

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**“PROLIFERACION Y EXPANSION *IN VITRO* DE CELULAS  
PROGENITORAS HEMATOPOYETICAS HUMANAS PRESENTES  
EN LA SANGRE DE CORDON UMBILICAL”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**PRESENTA**

**BIOL. PATRICIA GUADALUPE FLORES GUZMAN**

***DIRECTOR DE TESIS:***

**DR. HECTOR MAYANI VIVEROS.**

**LABORATORIO DE HEMATOPOYESIS Y CELULAS TRONCALES  
UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN ENFERMEDADES ONCOLOGICAS.  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.**

**MEXICO, D. F.**

**2006**

M 708516



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: Patricia Gpe. Flores Guzman  
FECHA: 20/06/06  
FIRMA: [Firma]

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Hematopoyesis y Células Troncales, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la supervisión del Dr. Héctor Mayani Viveros y el apoyo del comité tutorial conformado por el Dr. Octavio T. Ramírez Reivich y la Dra. Susana H. Kofman Epstein.

Durante la realización del presente trabajo se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Estudios de Posgrado (UNAM), el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y el Instituto Mexicano del Seguro Social.

*A mis padres.*



## INDICE:

	Página
<b>RESUMEN ESPAÑOL</b>	5
<b>RESUMEN INGLES</b>	7
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	9
<b>I. INTRODUCCION</b>	
1.1 Hematopoyesis	10
1.2 Autorenovación y diferenciación	10
1.3 Origen de las células sanguíneas durante el desarrollo.	13
1.4 Inmunofenotipo de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas	14
1.5 Microambiente hematopoyético	18
1.5.1 Estroma celular	19
1.5.2 Citocinas	20
1.6 Estudio de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas	25
1.6.1 Ensayos <i>in vitro</i>	26
1.6.2 Ensayos <i>in vivo</i>	27
1.7 Fuentes alternas de células troncales hematopoyéticas: sangre de cordón umbilical	28
1.8 Expansión <i>in vitro</i> de células troncales y progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical	34
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	38
<b>III. HIPOTESIS</b>	41
<b>IV. OBJETIVOS</b>	
4.1 Objetivo General	42
4.2 Objetivos Particulares	42
<b>V. MATERIALES Y METODOS</b>	
5.1. Obtención del material biológico.	43
5.2. Procesamiento de muestras y obtención de células mononucleares de sangre de cordón umbilical.	43

5.3. Obtención de la Población I.	44
5.4. Obtención de la Población II.	44
5.5. Inmunofenotipo de las células de sangre de cordón umbilical.	
5.5.1. Cuantificación de las células	
CD34+ en las poblaciones enriquecidas.	45
5.5.2. Análisis inmunofenotípico por citometría de flujo.	46
5.6. Cultivos en suspensión:	
5.6.1. Cultivos en presencia de suero:	
Células mononucleares y Población I.	46
5.6.2. Cultivos en medio libre de suero:	
Población I	47
5.6.3. Cultivos en medio libre de suero:	
Población II.	48
5.6.4. Reselección negativa: Remoción	
continúa de poblaciones maduras	
(Lin+) generadas en los cultivos.	48
5.6.5. Cultivos Quiméricos.	48
5.7. Ensayos de formación de colonias hematopoyéticas.	50
5.8. Análisis morfológico.	51
5.9. Estadística	51
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	
<b>6.1 Cultivo de las poblaciones celulares en presencia de suero.</b>	
6.1.1 Células mononucleares.	52
6.1.2. Población I.	54
<b>6.2 Desarrollo de las poblaciones celulares en cultivos</b>	
<b>    libres de suero.</b>	
6.2.1. Población I	71
6.2.2. Población II.	74
<b>6.3 Desarrollo de las poblaciones celulares en cultivo</b>	
<b>    en presencia de células troncales mesenquimales</b>	
<b>    de médula ósea normal.</b>	93
<b>6.4 Desarrollo de la población celular en cultivo ante</b>	
<b>    la remoción continua de células maduras (Lin+).</b>	104

<b>VII. DISCUSION GENERAL</b>	116
<b>VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	122
<b>IX. BIBLIOGRAFIA</b>	124
<b>X. ARTICULOS PUBLICADOS</b>	142

## RESUMEN

La sangre de cordón umbilical (SCU) es una fuente alterna a médula ósea (MO) para obtener tanto a células troncales como progenitoras hematopoyéticas (CTH y CPH, respectivamente), de las cuales se derivan las células maduras de la sangre. Aunque se ha demostrado que las CTH y las CPH presentes en la SCU tienen mayor potencial de proliferación y expansión *in vitro*, en comparación con aquellas provenientes de MO o sangre periférica movilizada, a pesar que el volumen de muestra que puede ser obtenida de cada placenta corresponde del 10 al 20% del volumen comúnmente obtenido de MO, lo que repercute en el número total de CTH y CPH obtenidas. Es por ello que el estudio de estas células se ha centrado en generar sistemas de cultivo que permitan su expansión para utilizarlas en la clínica. Entre las estrategias más empleadas está el aislar a las células en base al antígeno CD34 (células CD34+), el cual define a las CPH. Sin embargo, la selección en base a este marcador (selección positiva), presenta el problema de que hay un alto porcentaje de células positivas para marcadores específicos de linaje (Lin+) a la par que a CD34, así como la segregación de CTH que, dependiendo de su estado en ciclo celular, pueden tener ausente este antígeno.

En el presente trabajo se analizó el comportamiento funcional (proliferación, expansión y diferenciación) de dos poblaciones celulares de SCU, obtenidas por un sistema de selección negativa. La Población I, fue enriquecida en células CD34+Lin- y la Población II, lo fue en células CD34+CD38-Lin-. Se consiguió un enriquecimiento de 26 veces para la Población I y de 70 veces para la Población II con respecto a la presencia del antígeno CD34, el cual se confirmó con la capacidad de formar colonias hematopoyéticas en cultivos semisólidos (UFC). Se analizó la proliferación de ambas poblaciones en cultivos líquidos en presencia de citocinas hematopoyéticas. Los resultados obtenidos muestran que las células presentes en la Población I, son capaces de proliferar más de 1000 veces durante 15 días en cultivo, mientras que la Población II alcanza valores superiores a las 2000 veces. Ambas poblaciones incrementaron su número de UFC en las condiciones de cultivo empleadas, aunque este fue menor en la Población I, indicando que se trata de poblaciones celulares diferentes.

La presencia de una capa de células troncales mesenquimales proveniente de médula ósea normal no modifica la capacidad de proliferación ni de expansión de cada una de las poblaciones, pero evidencia la necesidad de estímulos estromales sobre la población más inmadura. Al eliminar consecutivamente las poblaciones de células Lin+ generadas a lo largo del tiempo en cultivo, se manifestó el efecto que tienen estas células sobre las más inmaduras, sin aclararse si este efecto fue mediado por consumo de nutrientes en el medio o por secreción de citocinas inhibitorias de la proliferación y expansión.

Los resultados obtenidos indican que si bien ambas poblaciones son capaces de responder a los efectos estimuladores de las citocinas empleadas, la Población II es más inmadura que la Población I. Sin embargo, los datos no permiten señalar con certeza si las diferencias entre ambas poblaciones son inherentes a su etapa de comprometimiento y maduración al momento de ser seleccionadas, si son el resultado de diferentes requerimientos intrínsecos a cada población, o una combinación de ambos. Así mismo, resultados obtenidos permiten considerar al sistema de enriquecimiento aquí empleado para ser utilizado con fines de expansión preclínica, en intervalos de cultivo cortos.

## Fe de erratas:

En la página 7, al final del párrafo, último renglón, sustituir: "the presence of mesenchymal troncal cells (adherent cell layers) did ..." por: "..., the presence of mesenchymal stem cells (adherent cell layers) did ...".

Abstract:

Umbilical cord blood (UCB) is an alternative source to bone marrow (BM) for obtaining hematopoietic stem and progenitor cells (HSC and HPC, respectively) which give rise to all the different types of mature blood cells. It has been clearly demonstrated that HSC and HPC from UCB possess higher proliferation and expansion potentials than those observed for their adult counterparts (a unit from UCB is usually 10% to 20% of the volume obtained from a BM collection), thus the total number of primitive cells obtained from UCB is much lower than the number obtained from BM. This fact has prompted several research groups to devote their efforts towards the establishment of *in vitro* systems, for the expansion of UCB-derived stem and progenitor cells that focused on the isolation of CD34+ cells, which contain HSC and HPC. However, there are intermediate cells already committed to specific blood lineages; on the other hand, by isolating CD34+ cells, the population of primitive stem/progenitor cells that do not express such antigen is left out.

In the present study, we have used a negative selection system (that eliminates Lin+ cells) to isolate two different UCB-derived populations of Lin- cells. Population I was enriched for CD34+Lin- cells, whereas Population II was enriched for CD34+CD38- Lin- cells. Furthermore, both populations were enriched for colony-forming units (CFU). The proliferation, expansion and differentiation capacities of these two populations were assessed in liquid cultures supplemented with different combinations of recombinant human cytokines. Our results show that Population I was able to increase total cell numbers up to 1000-fold, whereas in Population II the maximum increase in total cells was over 2000-fold. Similarly, the capacity to generate more CFC after several days in culture was more limited in Population I as compared to Population II, indicating that the latter was more immature than the former. Interestingly, both populations responded to the different cytokine cocktails.

When Lin+ cells, generated *in vitro* from Lin- cells, were continuously removed from the cultures by weekly selections, proliferation and expansion of progenitor cells reached significantly higher levels, as compared to cultures in which only a single selection was performed on day 0 of culture. On the other hand, the presence of mesenchymal stromal cells (adherent cell layers) did not

induce larger increments in the generation of total cells or CFC, which showed the need of primitive cells for stimuli provided by stromal cells.

The results presented here indicate that (i) both cell populations obtained from UCB are highly responsive to the stimulatory effects provided by recombinant cytokines; (ii) significant differences, both in terms of function and composition, exist between the two populations, with Population II being more immature than Population I; (iii) the cultures system described by us seems to be a good alternative for pre-clinical or clinical expansion of HSC and HPC.



## LISTA DE ABREVIATURAS

**C:** Compartimiento.

**CICLP:** Células iniciadoras de cultivos a largo plazo.

**CMN:** Células mononucleares.

**CMV:** Citomegalovirus.

**CNT:** Células nucleadas totales.

**CPH:** Células progenitoras hematopoyéticas.

**CRS:** Células redoblantes de ratones NOD/SCID.

**CTH:** Células troncales hematopoyéticas.

**CTM:** Células troncales mesenquimales.

**EICH:** Enfermedad injerto contra huésped.

**Epo:** Eritropoyétina.

**FL:** Ligando de FLT3, por sus siglas en inglés.

**G-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos.

**GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos monocitos, por sus siglas en inglés.

**IL-3:** Interleucina 3.

**IL-6:** Interleucina 6.

**IvL:** Injerto contra leucemia.

**Lin:** Linaje.

**MO:** Médula ósea.

**PBS:** Solución amortiguadora de fosfatos.

**PtT :** Post trasplante.

**SCF:** Factor de células troncales, por sus siglas en inglés.

**SCU:** Sangre de cordón umbilical.

**SFB:** Suero fetal bovino.

**SPm:** Sangre periférica movilizada.

**Tpo:** Trombopoyetina.

**UFC:** Unidades formadoras de colonias.

**UFC-F:** Unidades formadoras de colonias de fibroblastos.

**VEB:** Virus de Epstein-Bar.

## I. INTRODUCCION

### 1.1 Hematopoyesis

Todas las células sanguíneas, independientemente de la función biológica que desarrollen, tienen su origen mediante un proceso denominado hematopoyesis (del griego *haimat-*, "sangre"; y *poiein*, "hacer" (Kalthoff, 2001). En el caso de mamíferos, la hematopoyesis se lleva a cabo en la médula ósea (MO) de los huesos largos en etapa postnatal a partir de un precursor común conocido como célula troncal hematopoyética (CTH) o célula madre hematopoyética. Estas células presentan como características que las definen (i) su capacidad de autorenovación, (ii) el alto potencial para generar los distintos linajes, de acuerdo al estímulo dado por las citocinas y el medio circundante, así como (iii) la capacidad de permanecer durante largos períodos de tiempo en fase  $G_0$  (Zambrano-Ramírez et al, 1999; Orlic y Bodine, 1994). En la figura 1 se esquematiza la hematopoyesis, y se señalan los diferentes compartimientos que se considera existen en este proceso (Ogawa et al, 1983).

