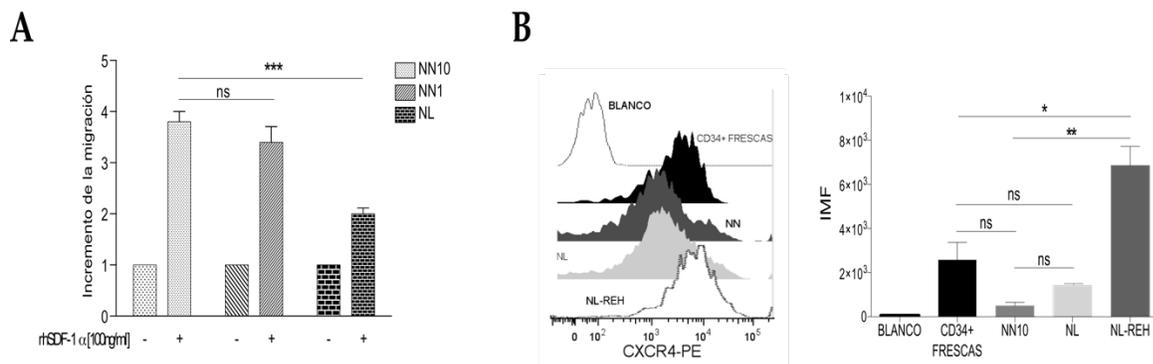


(A) Microfotografías 10X de las colonias de células CD34⁺ en cultivo con medio StemMACS HSC-CFU. Las unidades formadoras de colonias de Granulocito/eritrocito/monocito/megacariocito (UFC-GEMM), unidades formadoras de brotes-eritroides (UFB-E), UFC-eritroides (UFC-E) y UFC-Granulocito/macrófago (UFC-GM) de CD34⁺ co-cultivadas en el NN10, NN1, NL o NL-REH; conteo # colonias (B) y % colonias (C) para dos diferentes muestras de CD34⁺. Las barras representan el error estándar de la media \pm SEM. Las muestras se procesaron por triplicado (n=3).

7.6 El NL induce disminución en la migración y aumento de la adhesión de las células CD34⁺

La entrada en ciclo celular afecta la capacidad de migración de las células CD34⁺ [24], por lo que se estudió el efecto del NL en la migración de las células CD34⁺ usando un sistema transwell. Consistentemente, las células CD34⁺ del NL migraron menos hacia SDF-1 (Figura 7-7A), mostrando otra alteración de las células CD34⁺ en el NL que podría ser relevante *in vivo*. Además, la expresión de CXCR4 fue mayor en el NL con células REH y en el NL con MECO-REH comparado con el NN (Figura 7-7B), sugiriendo que la activación de CXCR4 y su endocitosis es alterada en un contexto leucémico.

Figura 7-7: Disminución de la migración de las células CD34⁺ en un nicho leucémico *In Vitro*.



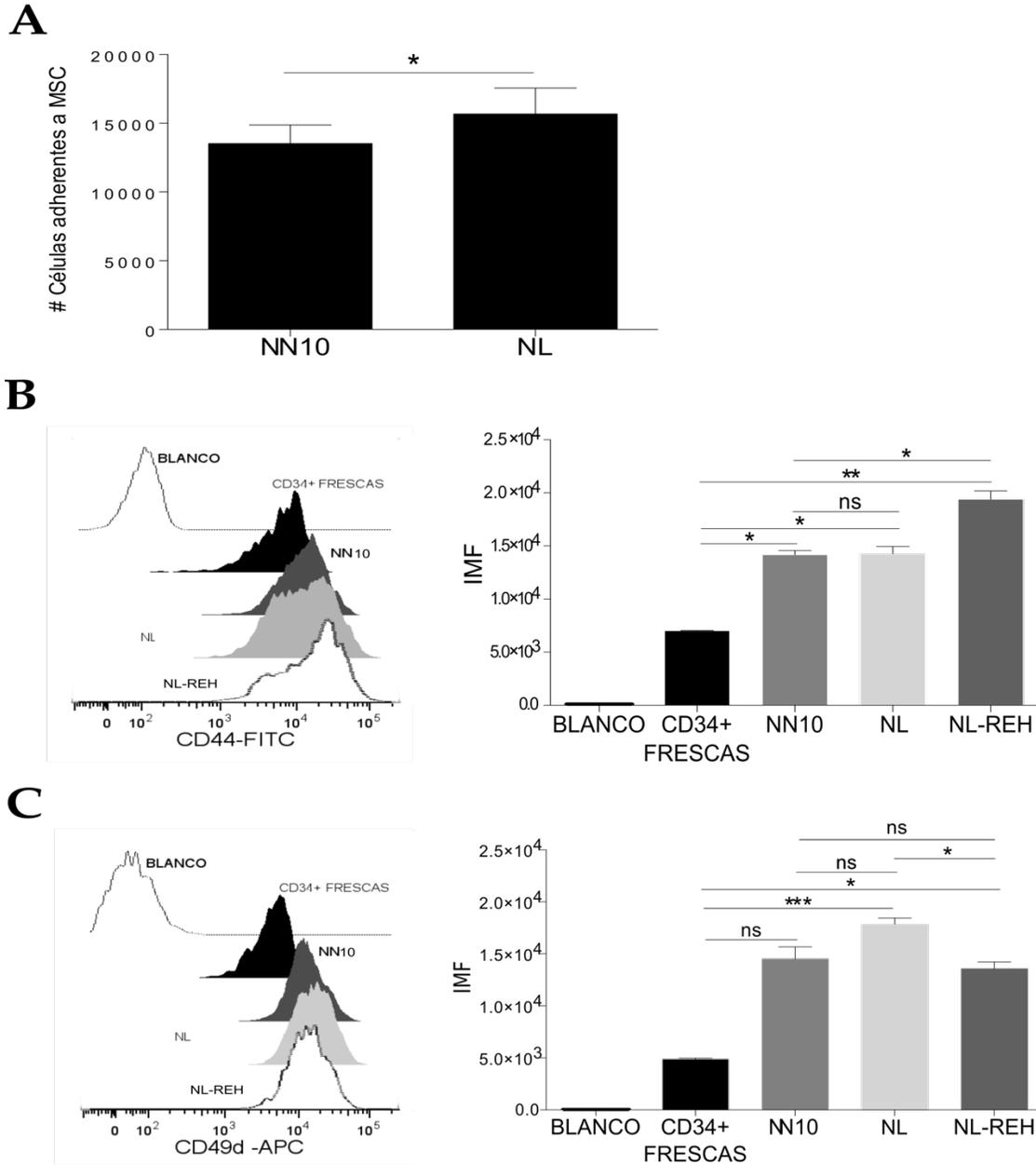
(A) El efecto quimioatrayente de SDF-1 (100 ng/mL) sobre las células CD34⁺ en los diferentes nichos se estudió usando un sistema transwell. El cálculo del incremento de la