### 1.2 Autorenovación y diferenciación

Las CTH son una población relativamente quiescente, y las señales celulares que dirigen su entrada a ciclo celular no se conocen con certeza. Sin embargo, el ambiente que las rodea (microambiente hematopoyético), tanto los componentes celulares como humorales (señales autócrinas y parácrinas) desempeñan una función importante. Dependiendo de las señales celulares y una vez que han entrado al ciclo celular, las CTH responderán a estas con la autorenovación o iniciarán el proceso de diferenciación hacia un linaje determinado; una tercera posibilidad es la apoptosis o muerte celular programada (Orlic y Bodine, 1994; Kondo et al, 2003).

El proceso de autorenovación es la capacidad de generar más CTH durante las divisiones celulares, a partir de una CTH (Kalthoff, 2001). Este proceso se considera que ha ocurrido cuando después de una división celular y al menos una de las dos células originadas presenta características semejantes a aquella que les dio origen (Kikland, 2004). Es decir, la célula original está preservando las características que la definen en una siguiente generación celular.

Por otra parte, la diferenciación se define como un proceso irreversible que conduce a una célula a una restricción en determinadas funciones y a la adquisición de nuevas capacidades (Metcalf y Nicola, 1995; Galli et al, 1994), y que en la hematopoyesis lleva a la generación de los diversos linajes sanguíneos. Sin embargo, este proceso no ocurre en un solo paso; se considera que existen varios compartimientos durante la hematopoyesis, ocupados por las células sanguíneas en los diferentes estadios de diferenciación (Ogawa et al, 1983). Así, tenemos que el primer compartimiento (CI, en la figura 1) está ocupado por las CTH, de las cuales se originan el resto de las células sanguíneas. En el siguiente compartimiento (CII) se agrupan a las células progenitoras hematopoyéticas (CPH), las cuales se caracterizan funcionalmente por su capacidad de generar colonias *in vitro* (unidades formadoras de colonias, UFC). Dichas colonias pueden incluir uno o más linajes dependiendo de la inmadurez de las células progenitoras. Cabe aclarar que no todas las CPH forman colonias *in vitro*, pero sí todas las UFC son CPH.

El compartimiento III está formado por las células precursoras y el IV por células maduras de la sangre; en ambos compartimientos, se ubican a las células clasificadas de manera clásica en los estudios de morfología sanguínea.

El proceso de diferenciación involucra en sí mismo dos propiedades: una que es la adquisición de un compromiso o restricción a la diferenciación hacia un linaje celular determinado (o linajes); la segunda característica, y que ocurre desde el momento mismo que la CTH o CPH inicia su diferenciación, es la maduración. Mientras la diferenciación es la especialización o la adquisición de características diferentes a las originales, la maduración es el proceso por el cual se llega a dicha especialización (Galli et al, 1994; Metcalf, 2001).

Los procesos celulares que llevan a la diferenciación no se conocen con certeza, pero se han propuesto modelos que la dirigen. Los modelos más aceptados son los propuestos por las escuelas determinista y estocástica. La escuela determinista formula en realidad dos modelos: Uno que plantea un potencial predeterminado, donde los factores de crecimiento tienen una función permisiva, y el otro que sugiere la existencia de un control extracelular de la autorenovación y diferenciación (Kikland, 2004).

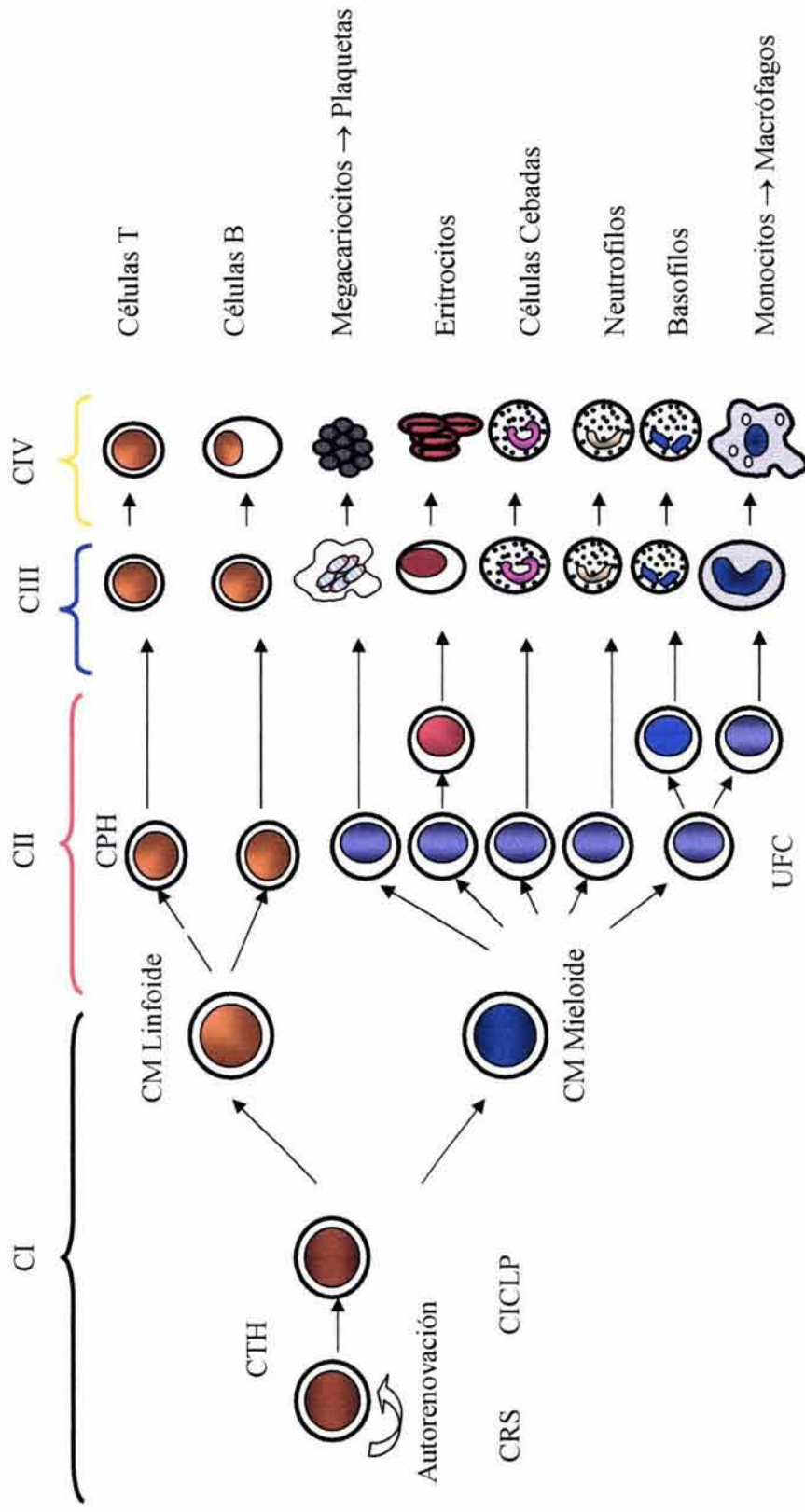


Figura 1: Esquema de la jerarquía hematopoyética. El primer compartimiento (CI) incluye a las células más primitivas, las células troncales hematopoyéticas (CTH), capaces de autorrenovarse y originar a todos los linajes sanguíneos, detectadas por ensayos in vivo (ensayo de células repoblatantes de ratones NOD-SCID (CRS)) e in vitro (ensayo de células iniciadoras de cultivos a largo plazo (CICLP)). Se incluyen a las células multipotentes (CM) para linaje mieloide y linaje linfoide. El segundo compartimiento (CII), agrupa a las células capaces de formar colonias in vitro (UFC), denominadas células progenitoras hematopoyéticas (CPH). En el tercer compartimiento (CIII), se incluyen a las células precursoras sanguíneas y en el cuarto (CIV) a las células maduras, identificables ambas por morfología. Modificado de Szilvassy, 2003.



El modelo de potencial predeterminado o de "pérdida secuencial de la potencia", propone que los procesos de diferenciación están preprogramados y que pueden ser predichos; y los factores de crecimiento actúan permitiendo la supervivencia de las CPH. Por su parte, el modelo de control extracelular sugiere que, el proceso de comprometimiento es dirigido por la combinación de factores de crecimiento que la célula encuentra, y es el microambiente quien dirige la autorenovación o diferenciación (Kikland, 2004).

La escuela estocástica, por su parte, expone que el nacimiento y muerte de las CTH y CPH es dirigido por eventos aleatorios o de probabilidad. Este modelo surgió de los estudios de Till, McCulloch y Siminovitch (1964), los cuales propusieron que la autorenovación es regulada de forma estocástica, pudiendo ser una probabilidad predicha para una población dada, pero no para la progenie de una CPH individual (May y Enver, 2001). Inicialmente, el modelo planteaba que el comprometimiento a un linaje determinado es un evento de probabilidad, que ocurre independientemente de señales extrínsecas, donde los factores de crecimiento, necesarios para la supervivencia y proliferación de las células ya comprometidas, no desempeñan una función decisiva en dicho proceso. Así el control del compartimiento de las CTH es gobernado por el parámetro  $p$ , el cual es la probabilidad de autorenovación que puede estar bajo la regulación de factores humorales (Kikland, 2004), pero las progenies generadas no están sujetas a tal parámetro. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que la elección del linaje también puede ser un evento aleatorio, sin excluir la posibilidad de que sea regulado por factores extrínsecos (Ogawa, 1993).

Si bien existen resultados experimentales que apoyan ambas escuelas, se ha llegado a un cierto consenso para aceptar que existe una etapa temprana durante la hematopoyesis que esta es dirigida como lo predice el modelo estocástico y otra tardía donde los eventos son dirigidos por las citocinas y el microambiente según lo sugiere la escuela determinista (modelo híbrido) (Just et al, 1992; Testa et al, 1996; Ziegler et al, 1999).

### 1.3 Origen de las células sanguíneas durante el desarrollo.

La hematopoyesis en mamíferos se inicia en el saco vitelino y en tejidos que rodean la región llamada aorta-gónada-mesonefros (AGM) en el embrión

tardío (Medvinsky y Dzierzak, 1996; Nishikawa et al, 2001; Kalthoff, 2001). A partir de este sitio, las CTH migran, vía torrente sanguíneo, hacia el hígado fetal y de ahí a los tejidos hematopoyéticos adultos: médula ósea, bazo y nódulos sanguíneos (Christensen et al, 2004). El proceso de migración ocurre a la par que empiezan los eventos de angiogénesis y vasculogénesis en el embrión, por lo cual se encuentran en circulación fetal tanto a CTH como CPH. Los mecanismos que regulan el traslado de las CTH a los diferentes sitios hematopoyéticos durante la embriogénesis no se conocen con certeza, pero se cree que muchos de ellos están bajo la acción de algunos morfógenos, los cuales dirigen por quimiotaxis o gradientes de concentración la migración de las células hematopoyéticas. Entre los candidatos se encuentran la proteína morfogénica de hueso 4 (BMP-4, por sus siglas en inglés) y la activina, miembros ambos de la familia del factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF $\beta$ , por sus siglas en inglés); en ratones que no expresan niveles normales de la proteína BMP-4 (BMP-4<sup>-/-</sup>), se han encontrado severos defectos en la eritropoyesis y en la formación del mesodermo del saco vitelino. Otros posibles reguladores son el factor de crecimiento de fibroblastos, la cinasa de hígado fetal 1 y la integrina  $\beta$ 1 (Gilbert, 2003; Christensen et al, 2004).

#### 1.4 Inmunofenotipo de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas.

Si bien las características funcionales que definen a las CTH y a las CPH se han identificado por ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, existen diversos antígenos de superficie que han permitido identificarlas.

Hasta ahora no existe un marcador único que defina a las CTH, sino más bien es por la presencia de ciertas de moléculas de superficie celular y la ausencia de otras. Existe consenso en que las CTH carecen de marcadores específicos de linaje, presentes en las células sanguíneas maduras; por ello, se considera que son células linaje negativas (Lin<sup>-</sup>). Esta primera selección de células Lin<sup>-</sup>, permite enriquecer la población de CTH de 20 a 500 veces, dependiendo de la combinación de anticuerpos que se use (Thomas et al, 1997). Por otra parte, de las moléculas que se pueden encontrar en la superficie de las CTH y CPH, el marcador más empleado (y el primer encontrado casi exclusivo de esta población) es CD34. CD34 es una glicoproteína de superficie celular que presenta un dominio extracelular largo,



con una región semejante a mucina O-glicosilada y que es expresada de 1 a un 4% de las células nucleadas en aspirados de médula ósea normal y <0.1% de las células nucleadas en la sangre periférica humana normal (Miraglia et al, 1997; Wognum et al, 2003). En las poblaciones enriquecidas en células CD34+lin- se encuentra la mayoría de las células con potencial de repoblación de los diferentes linajes sanguíneos *in vivo*, realizados al transplantar células humana en ratones inmunosuprimidos (ensayos de células repoblantes en ratones NOD-SCID, CRS), todas las células capaces de iniciar y mantener cultivos a largo plazo (ensayos de células iniciadoras de cultivos a largo plazo, CICLP), y casi la totalidad de UFC. En la figura 1 se ejemplifica a que nivel dentro del esquema de la hematopoyesis se cree que se encuentran las células detectadas por los ensayos arriba mencionados, mientras que en la figura 2, se ubican parte de las poblaciones caracterizadas en base a la presencia de los antígenos correlacionándolas con los ensayos funcionales. En el cuadro 1, se muestran algunas de las características inmunofenotípicas de las CTH y CPH

La proporción de CTH es muy pequeña: entre 0.01 y 0.001% de las células hematopoyéticas presentes en la médula ósea (Szilvassy, 2003; Majka et al, 2005). La presencia de CTH, se analiza por los ensayos de CICLP y CRS, respectivamente. Sin embargo, existe controversia sobre cual población es más inmadura, existiendo reportes que indican que células obtenidas con un panel semejante de antígenos de superficie tienen características desde muy similares hasta completamente diferentes en los mismos ensayos funcionales. Al parecer existe un traslape de actividad de célula troncal entre las diferentes subpoblaciones. Por ejemplo, en células humanas, si bien toda la población CD34+Lin- tiene actividad repoblante, al separarla en células CD34+CD38+Lin- y CD34+CD38-lin-, esta última comprende aproximadamente del 10 al 20% de las células CD34+ totales y casi la totalidad de las CRS se encuentran en ella (Ramsfjell et al, 1999; Greenberg et al, 2000; Dorrel et al, 2000). Por ello, se ha llegado a un cierto consenso en base a estudios inmunofenotípicos sobre los antígenos que definen a las CTH: Se cree que son en su mayoría células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD133+HLA-DR<sup>-low</sup>CD117<sup>-low</sup> Lin-, siendo poco receptivas a colorantes específicos de la síntesis de ácidos nucleicos (Rh-123<sup>low</sup>) (Szilvassy et al, 1995).

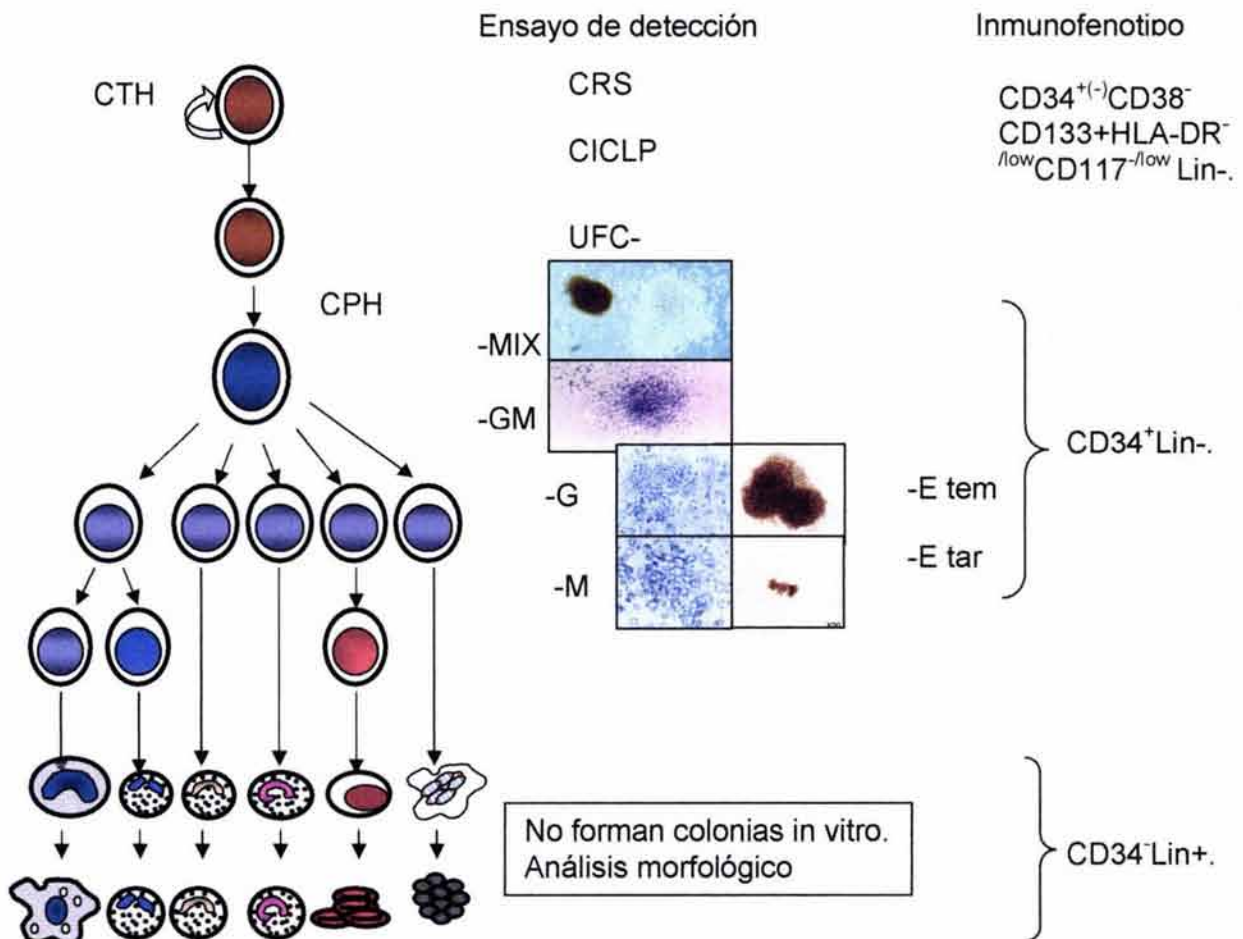


Figura 2: Esquema de las relaciones entre marcadores inmunofenotípicos con los ensayos funcionales para el análisis de las células hematopoyéticas mieloideas y su jerarquía. CTH: Células Troncales Hematopoyéticas; CRS: Células repoblantes de ratones NOD/SCID; CICLP: Células iniciadoras de cultivos a largo plazo; CPH: Células Progenitoras Hematopoyéticas; UFC: Unidades formadoras de colonias: -MIX: Mixtas o GEMM (colonia conteniendo células de linaje granulocítico, eritroide, monocítico-macrófágico y megacariocítico), colonia originada por una CPH multipotente; -GM: colonia con granulocitos y monocitos-macrófagos originada por una CPH bipotente. -G y -M: colonias de linaje granulocítico o monocítico-macrófágico, originadas por una CPH comprometida a linaje granulocítico o una CPH comprometida a linaje monomacrófágico. -E tem: colonia originadas por una CPH eritroide temprana; -E tar: colonia originadas por una CPH eritroide tardía.

Modificado de: Szilvassy, 2003; Metcalf y Nicola, 1995; Akashi y Weissman, 2001.



Cuadro 1: Características inmunofenotípicas de las células presentes en los diferentes compartimientos de la hematopoyesis. Se ejemplifican algunas moléculas analizadas para células humanas de médula ósea y sangre periférica en condiciones normales.