migración (Fold Increase Migration) se determinó a partir de los controles negativos o no estimulados. **(B)** Marcación de CXCR4 (CD184) en células CD34+ frescas, o en células del NN, NL y NL-REH. Cuantificación de la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) a partir de 2 experimentos independientes por duplicado. Las barras representan el error estándar de la media \pm SEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (non-parametric one-way ANOVA).

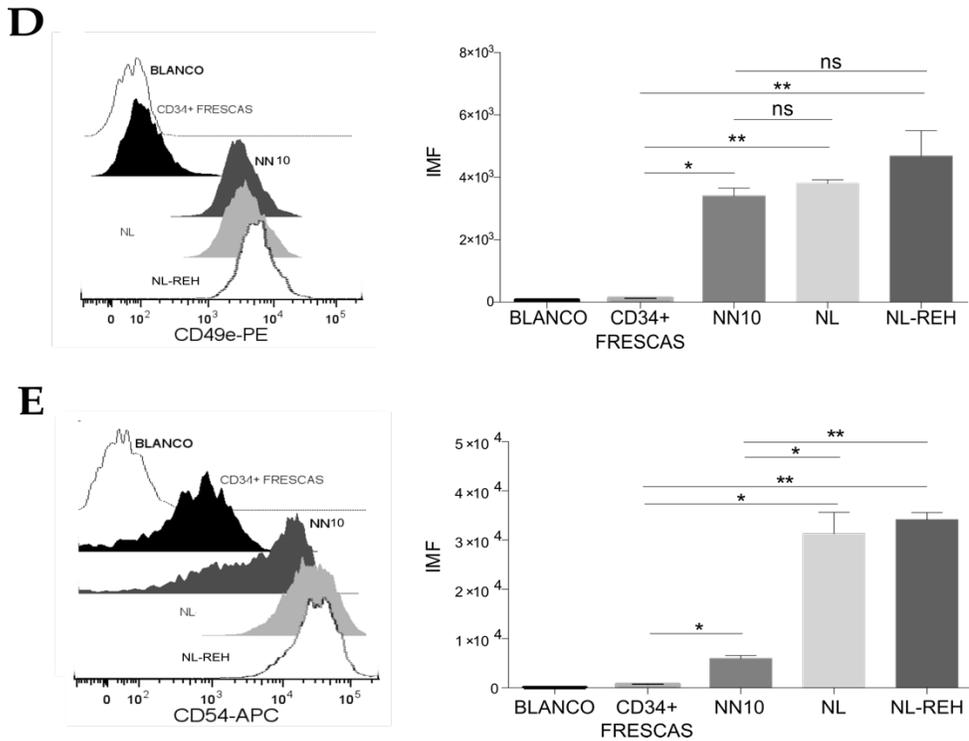
Se evaluó la adherencia de las células CD34+ a las MSC después de la incubación en el NN10 o en el NL. Las células CD34+ aisladas de NL mostraron significativamente mayor adhesión a las MSC (Figura 7-8A). Se evaluó entonces la expresión de las moléculas de adhesión (CD44, CD49d, CD49e y CD54) en las células CD34+ (Figura 7-8B-E). Aunque todas las moléculas de adhesión celular evaluadas se regularon a la alta, no se encontró ninguna diferencia en la IMF en la expresión de CD49d y CD49e entre las células CD34+ obtenidas del NN o el NL cuando se compararon todos los nichos a las células frescas, (Figura 7-8C y 7-8D). Sólo la expresión de CD44 (ligeramente) y CD54 (altamente) se incrementaron en el NL comparado al NN (Figura 7-8B, 7-8E). Es de señalar que el aumento en la expresión de todas las moléculas de adhesión, podría ser estimulado por el NL establecido con el MECO-REH (Figura 8B-8E). En particular, la regulación a la alta de CD49d fue mayor en el NL que en el NL establecido con células REH (NL-REH) (Figura 7-8C) y que la mayor regulación a la alta de CD54 en las células CD34+ obtenidas del NL-REH fue totalmente reproducida por el NL.

De acuerdo con una mayor adhesión a MSC, las células CD34+ del NL mostraron una menor migración dirigida hacia SDF-1 (Figura 7-7A) comparada a las células CD34+ del NN. Interesantemente, como antecedente en nuestro grupo de investigación, el NL establecido con MECO-REH tuvo un mayor efecto inhibitorio que el NL con células REH en la migración celular [73].

Figura 7-8: Incremento de la capacidad de adhesión y expresión de moléculas de adhesión en las células CD34+ de NL.