Marcador	CTH	CPH	Células sanguíneas precursoras y maduras.	Referencias
CD34	Presente o ausente	Presente	Ausente	Szilvassy, 2003
CD38	Ausente	Baja a nula expresión	Presente en precursores de células B, T y mieloides. Ausente en células maduras hematopoyéticas.	Szilvassy, 2003 Abbas et al, 2000 Mehta et al, 1996 Ogawa, 2002
CD133	Presente	Presente	Ausente	Szilvassy, 2003 De Wynter et al, 1998 Yin et al, 1997 Miraglia et al, 1997
Thy 1.1	Baja expresión	Presente	Presente en timocitos y células de venas de endotelio alto y neuronas	Szilvassy, 2003 Abbas et al, 2000
CD117 (c-kit)	Baja a nula expresión	Presente	Presente en timocitos y células cebadas.	Szilvassy, 2003 Abbas et al, 2000
VEGFR1	Presente			Wognum et al, 2003
KDR (VEGFR2)	Presente		Presente en endotelios.	Szilvassy, 2003 Wognum et al, 2003
CD2,CD3, CD4,CD8	Ausente	Ausente	Presente en poblaciones linfoides T.	Abbas et al, 2000
CD19, CD20	Ausente	Ausente	Presente en poblaciones linfoides B.	Abbas et al, 2000
CD66	Ausente	Ausente	Presentes la mayoría de sus isoformas (a-g) en granulocitos.	Abbas et al, 2000
CD14, CD15, CD16	Ausente	Ausente	Presente en macrófagos, granulocitos y para CD16, también en células NK.	Abbas et al, 2000
CD71, Glicoforina A	Ausente	Ausente	Presente principalmente en células eritroides.	Szilvassy, 2003 Abbas et al, 2000
HLA-DR	Baja a nula expresión	Ausente	Presente en células profesionales presentadoras de antígenos	Szilvassy, 2003

Por otra parte, es importante mencionar que si bien el antígeno CD34 agrupa a la mayoría de las CTH/CPH, recientemente se caracterizó una población que carece de este marcador y que al parecer también se comporta como CTH. La proporción en la que se encuentran estas células es inferior a la observada para células CD34+ (0.28% en células mononucleares de MO para células CD34- comparado con 1-4% de células CD34+ en la misma fuente) (Bathia et al, 1998; Nakamura et al, 1999). Aunque los primeros trabajos sugirieron que las células CD34- daban origen a las células CD34+ tanto *in vivo* como *in vitro* (Zanjani et al, 1998; Nakamura et al, 1999; Ando et al, 2000), la acumulación de evidencia indica otra cosa. Se ha observado que el antígeno CD34 es una molécula dinámica en superficie celular, pudiendo ser internalizada dependiendo del estatus del ciclo celular o por efecto de citocinas como SCF (Sato et al, 1999; McGukin et al, 2003; Dao et al, 2003). Se ha comprobado que células CD34+ introducidas en ratones inmunosuprimidos pueden revertir este fenotipo, pasando a ser células CD34- (Engelhardt et al, 2002). Así, aunque no se descarta la presencia de células CD34- durante determinada etapa de desarrollo ontogénico de las CTH y CPH, su detección al parecer fue debido a una internalización del antígeno más que a la ausencia del mismo en las células (Engelhardt et al, 2002). Un comportamiento semejante se ha visto para el antígeno CD38 en ratón, pudiendo encontrarse células CD34-CD38-Lin- con capacidad de injerto en modelos murinos (Ito et al, 2000; Tarima et al 2001); sin embargo, aún no se cuenta con evidencia sobre una conducta semejante en células humanas, pero por ello no puede descartarse que no ocurra. Aunque parte de la información generada al respecto de la conducta de los antígenos sobre la superficie de las CTH aún es objeto de controversia, se debe tomar en cuenta para el estudio de la hematopoyesis, tanto la actividad dinámica del antígeno CD34 y/o CD38 en superficie celular así como su posible ausencia sobre las verdaderas CTH.

### 1.5. Microambiente hematopoyético

Las células hematopoyéticas inmaduras en diferentes estadios de diferenciación radican en la médula ósea en etapa postnatal; ahí establecen una interacción estrecha con células de origen no hematopoyético, así como

con proteínas de matriz extracelular y citocinas, hormonas y proteínas solubles. Estos elementos, que de manera colectiva reciben el nombre de microambiente hematopoyético, forman una intrincada red de señales positivas y negativas que actúan sobre las CTH y CPH, desempeñando una función clave en los procesos de diferenciación y autorenovación de las mismas.

#### 1.5.1 Estroma celular:

La palabra *estroma* es derivada del griego *στρωμα* que significa cama o colchón (Deryugina y Müller-Sieburg, 1993; Short et al, 2003; Simmons et al, 2001). De acuerdo con este concepto, se ha usado el termino para nombrar al tejido conectivo que sirve de soporte al tejido funcional de un órgano (Short et al, 2003). En relación con el microambiente de la médula ósea, se le dio el nombre de estroma al grupo de células estrechamente asociadas con células hematopoyéticas que servían de "colchón" o soporte en la médula ósea para la formación de focos donde se lleva a cabo la hematopoyesis en forma activa (Mayani et al, 1992; Simmons et al, 2001). El estroma de médula ósea esta formado por un heterogéneo grupo de células, entre las que se reconocen tanto componentes de origen hematopoyético como no hematopoyético. Entre los primeros, se encuentran los macrófagos, aunque también pueden incluir a las células dendríticas (Stingl y Bergstresser, 1996). Formando parte de células no hematopoyéticas que componen el estroma celular, se encuentran los adipocitos y preadipocitos, células semejantes a músculo liso, endoteliales, epiteliales, fibroblastos, así como células remodeladoras del hueso (osteoblastos, osteocitos y osteoclastos) (Deryugina y Müller-Sieburg, 1993). Las células estromales se originan del mesodermo en etapa embrionaria, al igual que las células hematopoyéticas. En etapa postnatal y por estudios *in vitro*, en la médula ósea se han descrito progenitores de células estromales (UFC-F, unidades formadoras de colonias de fibroblastos), los cuales tienen la capacidad de formar capas confluentes de células adherentes en cultivos tipo Dexter (Simmons et al, 2001). Sin embargo, actualmente se considera que existe un precursor para las células estromales y, posiblemente, también exista una jerarquía dividida en compartimientos, de manera semejante a la descrita para las células hematopoyéticas. En este caso, los progenitores más

primitivos, o células troncales del estroma son conocidos como células troncales mesenquimales (CTM), y se ha comprobado por ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, que son capaces de generar no sólo células presentes en el estroma de la médula ósea (adipocitos, endotelio, fibroblastos, osteoblastos, condrocitos) sino también células con características de órganos diferentes: miocitos, astrocitos y hepatocitos (Krause et al, 2001; Herzog et al, 2003; Pittinger, 2004; Kopen et al, 1999). El campo de estudio de las células mesenquimales ha crecido en los últimos años, debido a las posibles repercusiones en su aplicación clínica (Bianco et al, 2001). Independientemente de ello, se ha propuesto que la heterogeneidad celular presente en el estroma de la médula es necesaria para regular o modular la diferenciación o autorenovación de las CTH, no sólo con las interacciones célula-célula, sino también con la producción y/o control de factores humorales (Metcalf y Nicola, 1995).

#### 1.5.2 Citocinas.

Muchos factores interactúan con las CTH en el microambiente medular para mantener su autorenovación, proliferación y diferenciación (Smith et al, 2004). Los principales reguladores humorales son las citocinas, aunque se ha demostrado que factores quimiotácticos (quimiocinas) (Lee et al, 2002) y hormonas clásicas pueden regular, en determinado espacio y tiempo, la producción de células sanguíneas.

Las citocinas son glicoproteínas de acción semejante a hormonas que actúan a cortas distancias en poblaciones celulares y no sobre algún órgano blanco. Una gran parte de las citocinas reguladoras de la hematopoyesis es producida por las células estromales presentes en la médula ósea, pero también por otros órganos. Algunas son generadas por las mismas CTH y CPH, existiendo así tanto mecanismos parácrinos como autócrinos. Distintas citocinas actúan a diferentes niveles durante la hematopoyesis y su importancia o acción directa va a depender en gran parte del estado de las células blanco y de la presencia o ausencia de otras citocinas y factores humorales (hormonas, quimiocinas, proteínas de matriz extracelular, receptores, etc) (Metcalf y Nicola, 1995; Heaney y Golde, 1996).

Si bien no se conoce la combinación exacta de citocinas que permita la expansión de las CTH y las CPH, se sabe que todas ellas actúan a determinado nivel durante su comprometimiento y diferenciación (Metcalf y Nicola, 1995). La función de las citocinas sobre las CTH y las CPH no se limita a inducir su entrada a ciclo celular (estas células no se encuentran en un estado completamente quiescente, pero sí a un bajo nivel de proliferación; la gran mayoría de ellas en estado G0/G1), sino también son capaces de afectar su conducta, inhibiendo o estimulando su expansión o diferenciación (Marone et al, 2002). El concepto de expansión no es un sinónimo de proliferación, aunque involucra un incremento en el número total de células; más bien hace referencia al incremento de una población en particular, con características semejantes a las células que las originaron (autorenovación); puede ocurrir que la población inicial se pierda al originarse nuevas células con menor o nula capacidad de autorenovación, o por diferenciación (Figura 3).

La clasificación de las citocinas puede realizarse dependiendo del tipo de células que las genere (p.e. monocinas, linfocinas); por el nivel al que llevan a cabo su acción (autócrina, parácrina o endócrina), o por el tipo de blancos a los que afecte. Abbas et al (2000), clasifica a las citocinas en tres grupos: A) Mediadores y reguladores de la inmunidad innata, B) Mediadores y reguladores de la inmunidad adaptativa y C) Estimuladores de la hematopoyesis.

Desde el punto de vista del proceso de diferenciación hematopoyética, visto como un evento progresivo y gradual, regido por diferentes factores a lo largo del mismo, las citocinas hematopoyéticas pueden ser clasificadas como de acción temprana, intermedia o tardía (Cuadro 2). Esta clasificación es arbitraria y basada en ensayos *in vitro*, lo cual no descarta la interrelación en varios compartimientos hematopoyéticos de una sola citocina. Las citocinas de acción temprana son necesarias para los eventos de autorenovación y mantenimiento, involucrando a las CTH. Sin embargo, varias de las citocinas de acción temprana no se restringen a las CTH, sino también son necesarias para la diferenciación terminal a un linaje en particular. Tal es el caso de la Trombopoyetina (Tpo), la cual es indispensable para la supervivencia de las CTH *in vitro* y para la diferenciación terminal de megacariocitos.

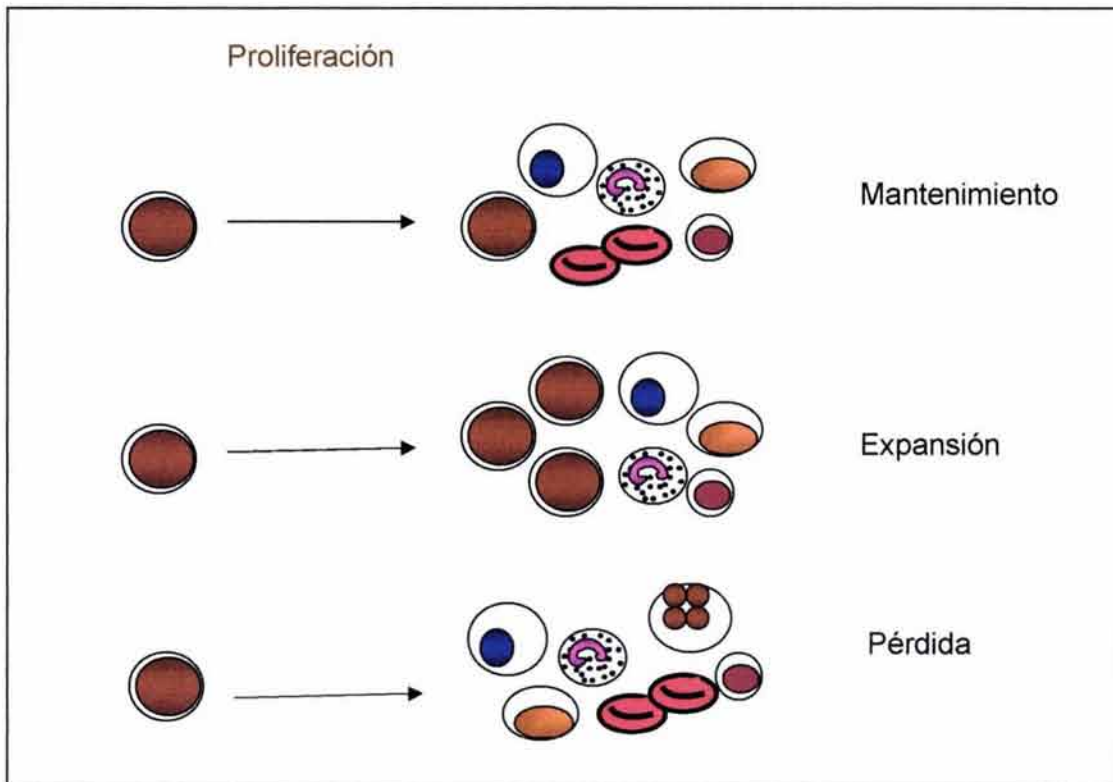


Figura 3: Definición de los conceptos de expansión, mantenimiento y pérdida celular. En todos los casos, se implica una proliferación (incremento en número celular); sin embargo, puede existir un mantenimiento de la población con características semejantes a la que le dio origen. Una segunda posibilidad, es que esta población se incremento (expansión) o bien, que ocurra una pérdida de la misma en la nueva generación de células originadas. Tomado de Flores-Guzmán et al, 2002.



Cuadro 2 Clasificación de diversas citocinas implicadas en el mantenimiento, expansión y proliferación de CSH/CPH.

Nombre y sinónimos		Efecto sobre células hematopoyéticas		Referencias	
<b>Citocinas de acción temprana</b>					
SCF	Factor de Células Troncales ("stem cell factor"), factor de crecimiento de células cebadas, ligando de c-kit, factor Steel.	Indispensable en la generación de todos los linajes sanguíneos. Su ausencia provoca muerte en útero. Acción sinérgica con diversas citocinas amplificando la generación de linajes mieloide y eritroide.	Galli et al, 1994. Broudy, 1997.		
FL	Ligando de FLT-3/FLK-2 (fetal liver tyrosine ligand-3)	Actúa de manera indistinta sobre la generación de linaje mieloide y linfoide. Traslapa acciones con SCF. Coestimula la generación de colonias multipotentes. Acción sinérgica con diversas citocinas para la generación de todos los linajes sanguíneos.	Lyman et al, 1993 Omori et al, 1997. Fortunel et al, 1998. Dannaeus et al, 1998.		
IL-6	Interleucina -6	Acción sinérgica con IL-1 $\alpha$ e IL-3 en la megacariopoyesis, pero sin efecto a largo plazo.	Briddell et al, 1992 Watowich et al, 1996. Metcalf y Nicola, 1995.		
Tpo	Trombopoyetina, Factor de crecimiento y diferenciador de megacariocitos, ligando de c-mpl.	Mantiene la supervivencia de una amplia proporción de CPH primitivas de manera conjunta con IL-3, SCF, e IL-6. Su ausencia provoca muerte en útero.	Kaushansky, 1997. Miyazaki y Kato, 1999.		
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$	Modula en superficie celular la presencia de receptores a citocinas de acción temprana y moléculas como CD34. Inhibición de la entrada a ciclo celular sobre células CD34+ primitivas.	Fortunel et al, 1998. Fortunel et al, 2000. Batard et al, 2000.		
MIP-1 $\alpha$	Proteína inflamatoria derivada de macrófagos, alfa.	Suprime el crecimiento de CPH multipotentes. Protección de CTH contra efecto citotóxico de drogas en estudios in vitro.	De Wynter et al, 1998. Dürig et al, 1998.		

Nombre y sinónimos	Efecto sobre células hematopoyéticas	Referencias
<b>Citocinas de acción Intermedia</b>		
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos monocitos ("granulocyte-macrophage colony stimulating factor")	Metcalf y Nicola, 1995.
IL-3	Interleucina-3	Briddell et al, 1992 Watowich, 1996. Metcalf, 1995.
IL-1 $\alpha$	Interleucina 1-alfa.	Briddell et al, 1992
<b>Citocinas de acción tardía</b>		
Epo	Eritropoyetina	Watowich et al, 1996. Abe et al, 1996
M-CSF	Factor estimulante de colonias de monocitos	Watowich et al, 1996. Metcalf y Nicola, 1995.
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos	Watowich, 1996. Metcalf y Nicola, 1995.
Tpo	Trombopoyetina	Miyazaki, et al, 1999.



Las citocinas de acción intermedia, son necesarias para el tránsito de las CTH al siguiente compartimiento (CPH); la acción de estas citocinas permite la amplificación de las CPH, y alcanzar los números celulares necesarios para cubrir los requerimientos del organismo. Las citocinas involucradas en estos eventos presentan entre otras características, la alta capacidad para inducir la proliferación además de actuar de manera sinérgica con factores específicos de linaje. Las citocinas de acción intermedia tienen una actividad promiscua, dependiendo de otros factores con los que se acompañen, si bien cada una por separado tiene preferencia a generar algún linaje en particular.

Las citocinas terminales o tardías, actúan como directores finales de diferenciación; es decir, los eventos de comprometimiento a determinado linaje ya ocurrieron en los dos primeros compartimientos y la madurez final de las células sanguíneas dependerá de que existan los factores necesarios.

Los trabajos en el área de la expansión *ex vivo* de las células hematopoyéticas se han enfocado en la función de diversas citocinas que influyen en la inmadurez de las CTH. Entre las citocinas de acción temprana, parte del trabajo ha sido centrado en el factor de células troncales, el ligando de FLT3/FLK2 (SCF y FL por las siglas en inglés) y Tpo (Yonemura et al, 1997; Luens et al, 1998; Yagi et al, 1999). Además de los potenciales beneficios de estas citocinas, otras como la proteína inflamatoria de macrófagos-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ , por sus siglas en inglés), pueden también regular la hematopoyesis (Verfaillie et al, 1994), mientras que IL-1 y TGF $\beta$  son reguladores negativos de la hematopoyesis (Verfaillie et al, 1994, Yonemura et al, 1996). Se ha sugerido que citocinas como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , interleucina 11 y el factor inhibitorio de la leucemia (TNF- $\alpha$ , IL-11, LIF, respectivamente) (Szilvassy et al, 1996) pueden ayudar a preservar el potencial hematopoyético.

#### 1.6 Estudio de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas.

Si bien se presupone la existencia de las CTH, es necesaria la demostración no sólo de su existencia sino de las características que las definen no sólo en ensayos *in vitro*, sino también *in vivo*.

Los numerosos trabajos que existen acerca de las CTH se han enfocado a dos aspectos principales, que aunque complementarios han sido analizados

por separado: por una parte, la multipotencialidad de las células y su autorenovación, y por otro conocer el número de CTH en un organismo y cómo es que un número limitado de las mismas tiene el potencial para generar un gran número de células maduras (Lemischka, 2001).

#### 1.6.1 Ensayos *in vitro*:

Aunque los tipos celulares que componen la sangre se describieron prácticamente desde la invención del microscopio, el proceso que lleva a la generación de los mismos a partir de CPH y CTH es menos conocido. El concepto de expansión *in vitro* de las CTH/CPH se deriva de los diseños experimentales en ratón para explicar la formación de las células sanguíneas y reproducir el microambiente de la médula ósea (Dexter et al, 1973). Idealmente, los sistemas de cultivo *in vitro* para células hematopoyéticas intentan promover la autorenovación, manteniendo la generación de los diferentes tipos celulares sanguíneos, dirigiendo en algunos casos la diferenciación hacia un linaje en particular; es decir generar un balance entre la autorenovación y la diferenciación (Lemischka, 2001).

Funcionalmente, hay diversos métodos para evaluar a las CTH/CPH. Para las CPH y linajes derivados, se pueden emplear métodos de crecimiento sobre capas semisólidas como agar, metilcelulosa o agarosa (ensayos de colonias) o en cultivos en suspensión. El medio de cultivo semisólido, permite el crecimiento de colonias características de los diferentes linajes hematopoyéticos. Estas colonias se derivan de células individuales, y el tipo celular en las colonias indican el linaje al cual estaba comprometida la CPH original. De esta manera, la cuantificación de CPH se lleva a cabo de manera indirecta, por el número de colonias que se originaron. A este tipo de progenitor se le da el nombre de Unidad Formadora de Colonias, definida previamente en la figura 1. En los ensayos de colonias, se pueden distinguir tipos de progenitores con distinto grado de maduración: Unidades formadoras de colonias con alto potencial proliferativo (UFC-APP), multipotentes o mixtas (UFC-Mix, conteniendo células de origen eritroide, mieloide y megacariocítico), o bien restringidas a células de tipo eritroide (UFC-E temprana y UFC-E tardía), mieloide (UFC-G, para granulocitos y UFC-M, para monocitos/macrófagos) y

megacariocitos (UFC-Mega) (Figura 2) (Broxmeyer, 2004; Metcalf y Nicola, 1995).

Por otra parte, los sistemas de cultivo de células hematopoyéticas en suspensión, se dividen en cultivos con o libres de estroma; como su nombre lo indica, en los primeros se incluye una capa estromal, alogénica o autóloga, que actúa como capa "alimentadora", permitiendo la supervivencia de las CTH y CPH, con adición o no de factores recombinantes exógenos. Este sistema fue el primero que mantuvo con éxito a las CPH *in vitro* (Dexter et al, 1973), permitiendo el desarrollo de los cultivos libres de estroma, con el descubrimiento y síntesis de citocinas hematopoyéticas recombinantes. Si bien ambos sistemas de cultivo no son excluyentes, sí aportan información diferente, aunque complementaria: en los cultivos dependientes de estroma, se analiza la conducta no autónoma de las células, mediada por la regulación del microambiente, teniendo más variables en el sistema (tipo y concentración de citocinas, interacciones celulares y concentración celular, entre otros) (Lemischka, 2001). Por su parte, un sistema libre de estroma, permite controlar la concentración y tipo de citocina añadida, así como la concentración celular manejada a lo largo del cultivo; sin embargo, este sistema es más alejado de las características que rodean a las CTH/CPH *in vivo*.

Pese a todo, se carece de un modelo *in vitro*, que permita la identificación de las CTH capaces de repoblar a largo plazo. Los avances más significativos en este contexto son la utilización de ensayos de células iniciadoras de cultivos a largo plazo (CICLP), donde se analizan poblaciones celulares durante períodos prolongados, a diferencia de los ensayos de colonias que van de 10 a 14 días de cultivo, sobre capas semisólidas. Sin embargo, aunque estos ensayos permiten medir la capacidad de las CPH para generar progenitores después de períodos extendidos de tiempo, están limitados por su incapacidad para evaluar la autorenovación, potencial multilinaje o potencial de injerto (Smith et al, 2004).

#### 1.6.2 Ensayos *in vivo*:

El desarrollo de ratones inmunodeficientes capaces de mantener el crecimiento de células humanas ha permitido el estudio de poblaciones hematopoyéticas, expandidas o no, en un modelo *in vivo*. Estos modelos

incluyen a ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID, por severe combined immunodeficiency), ratones con inmunodeficiencia severa combinada y diabetes no obesa (NOD-SCID), y ratones con inmunodeficiencia ligada al cromosoma X, desnudos beige (BNX). Las células que son capaces de repoblar la médula de estos ratones inmunosuprimidos son denominadas como células repoblantes de ratones SCID (CRS). La relación de las CRS con las UFC y las CICLP, es aún controversial; sin embargo, las CRS son consideradas como las células hematopoyéticas más primitivas que han podido ser reconocidas (Smith, 2004).

#### 1.7 Fuentes alternas de las células troncales hematopoyéticas: Sangre de cordón umbilical

Diversas enfermedades dañan al sistema hematopoyético, trátase de enfermedades originadas en el mismo sistema o por consecuencia de algún padecimiento en otro órgano o sistema. La clasificación de estas enfermedades se ha basado no sólo en el tipo de linaje(s) que se encuentren dañados o abatidos, sino actualmente ya se realiza por rastreo genético y cromosómico. Independientemente de la patología de que se trate repercute en la calidad de vida del paciente, pues este puede requerir (en ciertos padecimientos), de medicamentos específicos o complementos alimenticios que corrijan el defecto, o en el caso de enfermedades crónico degenerativas o malignas, de terapia farmacológica o radiológica constante o un trasplante de médula ósea.