Continua



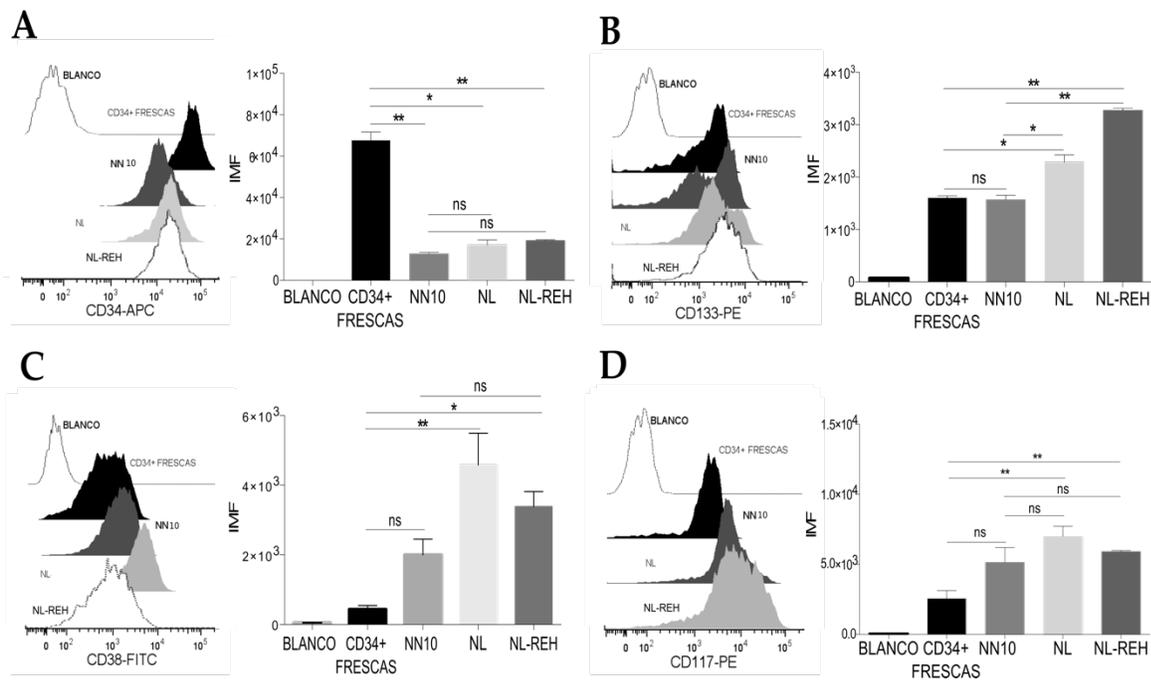
(A) Capacidad de adhesión a las MSC de las células CD34+ obtenidas de NN o NL; las células se cultivaron con MSC por 4 horas. (B) Marcación de CD44 (C) CD49d (D) CD49e y (E) CD54 en células CD34+ frescas, y obtenidas de NN, NL y NL-REH. Cuantificación de la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) a partir de 2 experimentos independientes por duplicado. Las barras representan el error estándar de la media \pm SEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (*Student t test* (A), *non-parametric one-way ANOVA* (B-E)).

7.7 Marcadores de células stem de las CD34+ en el NL.

Se evaluaron por citometría de flujo algunos marcadores de superficie característicos de las células stem hematopoyéticas humanas, para determinar si las células CD34+ modifican la expresión de estos marcadores primitivos en el NL en un corto período de incubación (3 días). Se encontró diferencia significativa en la expresión del marcador CD34 entre el NN10 y el NL (se observó un incremento en el NL), aunque las células frescas tuvieron una alta expresión de CD34 (Figura 7-9A); sin embargo, no se encontró ninguna diferencia en la expresión de CD34 cuando se usó el NL para establecer el microambiente leucémico. De otra parte, CD133 se reguló ligeramente a la alta en el NL-REH comparado con el NN10 (Figura 7-9B), con el NL se obtuvo un menor efecto que en el NL-REH. En las células CD34+ frescas, la expresión de CD133 fue más variable. En la condición de NN10,

se identificaron dos poblaciones con una expresión media y alta de CD133, mientras en el NL-REH solo prevaleció la población con una alta expresión de CD133. La expresión de CD38 en el NN10 y NLs se incremento con respecto a las células CD34+ frescas; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los nichos (Figura 7-9C). Comparado con las células CD34+ frescas, todos los nichos indujeron una alta expresión de CD117 (Figura 7-9D), con ninguna diferencia en la expresión entre células de NN10 y NLs (con REH ó MECO-REH). Estos resultados mostraron que se tiende a mantener un fenotipo primitivo (CD34+CD133+CD117+) cuando se comparan el NN10 y NLs, aunque es evidente una tendencia hacia la alta expresión de estos marcadores en los NLs.

Figura 7-9: Marcadores de células stem y de diferenciación de células CD34+ en el NL.

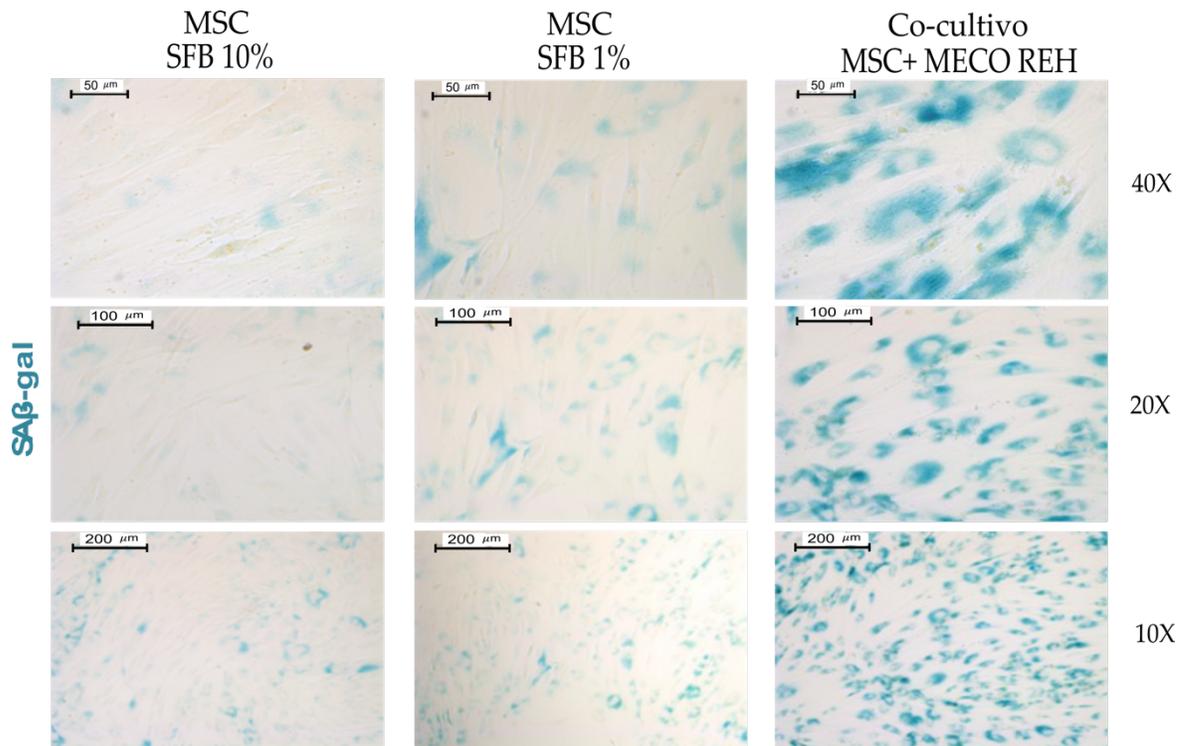


Análisis por citometría de flujo de la expresión (A) CD34 (B) CD133 (C) CD38 and (D) CD117 (c-Kit) en células CD34+ frescas, NN10, NL y NL-REH. Cuantificación de la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) a partir de 2 experimentos independientes por duplicado. Las barras representan el error estándar de la media \pm SEM * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 (non-parametric one-way ANOVA).

7.8 El NL induce senescencia en MSC

Se observó en el curso de los diferentes experimentos después de la incubación con el MECO-REH, que las MSC detenían su división celular y se veían al microscopio como células aplanadas con la aparición de pequeñas vacuolas, por lo que se consideró evaluar la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia, encontrándose positiva después de la incubación con el MECO-REH (Figura 7-10). El control de las MSC en medio de cultivo fue totalmente normal. Este fenotipo asociado a senescencia podría explicar en parte, la pérdida del soporte de las MSC a las células CD34+.

Figura 7-10: MECO-REH incrementa la actividad SA- β -Gal en las MSC de MO.

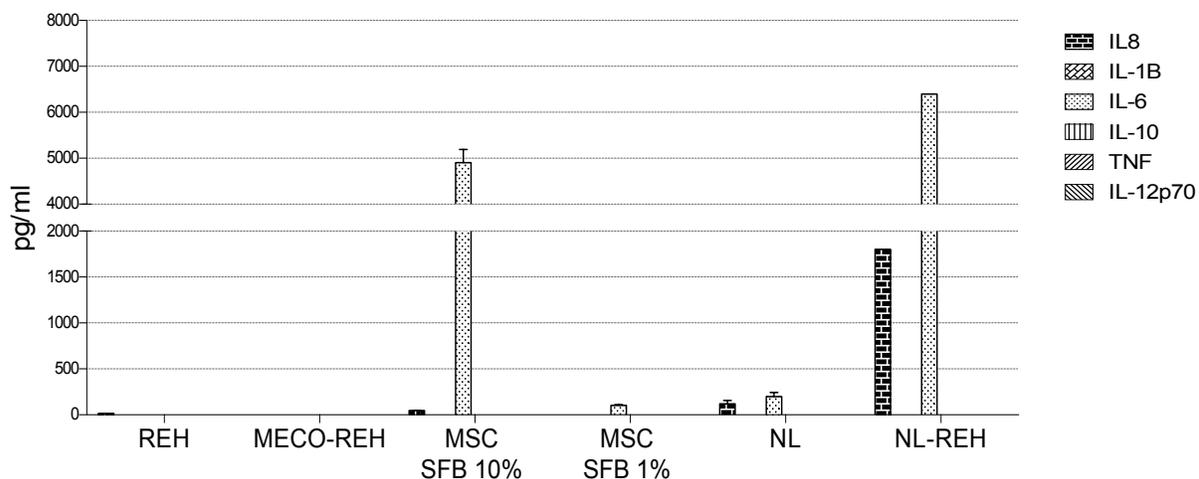


Marcación SA- β -gal representativa de MSC de MO cultivadas con SFB10%, SFB 1% y co-cultivadas con MECO-REH. Se muestran imágenes usando microscopia de luz con el objetivo 10X, 20Xy 40X, los cambios en morfología e intensidad en el color azul perinuclear de las MSC puede observarse. Se muestra un experimento representativo.

7.9 Caracterización parcial de los factores solubles presentes en el NL

Se estudiaron las citoquinas inflamatorias que podrían estar presentes en el NL y ser responsables de los cambios y efectos observados en las células CD34+ en el NL. Usando un ensayo de CBA Cytometric Bead Array Kit (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, USA), se mostró que IL-6 e IL-8 son las citoquinas pro-inflamatorias más abundantes en el NL (Figura 7-11). Estas citoquinas no están presentes en el MECO-REH, por lo tanto, se tuvieron que producir por las MSC en presencia del MECO-REH. Ambas citoquinas se indujeron por incubación con SFB 10% pero sólo la IL-6 se indujo por el SFB 1%. Interesantemente, ambas IL-6 e IL-8 se detectaron también cuando el NL se estableció con las células REH, sugiriendo que nuestro NL por incubación de MSC con MECO-REH simula apropiadamente el microambiente leucémico.

Figura 7-11: Concentración de citoquinas pro-inflamatorias en el MECO-REH.



Análisis de multiplexed Cytometric Bead Assay (CBA) del nicho leucémico descrito en la sección de Métodos. Concentración de las citoquinas (IL-8, IL-1B, IL-6, IL-10, TNF α and IL-12p70) en las muestras, fue calculada a partir de los datos obtenidos por FACS. Las barras representan el error estándar de la media \pm SEM. Las muestras se procesaron por triplicado (n=3).