En el trasplante de células troncales y progenitoras hematopoyéticas, éstas se transfieren de una MO sana (donador) a un paciente (huésped) con alguna enfermedad donde su sistema hematopoyético sea incapaz de mantener la producción de sangre o que ponga en riesgo su vida (Abbas et al, 2000). Así, la MO del donador repoblará la del huésped, permitiéndole recuperar las funciones de todos los linajes hematopoyéticos. Si bien el fundamento es bastante simple, hay varios puntos que considerar. El sistema inmune es sumamente complejo y es capaz de discernir entre lo propio y lo no propio; esto permite montar respuestas eficientes ante la agresión de los antígenos a los que está expuesto el organismo a lo largo de su vida. Esta barrera inmunológica debe ser sobrepasada en los trasplantes, para asegurar que no exista rechazo entre el donador y el huésped. La primera manera de

evitarlo es considerar un donador lo más parecido inmunológicamente al huésped. Se realiza base las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (tanto clase I como clase II), las cuales difieren entre los individuos dependiendo del parentesco. La segunda manera, complementaria a la primera, es suprimir la respuesta inmune tanto del donador (eliminación de linfocitos T) como del huésped. El paciente recibe un tratamiento agresivo, ya sea quimioterapia y/o radiación, previo a la infusión de la MO normal de la cual se eliminan parcial o totalmente la presencia de linfocitos T.

Actualmente, los trasplantes de células hematopoyéticas no se realizan únicamente de MO, sino se cuenta con otras fuentes como son la sangre de individuos sanos, los cuales han recibido un tratamiento con ciertas citocinas que provocan la salida de CPH (y CTH) de la MO hacia la circulación (Pertengell et al, 1993) y la sangre de cordón umbilical.

A pesar de que se conoce la presencia de progenitores hematopoyéticos en la sangre de cordón umbilical desde 1974, la relevancia de la utilización de esta fuente no ocurrió sino hasta finales de la década de 1980. Knudtzon en 1974, documenta la presencia de progenitores mieloides en la sangre de cordón umbilical; sin embargo, pasarían más de 10 años para que se retomara esta observación, al publicarse datos que la corroboraban (Leary y Ogawa 1987; Broxmeyer et al, 1989). En 1989, Broxmeyer y su grupo de trabajo analizaron más de 100 muestras de sangre placentaria, encontrando CPH con capacidad de respuesta a varias citocinas hematopoyéticas y de generar colonias multipotentes en cultivos semisólidos. A este trabajo le siguió el primer trasplante empleando la sangre de cordón umbilical de un donador compatible en un niño con Anemia de Fanconi. Esta fue la primera evidencia clínica donde una unidad (la sangre obtenida de una sola placenta) de sangre de cordón umbilical (SCU) contenía números suficientes de CTH/CPH para mantener la hematopoyesis en un individuo (Gluckman et al, 1989; Kaufman et al, 2004).

A raíz del éxito obtenido con el primer trasplante empleando SCU, se iniciaron los esfuerzos para conocer la biología de las CTH y CPH presentes en esta fuente. Las preguntas no sólo se basan en su capacidad para restablecer las funciones hematopoyéticas de un individuo trasplantado, sino sus diferencias (si es que existen) con respecto a las CTH y CPH de individuos



adultos, y sus posibles aplicaciones en otras terapias celulares. Por ello, se crearon bancos con la finalidad de guardar las muestras de SCU para su posible uso en trasplantes no relacionados en un futuro (bancos públicos) o para su empleo por el mismo donador (bancos privados). Actualmente, existen más 150, 000 unidades congeladas en todo el mundo, y los bancos con mayor número de muestras se encuentran en Nueva York, EU (New Cord Blood Center), Milan, Italia (Milan Cord Blood Bank) y en Dusseldorf, Alemania (Bone Marrow Donor Center) (Kaufman et al, 2004, Chrysler et al, 2004).

Hasta el año 2005 se habían realizado más de 6000 trasplantes en todo el mundo, empleando la SCU como fuente de las CTH/CPH (Tse y Laughlin, 2005). La experiencia clínica con trasplantes de SCU, tanto con donadores relacionados (emparentados) como no relacionados, ha demostrado que existe una elevada probabilidad de injerto confiable, reducido riesgo de enfermedad injerto contra huésped (EICH) y un tiempo de supervivencia superior comparado con trasplantes de MO y sangre periférica movilizada (SPm) (Wagner et al, 1996; Kutzberg et al, 1996; Barker et al, 2001; Cohen y Nagler, 2004). Además, la SCU tiene las ventajas con respecto a MO, de no ser un tratamiento invasivo para el donador, que no implica ningún riesgo para el mismo, lo cual se refleja en costos de un trasplante. Así mismo, el bajo riesgo de transmisión de infecciones por citomegalovirus y herpesvirus (comunes en trasplantes de MO) y la alta capacidad de generación de todos los linajes sanguíneos, convierten a la SCU como una fuente atractiva para trasplantes (Hough et al, 2004). En el cuadro 3 se resumen algunas características de la SCU, en comparación con MO y SPm en su empleo en trasplantes de CTH/CPH.

Al igual que en la MO, en la sangre de cordón umbilical se han caracterizado los antígenos de superficie para las CPH y se han analizado las unidades formadoras de colonias (Cicutini et al, 1994; Mayani y Lansdorp, 1998). Se reconoce que 1 ml de SCU tiene aproximadamente 8000 progenitores eritroides, entre 5,000 a 14,000 progenitores mieloides y unos 1,000 a 10,000 progenitores multipotentes (Mayani y Lansdorp, 1998; Mayani et al, 2003).

Cuadro 3. Características comparativas entre las diferentes fuentes de CTH/CPH empleadas en terapias de trasplante.

	Médula ósea	Sangre periférica movilizada	Sangre de cordón umbilical	Referencia
Porcentaje células CD34+ en CMN	1-4%	15-20 %	0.8-2.9%	De wynter et al, 1998 Mayani et al, 1994
Riesgo donador	Presente	Presente	Inexistente	
Transmisión de infecciones virales como CMV y VEB	Alta	Alta	Mínima	Cohen et al, 2004 Arai et al, 2003 Hough et al 2004
Mortalidad relacionada con trasplante al día 100 PtT	28-67%	13-37%	19-27%	Arai et al, 2003 Cohen et al, 2004
Sobrevida a 2 ó 3 años PtT	28-66%	38%	49-64%	Cohen et al, 2004 Arai et al, 2003
Recuperación neutrofílica	15-25 días PtT	12-19 días PtT	22-68 días PtT	Tse et al, 2005 Arai et al, 2003
Recuperación plaquetaria	15-30 días	10-28 días	15-255 días	Cohen et al, 2004
Recuperación inmune	1-12 meses	1-12 meses	8-24 meses	Smith, 2004
Histocompatibilidad	Alta para asegurar injerto (6/6 ó 5/6)	Alta para asegurar injerto (6/6 ó 5/6)	Flexible: hasta 3/6 para asegurar injerto	Arai et al, 2003 Cohen et al, 2004 Hough et al 2004
Incidencia de EICH	Alta	Alta	Baja	Cohen et al, 2004
Tipo de EICH: Aguda (II-IV) Crónica	10-40% 13-54%	7-28% 40-100%	0-36% 4-25%	Arai et al, 2003 Cohen et al, 2004 Hough et al 2004
Pacientes	Pediátricos y adultos	Pediátricos y adultos	Pediátricos	Cohen et al, 2004
Número de células nucleadas introducidas por trasplante.	12-40 X 10 <sup>7</sup> /kg de peso corporal	9.5 X 10 <sup>8</sup> /kg de peso corporal	1-28X 10 <sup>7</sup> /kg de peso corporal	Arai et al, 2003
Número de células CD34+ introducidas por trasplante	6-23 X 10 <sup>5</sup> /kg de peso corporal	6-23 X 10 <sup>5</sup> /kg de peso corporal	1-3X 10 <sup>5</sup> /kg de peso corporal	Cohen et al, 2004
Volumen de la muestra o unidad para trasplante.	0.9-1 litros	Variable. Dependiente de los ciclos de aféresis.	0.05-0.15 litros (1 X 10 <sup>9</sup> CNT/unidad)	Chryslers et al, 2004

Abreviaturas CMN: células mononucleares; CMV: Citomegalovirus; VEB: Virus Epstein-Barr, PtT: Post-trasplante, CNT: Células nucleadas totales.

Con diferencias muy sutiles, los antígenos de superficie de las CTH/CPH de SCU, son virtualmente los mismos que se encuentran sobre su contraparte de MO adulta o SPM. Más que en cuestión de antígenos, las diferencias se encuentran en las proporciones del tipo celular que definen dichos antígenos. En la SCU se encuentra un alto porcentaje de células eritroides, tanto progenitores como precursoras, dado el ambiente hipoxico de la fuente, lo que también refleja el alto porcentaje de estas células circulantes con núcleo que se encuentran en SCU.

Como se observa en el cuadro 3, el éxito del trasplante de SCU definido por la sobrevida a más de 3 años, es superior con respecto a MO y SPM; sin embargo, también resalta el tiempo para alcanzar el injerto de neutrófilos y plaquetas, el cual es más prolongado en SCU, en comparación a las otras dos fuentes. Las diferencias hasta ahora encontradas en el éxito o fracaso de un trasplante de SCU con respecto a la MO y SPM se cree que depende de varios factores, entre los que sobresalen los siguientes:

1) Respuesta inmune y proporción de células linfoides. La mayoría de los estudios de las poblaciones linfoides de SCU coinciden en la existencia de un menor porcentaje de células CD3+, CD2+, CD4+, CD8+ y CD45RO+ (células de memoria) en la SCU con respecto a sangre adulta (Fallen y Cohen, 2000). Al comprobar producción de citocinas por las células T derivadas de ambas fuentes por efecto de un estímulo, existió una respuesta superior en células adultas en la producción de IFN $\gamma$ , IL-4, e IL-3 mientras que para IL-2 fueron discrepantes (sin diferencia o mayores en sangre adulta) (Fallen y Cohen, 2000). Estos datos indican la inmadurez de las células linfoides presentes en SCU que se refleja en la incidencia de EICH (tanto en tipo como en agresividad) en pacientes trasplantados con SCU en comparación con los que recibieron células de MO. Se sugiere entonces que las unidades trasplantadas de SCU provocan una tolerancia inmune, lo cual se observa con el injerto que ocurre aún en casos de una elevada diferencia de histocompatibilidad entre el donador y el huésped (con sólo 3 antígenos de los 6 necesarios). Para el caso de MO o SPM, la histocompatibilidad debe ser lo más parecida entre el donador y el huésped para garantizar un alto porcentaje de injerto (>50% de posibilidades con 5/6 y 6/6 antígenos). Así mismo, se ha observado que después de un trasplante con SCU hay una recuperación similar de la



respuesta inmune a la observada con trasplantes de MO o SPm (Smith, 2004). Una de las mayores controversias generadas por los trasplantes de SCU es acerca de una efectiva respuesta inmune contra leucemias (lvL, injerto contra leucemia). Sin embargo, una respuesta efectiva del lvL debe existir, pues de lo contrario no se explicaría las remisiones sostenidas después de un trasplante de SCU (Smith, 2004).