8. Discusión

Este estudio valida un nicho leucémico *in vitro* sin células leucémicas para estudiar la función de las HSC CD34+, simulando un nicho de MO afectado por células leucémicas. Se demostró la pérdida del control de las MSC sobre la función de las células CD34+ después de la incubación con medio condicionado de células leucémicas. En un corto período de incubación en el NL, las células CD34+ entraron en fase S/G2/M del ciclo celular e incrementaron la expresión del antígeno Ki-67 y del factor de transcripción c-Myc, sugiriendo que las células CD34+ en el NL podrían estar en un estado proliferante. Esto es similar a lo que se ha reportado en otros estudios que muestran que las células CD34+ en co-cultivo con MSC tienen una menor tasa de proliferación [72] que las CD34+ cultivadas con MSC en presencia de citoquinas de acción temprana (TPO, Flt3L y SCF), lo que refuerza el papel importante de los factores solubles en la función de las células CD34+. Se ha reportado también que las HSC CD34+ proliferantes se diferencian en progenitores tempranos [74] y que la expresión de c-Myc se requiere para la progresión del ciclo celular y la expansión, contrario a las células CD34+ que se dividen independientemente de c-Myc. Estos resultados son consistentes con los nuestros, mostrando el incremento de la expresión de c-Myc en las células CD34+ de NL.

Por otra parte, estudios recientes sugieren una posible asociación entre las vías de señalización de GATA2 y p53 [75] y más recientemente, se ha mostrado que la expresión de GATA2 y p53 es esencial para la regulación de la quiescencia de las HSC [78, 79]. En este trabajo, ambos genes se expresaron en células CD34+ frescas y en el NN, pero se regularon a la baja en el NL, en especial p53. Esta reducción en GATA2 y p53 podría inducir la pérdida de la quiescencia de las células CD34+, lo que concuerda con el incremento en la proliferación de las CD34+ observado anteriormente. Recientemente, se demostró que p53 induce la muerte de las células leucémicas, sin afectar las CD34+ normales [80]. Este resultado podría explicarse por la baja expresión de p53 y GATA2 en

las células CD34+ en el microambiente leucémico, como se encontró en nuestro modelo *in vitro*.

También se ha reportado que la rápida división de las células limita la capacidad de autorrenovación y reconstitución [81] [82]. Nosotros recientemente mostramos que las células CD34+ en un NL, establecido con células REH, disminuyen su capacidad multipotente [73]. Para explorar este efecto en nuestro modelo, estudiamos los genes involucrados en la autorrenovación. Inesperadamente, la mayoría de estos no se expresaron diferencialmente entre los NN y NL, y solo encontramos 3 de estos genes con expresión diferencial en este sistema *in vitro*. En particular, Klf4 se reguló fuertemente a la baja en el NL comparado con las células CD34+ del NN o células CD34+ frescas. Se ha demostrado que Klf4 inhibe la proliferación de las HSC por incremento de los inhibidores del ciclo celular p21 y p27 causando detención en el ciclo celular *in vitro* e *in vivo* [83]. Esta regulación a la baja también es compatible con el incremento de la proliferación de las células CD34+. Klf4 puede funcionar como un gen supresor de tumores en leucemia [84].

EZH2 también se reguló a la baja en células CD34+ del NL. Se ha demostrado que EZH2 se requiere para el adecuado desarrollo de células T y B [85] sugiriendo que la baja expresión de EZH2 podría afectar la diferenciación de ambas subpoblaciones linfocíticas, similar al efecto observado en paciente leucémicos. Interesantemente, la inactivación de EZH2 se ha observado también en leucemia [86].

El tercer gen que se expresó diferencialmente en nuestro modelo *in vitro* fue c-Kit, el receptor de SCF. c-Kit se reguló a la alta en células CD34+ de NL pero su expresión fue menor que en las células CD34+ frescas. La señalización SCF/c-Kit no solo es necesaria para la viabilidad de las HSC [87], sino también para la repoblación y autorrenovación de las HSC, evaluada en ensayos de trasplante no competitivo [15] y para el posicionamiento funcional de las HSC en el nicho [88]. Por otra parte, se ha mostrado que la baja expresión de c-Kit reduce la multipotencia de las HSC CD34+ [72]. Nuestros resultados son consistentes con hallazgos previos donde la población CD34+ del NL mostró una pérdida de la autorrenovación en comparación con las células CD34+ frescas y del NN10[73].

Interesantemente, la migración de las células CD34+ del NL disminuyó de manera importante, seguramente como consecuencia de la adhesión incrementada a las MSC; esto es consistente con estudios que han demostrado que las células CD34+ proliferantes (S+G2/M) presentan una migración defectuosa hacia células estromales, lo que podría llevar a un defecto selectivo en el homing [89]. Igualmente, existe evidencia de que las células en las fases S+G2/M expresan un nivel elevado de moléculas de adhesión como VLA-4 y se adhieren más eficientemente a la monocapa de células estromales que las células en fase G0/G1[10]. Adicionalmente, nuestros resultados muestran una alta expresión de CXCR4 en células CD34+ de NL sugiriendo una inadecuada endocitosis y una alterada señalización de CXCR4 podrían ser responsables de esta migración defectuosa en células del NL. Interesantemente, hallazgos recientes han mostrado niveles tres veces menores de SDF-1 en pacientes pediátricos con LLA-B comparados con controles no leucémicos [90].

La capacidad de adhesión de las células CD34+ a MSC se incrementó en el NL, y esto se acompañó de un aumento en la expresión de moléculas de adhesión como CD44, CD49e y CD54. En particular, CD54 (ICAM-1) aumentó su expresión en los NLs, lo que sugiere una posible asociación con el fenotipo de adhesión de las células CD34+ del NL. Las moléculas específicas responsables de la adhesión aumentada a MSC podrían ser exploradas en nuevos estudios.

En conjunto estos resultados evaluando de la función de las células CD34+ en el NL *in vitro*, sugieren alteraciones en las señales clásicas que surgen de la interacción HSC-MSC y comprometen la función de las células CD34+. En relación a la expresión de marcadores primitivos de células stem, la expresión aumentada de CD34 y CD133 en el NL respecto al NN10, fue un resultado inesperado, debido posiblemente a señales inducidas por la células leucémicas para favorecer un estado primitivo. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de CD117 en la superficie de las CD34+ de los nichos evaluados. Interesantemente, nuestro cultivo *in vitro* indujo una alta expresión de CD38 en células CD34+ de NN10, NN1 y NL induciendo una población CD34+CD38+ diferenciada respecto a las células CD34+ frescas (baja expresión de CD38); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los nichos (aunque se observa una tendencia hacia el aumento en el NL). Estos resultados sugerirían que las señales responsables del estado primitivo de las células aún están presentes en el NL.

Para explorar la multipotencialidad de las células CD34+ después del co-cultivo con MSC y MECO-REH, se evaluó el potencial de diferenciación a linajes hematopoyéticos, encontrando una reducción significativa en el conteo absoluto y el porcentaje de colonias de progenitores primitivos (UFC-GEMM) en las células CD34+ de los NLs, acompañado de un aumento de UFC-GM, consistente con estudios en animales leucémicos donde se muestra la pérdida de la capacidad de autorrenovación y diferenciación de las HSC[91], y de una manera equivalente, con hallazgos previos reportados por nuestro grupo en pacientes con LLA-B [73], y también en estudios con pacientes con LMC [92].

Dado que en nuestro estudio hemos establecido el NL sin células leucémicas, es lógico pensar que factores solubles son responsables de los efectos observados. De interés, nuestros resultados mostraron que las citoquinas secretadas por las células REH son responsables indirectamente de la alteración en la función de las células CD34+. Esto podría deberse a que las citoquinas inducen un proceso de senescencia afectando considerablemente la secreción de factores solubles de las MSC. La senescencia e inflamación son dos procesos relacionados relevantes al crecimiento y progresión tumoral [93]. Se realizó una caracterización preliminar de los factores solubles que podrían ser responsables del efecto observado en el NL, encontrando que las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-8 fueron las de mayor concentración en el NL, pero curiosamente ambas citoquinas no se encontraron en el MECO-REH, sugiriendo que su secreción por MSC es inducida solo por factores solubles secretados por las células REH. Esto es consistente con el hecho de que estas citoquinas también se encontraron en el NL establecido con células REH. Varios reportes han mostrado que los niveles de IL-6 e IL-8 se encuentran aumentados en el suero de pacientes leucémicos y sus niveles se correlacionan con efectos clínicos adversos y corta supervivencia [94, 95]. El rol específico de estas dos citoquinas solas o en estudios en MSC merecen más experimentos. Nuestros esfuerzos por el entendimiento de las alteraciones de las células HSC CD34+ en el NL fomentará el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

Los resultados en conjunto sugieren que las células CD34+ en el NL *in vitro* pierden su estado quiescente, incrementan la tasa de proliferación, presentan un reducido potencial de autorrenovación y defectos en la migración dirigida.

Se deben incluir tantos capítulos como se requieran; sin embargo, se recomienda que la tesis o trabajo de investigación tenga un mínimo 3 capítulos y máximo de 6 capítulos (incluyendo las conclusiones)

9. Conclusiones

Este estudio valida un nicho leucémico (NL) *in vitro* sin células leucémicas para el estudio de la función de las células CD34+. Se muestra que en este NL las CD34+ salen de su estado quiescente, incrementan su proliferación, con cambios en la expresión génica y pérdida de la capacidad multipotente, compatibles con la pérdida del potencial de autorrenovación. Estos resultados son consistentes con la pérdida de la capacidad de migración y el aumento de la adhesión de las células CD34+. Se sugiere que estos cambios se deben a la inducción de senescencia en las MSC, por el microambiente leucémico, que afecta de manera importante los factores solubles que secretan las MSC alterando su función de mantenimiento y sostén de las células CD34+. Estos cambios, en las HSC y en la MO, observados en este sistema co-cultivo, son similares a lo que ha sido descrito para pacientes con leucemia, sugiriendo que este sistema *in vitro* puede utilizarse como una herramienta para el estudio de los mecanismos moleculares responsables de los cambios funcionales en las células CD34+ como también de otros tipos celulares que componen la MO, que permita optimizar las terapias basadas en células stem y evite las recaídas en pacientes con leucemia.

10. Bibliografía

1. Calvi, L.M., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 841-6.
2. Seita, J. and I.L. Weissman, *Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010. **2**(6): p. 640-53.
3. Rieger, M.A. and T. Schroeder, *Hematopoiesis*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(12).
4. Hao, S., C. Chen, and T. Cheng, *Cell cycle regulation of hematopoietic stem or progenitor cells*. Int J Hematol, 2016. **103**(5): p. 487-97.
5. Nwajei, F. and M. Konopleva, *The bone marrow microenvironment as niche retreats for hematopoietic and leukemic stem cells*. Adv Hematol, 2013. **2013**: p. 953982.
6. Mendez-Ferrer, S., et al., *Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche*. Nature, 2010. **466**(7308): p. 829-34.
7. Wang, Z. and H. Ema, *Mechanisms of self-renewal in hematopoietic stem cells*. Int J Hematol, 2016. **103**(5): p. 498-509.
8. Bradford, G.B., et al., *Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment*. Exp Hematol, 1997. **25**(5): p. 445-53.
9. Passegue, E., *Hematopoietic stem cells, leukemic stem cells and chronic myelogenous leukemia*. Cell Cycle, 2005. **4**(2): p. 266-8.
10. Yamaguchi, M., et al., *Different adhesive characteristics and VLA-4 expression of CD34(+) progenitors in G0/G1 versus S+G2/M phases of the cell cycle*. Blood, 1998. **92**(3): p. 842-8.
11. Perdomo-Arciniegas, A.M. and J.P. Vernot, *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**(6): p. 525-32.
12. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
13. Cheung, T.H. and T.A. Rando, *Molecular regulation of stem cell quiescence*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(6): p. 329-40.
14. Arai, F., et al., *Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche*. Cell, 2004. **118**(2): p. 149-61.
15. Thoren, L.A., et al., *Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2045-53.
16. Nie, Y., Y.C. Han, and Y.R. Zou, *CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells*. J Exp Med, 2008. **205**(4): p. 777-83.
17. Cashman, J., et al., *Stromal-derived factor 1 inhibits the cycling of very primitive human hematopoietic cells in vitro and in NOD/SCID mice*. Blood, 2002. **99**(3): p. 792-9.