2) Número de células nucleadas en cada unidad. Aunque el porcentaje de CTH/CPH, definidas en base al antígeno CD34, es similar en las tres fuentes (SPm, MON y SCU), al considerarse el volumen de cada tipo de muestra, SCU resulta en desventaja con respecto a la contraparte adulta. El número de células en cada unidad al ser transplantadas repercute directamente en el tiempo de injerto. Los pacientes que recibieron bajas dosis de CTH/CPH en el trasplante tardaron más tiempo en alcanzar el nivel aceptable de neutrófilos y plaquetas. Parte del tratamiento del trasplante es la terapia inmunosupresora, para evitar el rechazo del injerto, por lo que al extenderse el tiempo de injerto de neutrófilos, plaquetas y generación de células de memoria con unidades de SCU, los pacientes están expuestos a infecciones o a hemorragias severas (Cohen y Nagler, 2003; Gluckman, 2000).

Las observaciones antes ilustradas han repercutido en la investigación sobre la biología de las CTH/CPH presentes en la SCU para tratar de contrarrestar los problemas que se observan a nivel clínico. Los primeros estudios desarrollados en estas células, demostraron que su capacidad de proliferación es superior con respecto a MO adulta (Lansdorp et al, 1993). Incluso se ha sugerido que debe existir una relación con respecto al tiempo de desarrollo en el que son obtenidas las CTH/CPH, ya que aquellas aisladas de sangre o hígado fetal son capaces de proliferar *in vitro* por arriba de las obtenidas de SCU (Gallacher et al, 2000; Li et al, 2004). Esto hace pensar en una posible expansión *in vitro* de las CTH/CPH de SCU. Las ventajas de incrementar estas células previo a un trasplante son varias, como pueden ser:

- Incremento de candidatos a un trasplante con SCU. Hasta ahora los trasplantes en esta área se han enfocado en pacientes pediátricos o adultos con un peso menor a 70 Kg precisamente pensando en la limitante del número de células por unidad de SCU. Así, las posibilidades de emplear SCU en pacientes adultos, después de expandir sería una alternativa.

- Modificación de las cinéticas de proliferación de las CPH para apresurar el injerto.
- Inducción a entrar a ciclo celular a las CTH para facilitar la transducción de genes, para la aplicación de terapias génicas.
- Producción modulada de poblaciones linfoides para reducir las probabilidades de generación de EICH y se incrementen las de lvsL.

Hasta ahora la principal desventaja de la expansión *in vitro* de las CTH/CPH de SCU es su diferenciación durante el cultivo. Esto sugiere que en los sistemas de cultivo faltan señales presentes en la MO las cuales permiten la autorenovación y diferenciación controlada, sin pérdida de la reserva de CTH *in vivo* (McNiece, 2004). Por ello, la investigación sobre SCU, para cubrir las expectativas antes mencionadas, se ha centrado en tres aspectos: i) expansión de la población de CTH/CPH en cada unidad; ii) diferenciación controlada de las CPH e impacto y balance entre reguladores positivos y negativos de la diferenciación y proliferación; y iii) cambios en los estatus del ciclo celular, potencial de "homing" y expresión de moléculas de adhesión en la superficie celular (Smith et al, 2004). El conocimiento generado de estas áreas de investigación se espera que repercuta de forma directa o indirecta en el incremento en el uso de unidades de SCU a nivel clínico, garantizando su efecto en los pacientes.

#### 1.8. Expansión *In vitro* de células troncales y progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical.

La mayor parte de los trabajos publicados sobre la expansión de células de SCU, se ha enfocado al uso de citocinas recombinantes para tal fin. También han sido probados otro tipo de estímulos mitogénicos como el plasma autólogo obtenido de cada unidad, plasma alogénico, o medio condicionado de cultivos de células hematopoyéticas y no hematopoyéticas de médula ósea (Butler et al, 2000). La combinación de citocinas y su concentración varía entre los grupos de trabajo. El análisis de la expansión se ha realizado con respecto a la generación de UFC, CICLP y CRS. En el cuadro 4 se muestran algunos resultados de la expansión de las CTH/CPH de SCU; para su elaboración se tomaron en cuenta algunos de los estudios más representativos sobre la expansión de las células hematopoyéticas de SCU.

Cuadro 4. Expansión de CPH provenientes de sangre de cordón umbilical. Abreviaturas al pie del cuadro.

Población Celular Inicial	Combinación de citocinas o Condición de cultivo	Células nucleadas Totales (IV)	CFC (IV)	Células CD34+ (IV)	Ensayos In vivo (ratones inmunosuprimidos)	Referencia
CD34+CD44RA <sup>lo</sup> CD71 <sup>lo</sup> Thy-1+	SCF+IL-6+FP+M-CSF+Epo.	NR	74.9	29, células CD34+Thy-1+	NR	Mayani et al, 1994
CD34+	FL+Tpo.	1X10 <sup>6</sup>	850	1600	NR	Piciabello et al, 1997
CD34+ AC133+	SCF+FL+IL-6+G-CSF+IL-3+ Epo+TGFβ+GM-CSF.	NR	NR	8, células CD34+AC133+	Injerto en ratones NOD/SCID	De Wynter, 1998
CD34+	SCF+FL +IL-3 Capa alimentadora de MON	35	NR	NR	NR	Köhler T, 1999
CD34+	SCF+FL+ Tpo+IL-6	348-587	55-80	NR	Injerto de células cultivadas por 7-8 semanas	Piacibello et al, 1999
CD34- Lin-	SCF+FL+Tpo+IL-3+G-CSF. Sobre línea celular de ratón.	400 ± 230	909± 272	65.5 ± 15.4	NR	Ando et al, 2000
CD34+CD38-Lin-	SCF+ FL +G-CSF+ IL-6	12.6	9.4	19.1	Bajo porcentaje de injerto después de 6 días en cultivo	Dorrel et al, 2000.
CD34+	SCF+FL+Tpo+G-CSF	800-1613	120 (UFC-GM)	40	Injerto de células cultivadas por 5-6 semanas.	Kobari et al, 2000
CD34+	Fl+Tpo	1385		89.9	NR	Gilmore et al, 2000
CD34+	SCF+FL+Tpo+IL-7	185±97	1.0±0.7	2.0±2.0	Injerto de células cultivadas por 14 días.	Lewis et al, 2001
CD34+	SCF+FL+Tpo+IL-7 Línea celular AFT024	76.1±11.2	1.8±0.3	15.8±10.1	Injerto de células cultivadas por 14 días.	Lewis et al, 2001

Continuación ..... Cuadro 4. Expansión de CPH provenientes de sangre de cordón umbilical.

Población Celular Inicial	Combinación de citocinas o Condición de cultivo	Células nucleadas Totales (IV)	CFC (IV)	Células CD34+ (IV)	Ensayos In vivo (ratones inmunosuprimidos)	Referencia
CD34+	SCF+FL +Tpo. Capa alimentadora de MON	224	140	89	Elevados porcentajes de injerto con células cultivadas 4 semanas	Yamaguchi et al, 2001
CD34+	SCF+FL+Tpo+IL-3	NR	18.1±2.4	20.9±5.4	Bajo porcentaje de injerto con células cultivadas por 7 días.	Rosmanith et al, 2001.
CD34+	SCF+FL+Tpo+IL-6+G-CSF+IL-3	622±258	21±11	28.2±15	Elevados porcentajes de injerto con células cultivadas 7 días	Denning-Kendall et al, 2002.
CMN	FL+Epo+FP	4.5-5.4	171-518	NR	Injerto en pacientes junto con células sin expandir.	Jaroscak et al, 2003.
CD34+ CD38-	SCF+FL+IL-6+IL-3+G-CSF+EPO. Sobre CMS humanas de MON.	4.6 ± 0.67	NR	3.75 ± 0.99	NR	Kadereit et al, 2002
CD34+	SCF+Fl+Tpo Sobre CMS derivadas de placenta humana.	105.92±16.55	36.73±5.79	14.89±2.32	NR	Zhang et al, 2004
Lin-	SCF+FL+Tpo	77.1±0.27	34±8	NR	NR	Forraz et al, 2004

Abreviaturas: IV: Incremento en veces con respecto a las células al inicio del cultivo; MON: Médula ósea normal; NR: No reportado; FP: Proteína fusionada, GM-CSF/IL-3; CTM: Células troncales mesenquimales;

Se han probado diversas estrategias para la expansión de las CTH/CPH: Se han empleado células estromales provenientes de MO normal, líneas celulares humanas o de ratón, células endoteliales provenientes de vena de cordón umbilical y placas con fibronectina o sulfato de heparan, para dar el estímulo aportado por las células adherentes presentes en la MO (Rafii et al, 1994; Gupta et al, 1996; Aiuti et al, 1998; Voermans et al, 2000). Recientemente también se ha probado para la expansión de las CTH un agente quelante de cobre (Peled et al, 2004). Otras variantes se encuentran en los biorreactores, donde en sistemas cerrados con agitación constante se ha logrado un incremento en el número total de células nucleadas y en el número de CPH recuperadas (Van Zant y Benchimol, 1994; Köhler et al, 1999; De León et al, 1999). Entre los distintos protocolos de expansión existen algunas coincidencias como en el uso de ciertas citocinas. Por ejemplo, FL, Tpo, ó SCF. Esto tiene que ver con las características de estas citocinas: FL y Tpo son los factores más importantes para la autorenovación de las CPH de SCU, mientras que SCF e IL-6 son más importantes en el proceso de proliferación y mantenimiento de las CPH (Robinson et al, 2005; Hao et al, 1998).

Sin embargo, de todos los modelos planteados hasta el momento, son pocos los que han demostrado su efectividad en transplantes clínicos. Hasta ahora, las células expandidas no se han introducido como únicas células repoblantes en pacientes, sino que sólo una parte de cada unidad de SCU se emplea en la expansión (frecuentemente 1/3 de la unidad), conservado el resto para introducirlo junto con las células obtenidas del cultivo. Así, los resultados finales de la expansión de CPH de SCU en pacientes no se sabe con certeza, pues su efecto puede estar encubierto por las CPH sin expandir introducidas a la par (Smith et al, 2004). Sin embargo, se ha podido evaluar que no existe efecto tóxico de las células expandidas introducidas en los pacientes, lo que estimula el desarrollo de estrategias de cultivo de las CTH/CPH de SCU.

Se deriva entonces que si bien los resultados de la expansión *in vitro* de CTH/CPH han sido heterogéneos, todos los trabajos demuestran una regulación temporal de la proliferación y autorenovación de estas células, la cual depende de diversos factores. Conocer todos estos factores y poder controlarlos es indispensable para el establecimiento de un sistema de cultivo *in vitro* efectivo para la expansión de las CTH/CPH de SCU.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El trasplante de SCU está acompañado de una elevada probabilidad de injerto y reconstitución de la hematopoyesis, a pesar de que cada unidad de SCU contiene sólo un décimo de las células nucleadas empleadas en un trasplante de médula ósea típico. Aunque el trasplante de células de SCU ha empezado a utilizarse para tratar enfermedades donde no se tenga donador de médula ósea, el tiempo prolongado de injerto representa un problema grave. El número de células CD34+ introducidas en un trasplante de SCU resulta clave cuando se observa la mortalidad relacionada al trasplante en el primer año de vida, la cual es de >68% en pacientes que recibieron bajas dosis de células CD34+ por kilo de peso. Es por ello, que los trasplantes de CPH provenientes de SCU se han restringido a pacientes pediátricos y a algunos individuos de talla pequeña (no más de 70 kg de peso) dada la proporción de células CD34+ que serían introducidas (Broxmeyer, 2004).