18. Wilson, A., E. Laurenti, and A. Trumpp, *Balancing dormant and self-renewing hematopoietic stem cells*. *Curr Opin Genet Dev*, 2009. **19**(5): p. 461-8.
19. Trumpp, A., M. Essers, and A. Wilson, *Awakening dormant haematopoietic stem cells*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(3): p. 201-9.
20. Takizawa, H., et al., *Dynamic variation in cycling of hematopoietic stem cells in steady state and inflammation*. *J Exp Med*, 2011. **208**(2): p. 273-84.
21. Shah, N., L. Oseth, and T.W. LeBien, *Development of a model for evaluating the interaction between human pre-B acute lymphoblastic leukemic cells and the bone marrow stromal cell microenvironment*. *Blood*, 1998. **92**(10): p. 3817-28.
22. Douer, D., et al., *T-cell acute lymphoblastic leukemia with severe leukopenia: evidence for suppression of myeloid progenitor cells by leukemic blasts*. *Acta Haematol*, 1988. **80**(4): p. 185-9.
23. Duan, C.W., et al., *Leukemia propagating cells rebuild an evolving niche in response to therapy*. *Cancer Cell*, 2014. **25**(6): p. 778-93.
24. Lataillade, J.J., et al., *Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival*. *Blood*, 2000. **95**(3): p. 756-68.
25. Khalid, S., et al., *Retrospective review of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: a single center experience*. *Indian J Pathol Microbiol*, 2010. **53**(4): p. 704-10.
26. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology*. *Cell*, 2008. **132**(4): p. 631-44.
27. Taichman, R.S., et al., *Augmented Production of Interleukin-6 by Normal Human Osteoblasts in Response to CD34+ Hematopoietic Bone Marrow Cells In Vitro*. *Blood*, 1997. **89**(4): p. 1165-1172.
28. Mendelson, A. and P.S. Frenette, *Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration*. *Nat Med*, 2014. **20**(8): p. 833-46.
29. Kondo, M., et al., *Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 759-806.
30. Kiel, M.J., et al., *SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells*. *Cell*, 2005. **121**(7): p. 1109-21.
31. Nilsson, S.K. and P.J. Simmons, *Transplantable stem cells: home to specific niches*. *Curr Opin Hematol*, 2004. **11**(2): p. 102-6.
32. Grassinger, J., et al., *Thrombin-cleaved osteopontin regulates hemopoietic stem and progenitor cell functions through interactions with alpha9beta1 and alpha4beta1 integrins*. *Blood*, 2009. **114**(1): p. 49-59.
33. Papayannopoulou, T., et al., *The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(21): p. 9647-51.
34. Mazo, I.B., et al., *Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1*. *J Exp Med*, 1998. **188**(3): p. 465-74.
35. Reya, T., *Regulation of hematopoietic stem cell self-renewal*. *Recent Prog Horm Res*, 2003. **58**: p. 283-95.
36. Zon, L.I., *Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal*. *Nature*, 2008. **453**(7193): p. 306-313.

37. Argiropoulos, B. and R.K. Humphries, *Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis*. *Oncogene*, 2007. **26**(47): p. 6766-76.
38. Sauvageau, G., et al., *Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo*. *Genes Dev*, 1995. **9**(14): p. 1753-65.
39. Antonchuk, J., G. Sauvageau, and R.K. Humphries, *HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation*. *Exp Hematol*, 2001. **29**(9): p. 1125-34.
40. Miyamoto, K., et al., *Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool*. *Cell Stem Cell*, 2007. **1**(1): p. 101-12.
41. Van Vlierberghe, P. and A. Ferrando, *The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(10): p. 3398-406.
42. Stepanova, L. and B.P. Sorrentino, *A limited role for p16Ink4a and p19Arf in the loss of hematopoietic stem cells during proliferative stress*. *Blood*, 2005. **106**(3): p. 827-32.
43. Frelin, C., et al., *GATA-3 regulates the self-renewal of long-term hematopoietic stem cells*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(10): p. 1037-44.
44. Li, X., et al., *Transcriptional profiling of Foxo3a and Fancd2 regulated genes in mouse hematopoietic stem cells*. *Genom Data*, 2015. **4**: p. 148-149.
45. Lewis, J.L., et al., *The influence of INK4 proteins on growth and self-renewal kinetics of hematopoietic progenitor cells*. *Blood*, 2001. **97**(9): p. 2604-10.
46. Janzen, V., et al., *Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a*. *Nature*, 2006. **443**(7110): p. 421-6.
47. Heppner, G.H., *Tumor heterogeneity*. *Cancer Res*, 1984. **44**(6): p. 2259-65.
48. Lapidot, T., et al., *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. *Nature*, 1994. **367**(6464): p. 645-8.
49. Warner, J.K., et al., *Concepts of human leukemic development*. *Oncogene*, 2004. **23**(43): p. 7164-7177.
50. Kim, J.A., et al., *Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myelogenous leukemia*. *Cancer Res*, 2015. **75**(11): p. 2222-31.
51. Matsunaga, T., et al., *Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia*. *Nat Med*, 2003. **9**(9): p. 1158-65.
52. Jin, L., et al., *Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells*. *Nat Med*, 2006. **12**(10): p. 1167-74.
53. Turley, E.A., P.W. Noble, and L.Y. Bourguignon, *Signaling properties of hyaluronan receptors*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(7): p. 4589-92.
54. Tabe, Y., et al., *Activation of integrin-linked kinase is a critical prosurvival pathway induced in leukemic cells by bone marrow-derived stromal cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(2): p. 684-94.
55. Sipkins, D.A., et al., *In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment*. *Nature*, 2005. **435**(7044): p. 969-73.
56. Conneally, E., et al., *Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(18): p. 9836-41.
57. Zhang, B., et al., *Altered microenvironmental regulation of leukemic and normal stem cells in chronic myelogenous leukemia*. *Cancer Cell*, 2012. **21**(4): p. 577-92.

58. Frisch, B.J., et al., *Functional inhibition of osteoblastic cells in an in vivo mouse model of myeloid leukemia*. Blood, 2012. **119**(2): p. 540-50.
59. Schepers, K., et al., *Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche*. Cell Stem Cell, 2013. **13**(3): p. 285-99.
60. Cheng, H. and T. Cheng, *'Waterloo': when normal blood cells meet leukemia*. Curr Opin Hematol, 2016. **23**(4): p. 304-10.
61. Konopleva, M.Y. and C.T. Jordan, *Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting*. J Clin Oncol, 2011. **29**(5): p. 591-9.
62. Burger, J.A., et al., *Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1*. Blood, 2000. **96**(8): p. 2655-63.
63. Juarez, J., et al., *Effects of inhibitors of the chemokine receptor CXCR4 on acute lymphoblastic leukemia cells in vitro*. Leukemia, 2003. **17**(7): p. 1294-300.
64. Colmone, A., et al., *Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells*. Science, 2008. **322**(5909): p. 1861-5.
65. Sands, W.A., M. Copland, and H. Wheadon, *Targeting self-renewal pathways in myeloid malignancies*. Cell Commun Signal, 2013. **11**(1): p. 33.
66. Zhao, C., et al., *Loss of β -Catenin Impairs the Renewal of Normal and CML Stem Cells In Vivo*. Cancer Cell, 2007. **12**(6): p. 528-541.
67. Wang, L.D. and A.J. Wagers, *Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(10): p. 643-655.
68. Zhang, J., et al., *Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 836-841.
69. Qiang, Y.W., et al., *Myeloma-derived Dickkopf-1 disrupts Wnt-regulated osteoprotegerin and RANKL production by osteoblasts: a potential mechanism underlying osteolytic bone lesions in multiple myeloma*. Blood, 2008. **112**(1): p. 196-207.
70. Rupec, R.A., et al., *Stroma-mediated dysregulation of myelopoiesis in mice lacking I kappa B alpha*. Immunity, 2005. **22**(4): p. 479-91.
71. Tabe, Y. and M. Konopleva, *Advances in understanding the leukaemia microenvironment*. Br J Haematol, 2014. **164**(6): p. 767-78.
72. Rodriguez-Pardo, V.M. and J.P. Vernot, *Mesenchymal stem cells promote a primitive phenotype CD34+c-kit+ in human cord blood-derived hematopoietic stem cells during ex vivo expansion*. Cell Mol Biol Lett, 2013. **18**(1): p. 11-33.
73. Vernot, J.P., et al., *Phenotypic and Functional Alterations of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in an In Vitro Leukemia-Induced Microenvironment*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(2).
74. Ehninger, A., et al., *Posttranscriptional regulation of c-Myc expression in adult murine HSCs during homeostasis and interferon-alpha-induced stress response*. Blood, 2014. **123**(25): p. 3909-13.
75. Tsai, F.Y. and S.H. Orkin, *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**(10): p. 3636-43.
76. Zon, L.I., *Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal*. Nature, 2008. **453**(7193): p. 306-13.

77. Imperato, M.R., et al., *The RUNX1-PU.1 axis in the control of hematopoiesis*. Int J Hematol, 2015. **101**(4): p. 319-29.
78. Asai, T., et al., *The p53 tumor suppressor protein regulates hematopoietic stem cell fate*. J Cell Physiol, 2011. **226**(9): p. 2215-21.
79. Tipping, A.J., et al., *High GATA-2 expression inhibits human hematopoietic stem and progenitor cell function by effects on cell cycle*. Blood, 2009. **113**(12): p. 2661-72.
80. Abraham, S.A., et al., *Dual targeting of p53 and c-MYC selectively eliminates leukaemic stem cells*. Nature, 2016. **534**(7607): p. 341-6.
81. Foudi, A., et al., *Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(1): p. 84-90.
82. Wilson, A., et al., *Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair*. Cell, 2008. **135**(6): p. 1118-29.
83. Huang, Y., et al., *HDAC1 and Klf4 interplay critically regulates human myeloid leukemia cell proliferation*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1491.
84. Morris, V.A., et al., *Deregulated KLF4 Expression in Myeloid Leukemias Alters Cell Proliferation and Differentiation through MicroRNA and Gene Targets*. Mol Cell Biol, 2015. **36**(4): p. 559-73.
85. Su, I.H., et al., *Polycomb group protein ezh2 controls actin polymerization and cell signaling*. Cell, 2005. **121**(3): p. 425-36.
86. Grossmann, V., et al., *EZH2 mutations and their association with PICALM-MLLT10 positive acute leukaemia*. Br J Haematol, 2012. **157**(3): p. 387-90.
87. Keller, J.R., M. Ortiz, and F.W. Ruscetti, *Steel factor (c-kit ligand) promotes the survival of hematopoietic stem/progenitor cells in the absence of cell division*. Blood, 1995. **86**(5): p. 1757-64.
88. Kimura, Y., et al., *c-Kit-mediated functional positioning of stem cells to their niches is essential for maintenance and regeneration of adult hematopoiesis*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26918.
89. Giet, O., et al., *Increased binding and defective migration across fibronectin of cycling hematopoietic progenitor cells*. Blood, 2002. **99**(6): p. 2023-31.
90. van den Berk, L.C., et al., *Disturbed CXCR4/CXCL12 axis in paediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia*. Br J Haematol, 2014. **166**(2): p. 240-9.
91. Schemionek, M., et al., *BCR-ABL enhances differentiation of long-term repopulating hematopoietic stem cells*. Blood, 2010. **115**(16): p. 3185-95.
92. Udonsakdi, C., et al., *Phenotypic heterogeneity of primitive leukemic hematopoietic cells in patients with chronic myeloid leukemia*. Blood, 1992. **80**(10): p. 2522-30.
93. Lasry, A. and Y. Ben-Neriah, *Senescence-associated inflammatory responses: aging and cancer perspectives*. Trends Immunol, 2015. **36**(4): p. 217-28.
94. Yoon, J.Y., et al., *Association of interleukin-6 and interleukin-8 with poor prognosis in elderly patients with chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma, 2012. **53**(9): p. 1735-42.
95. Lu, K., et al., *The STAT3 inhibitor WP1066 reverses the resistance of chronic lymphocytic leukemia cells to histone deacetylase inhibitors induced by interleukin-6*. Cancer Lett, 2015. **359**(2): p. 250-8.