Aunque se han desarrollado diversas estrategias para la expansión de las CTH/CPH de SCU *in vitro* con el fin de emplearlas en trasplantes de adultos, y/o reducir el tiempo que tarda en injertar cada unidad, aun persisten varias interrogantes sobre cuales son las condiciones más apropiadas de cultivo. Entre ellas se incluye la concentración y tipo de citocinas empleadas, la presencia o no de una capa estromal alimentadora, o el tipo de población con la cual se debe iniciar el cultivo de expansión. En este último caso, aún existe discrepancia sobre si la expansión con fines clínicos debe realizarse con células mononucleares obtenidas por un gradiente de densidad, con una población purificada en base al antígeno CD34, y/o seleccionada en base a otros marcadores.

Los cultivos de expansión basados únicamente en células mononucleares, aunque presentan la ventaja de poca manipulación de las muestras y han demostrado que éstas células son capaces de mantenerse *in vitro*, el incremento que se obtiene de ellas es bajo ( $\leq 10$  veces en células nucleadas totales,  $\leq 4$  veces en células CD34+ y  $\leq 5$  veces para UFC) (Lin et al, 2001; Zhang et al, 2005). Es por ello que gran parte de las estrategias de expansión de las CPH de SCU se han basado en la purificación de células que presentan el antígeno CD34.



Sin embargo, la purificación de la población celular CD34+ se realiza con un anticuerpo monoclonal que no es separado del epitopo que reconoce en esta molécula, y se desconoce si esto puede afectar en la interacción de las CPH con el microambiente de la médula ósea del huésped donde residirán. Además, varios de los trabajos de expansión *in vitro* inician con una población con más del 98% de pureza con respecto al antígeno CD34, pero que no lo son con respecto a otros antígenos de linaje, pueden estar coexpresándose. Para la clínica esto implica una desventaja pues se pone en consideración el tipo de células que se estarían transplantando. Por lo tanto el proceso de selección positiva (es decir con respecto al antígeno CD34) se tendría que realizar en dos pasos: primero eliminar a las células positivas de linaje en la población total de células nucleadas y después separar a aquellas positivas al antígeno CD34. Esto implicaría un alto costo en tiempo y equipo, ya que la manera más eficiente hasta ahora para realizarlo es mediante citometría de flujo.

Por otra parte, al purificar o seleccionar a las CTH/CPH con respecto a la presencia del antígeno CD34 en superficie, se estaría dejando de lado a las recientemente caracterizadas células CD34-. Si bien aún existe controversia sobre si la verdadera célula troncal hematopoyética expresa o no CD34 en su superficie, se deben buscar estrategias para expandir a las CTH *in vitro*, que no discriminen a ninguna de las dos poblaciones, sin comprometer su proliferación, expansión, diferenciación y potencial de injerto a largo plazo.

En el presente protocolo se planteó el cultivo *in vitro* de CPH obtenidas de sangre de cordón umbilical mediante la utilización de columnas de separación, donde no se acoplan anticuerpos al antígeno CD34, sino sobre células ya diferenciadas (selección negativa). Así, se eliminaría en un solo paso a las células de linaje y se enriquecería a la población CD34, sin perder a las células que en el momento de realizar la selección no presenten este antígeno (células CD34-). Sin embargo, hasta ahora se conoce muy poco sobre esta población, quedando varias interrogantes por resolver, como puede ser si al eliminar células CD34+Lin+ se compromete la tasa de proliferación y expansión, documentadas por otros grupos de investigación, donde estudian a poblaciones purificadas en base a CD34+; también se desconoce si las células obtenidas por una selección negativa serán capaces de generar los diferentes linajes que se pueden obtener con células CD34+ purificadas.

Parte de la controversia sobre la expansión *in vitro* de las CPH de SCU, es si debe emplearse únicamente citocinas exógenas para cultivar a las células o si el uso de una capa estromal alimentadora debe formar parte de los sistemas de cultivo de estas células. Por ello, planteamos la utilización de células troncales mesenquimales de médula ósea para cocultivar las poblaciones de CPH de SCU obtenidas por selección negativa, analizando su respuesta en comparación con cultivos mantenidos únicamente con citocinas exógenas. Aunque la información con que se cuenta sobre la biología de las células troncales mesenquimales (CTM) aún es incompleta, existen reportes que indican que estas células son capaces de generar diferentes factores hematopoyéticos (Haynesworth et al, 1996). Así mismo, aunque se sabe que los componentes estromales no hematopoyéticos de médula ósea se derivan de las CTM, la función de cada uno de ellos sobre el mantenimiento, autorenovación, expansión y diferenciación de las CTH y CPH no se conoce. Al separar a las CTM del resto de los componentes estromales de médula ósea, se pretendió observar el impacto directo sobre las poblaciones obtenidas de SCU en diversas respuestas funcionales *in vitro*, lo que permitiría conocer más sobre la biología de estas células, así como plantear el empleo de CTM en protocolos de expansión de células de SCU.

En la última parte del trabajo, se planteó la eliminación de las células que fueran adquiriendo ciertos marcadores de linaje durante el cultivo, observando de manera indirecta el efecto sobre las células que permanecían siendo células Lin<sup>-</sup>. Esta estrategia permitió observar si existió o no producción de células Lin<sup>-</sup> en nuestro sistema de cultivo.

Si bien los diferentes objetivos planteados en el presente trabajo, fueron realizados para incrementar el conocimiento básico sobre la plasticidad de respuesta de las CTH y CPH de SCU a diferentes estímulos exógenos, también se pretendió sentar las bases para una posible aplicación de la información generada sobre la diferenciación y expansión de las CPH de SCU *in vitro* en la terapia contra las enfermedades hematológicas y oncológicas.



### III. HIPOTESIS

Poblaciones celulares Lin- de sangre de cordón umbilical, obtenidas por una selección negativa, serán capaces de responder al efecto estimulador de elementos del microambiente (citocinas y células troncales mesenquimales) de manera semejante o superior a la observada en trabajos publicados por otros grupos donde emplean poblaciones de células CD34+ obtenidas por una selección positiva, lo que las haría candidatas para estudios preclínicos y a su aplicación en terapias de reconstitución del sistema hematopoyético. Asimismo, existirá diferencias en la respuesta funcional (proliferación, expansión y diferenciación) entre las poblaciones celulares Lin- (poblaciones enriquecidas en células CD34+ o en células CD34+CD38-), dependiendo de su inmadurez hematopoyética.

#### IV. OBJETIVOS

##### GENERAL:

- Caracterizar el comportamiento *in vitro* (proliferación, expansión y diferenciación) de dos poblaciones celulares linaje negativas enriquecidas en CTH/CPH (CD34+Lin- y CD34+CD38-Lin-) de SCU, obtenidas por selección negativa, bajo el estímulo de distintas condiciones de cultivo, incluyendo combinaciones de citocinas inferiores a las reportadas por otros grupos, así como en presencia o ausencia de células accesorias Lin+ y células troncales mesenquimales de médula ósea normal.

##### PARTICULARES:

- Obtención de dos poblaciones celulares mediante la eliminación de células Lin+ de sangre de cordón umbilical, enriquecidas en células CD34+Lin- y células CD34+CD38-Lin-.
- Cultivar las poblaciones celulares obtenidas por selección negativa en presencia o ausencia de diferentes combinaciones de los factores recombinantes SCF, IL-6, IL-3, Tpo, Flt-3, G-CSF, GM-CSF y EPO, para determinar la combinación adecuada que favorezca proliferación y expansión. La expansión será determinada inmunofenotípica (incremento en el número de células CD34+) y funcionalmente (incremento en el número de UFC).
- Analizar el comportamiento de las poblaciones celulares obtenidas por selección negativa en presencia o ausencia de células troncales mesenquimales de médula ósea normal y en presencia y/o ausencia de citocinas recombinantes.
- Analizar el efecto de la eliminación consecutiva de las células Lin+, obtenidas al cultivar células Lin-, sobre la proliferación, expansión, y diferenciación de las CPH de SCU contenidas en la población seleccionada tanto al inicio como durante el cultivo.

## V. MATERIALES Y METODOS

### 5.1. Obtención del material biológico.

Se colectaron muestras de SCU de nacimientos normales a término, tanto de cesáreas como de partos, de acuerdo con las normas institucionales del Hospital de Zona Troncoso (IMSS, México, D.F.) Las técnicas de obtención de las muestras fueron aprobadas por el Comité de Ética del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Una vez liberada la placenta, tanto de cesárea como de parto, la sangre que contenía fue colectada. Se utilizaron dos métodos de obtención de la sangre: mediante goteo, donde se dejó que la sangre fluyera por gravedad a un tubo estéril de 50 ml; en otros casos, se extrajo la sangre con ayuda de una jeringa de 20 ml con una aguja de 21G, pinchando en la vena umbilical. En ambos casos, tanto la jeringa como el tubo contenían heparina (500  $\mu$ l de heparina a una concentración de 10 000 unidades) como anticoagulante. Las muestras fueron transportadas al laboratorio donde se procesaron como se describe posteriormente, en las 4 horas siguientes de su obtención. Cada muestra fue procesada, cultivada y evaluada por separado. No se encontró relación entre los métodos de obtención de la SCU con respecto a su contenido de células nucleadas y CPH.

### 5.2. Procesamiento de muestras y obtención de células mononucleares de sangre de cordón umbilical.

Las muestras de SCU fueron procesadas en condiciones estériles en una campana de flujo laminar, lo mismo que los subsecuentes cambios de medio. El concentrado leucocitario se obtuvo de cada muestra por centrifugación (1200 revoluciones por minuto (rpm) por 7 minutos). El contenido de células nucleadas fue evaluado con diluyente de Turk el cual contiene ácido acético que rompe las membranas celulares. Las células mononucleares (CMN) se aislaron por un gradiente de densidad usando Ficoll-Paque® Plus (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suiza). Una vez obtenida la banda de células mononucleares, se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés, con un pH de 7.2), centrifugando a 1200 rpm por 7 minutos. El botón celular fue resuspendido en medio Dulbecco modificado por

Iscove (IMDM) suplementado con 2% de suero fetal de bovino (SFB, Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver, Canadá). El número total de CMN y viabilidad fueron determinados por exclusión con azul de tripán en un hemocitómetro. En caso de que la muestra trabajada aún contuviera eritrocitos, el número de CMN se evaluó con diluyente de Turk.

### 5.3. Obtención de la Población I.

A partir de CMN se realizó por una selección negativa, utilizando el sistema StemSep™ (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver, Canadá), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, un mínimo de  $20 \times 10^6$  y un máximo de  $110 \times 10^6$  de CMN de cada muestra se incubó con un cóctel de anticuerpos seguida de una segunda incubación con un coloide magnético (15 minutos a temperatura ambiente para cada incubación) en un volumen máximo de 1 ml con IMDM conl 2% de SFB. El cóctel de anticuerpos incluía a aquellos dirigidos contra las siguientes moléculas de superficie celular: CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b y glicoforina A. Después de la segunda incubación, la suspensión celular fue colocada en una columna magnetizada, a la que previamente se balanceo pasando 8 ml PBS con 10% de SFB. Una vez puesta la muestra en la columna, se lavó con PBS con 10% de SFB hasta obtener volumen total de 10 ml de eluido. Las células se colectaron en un tubo de plástico que contenía IMDM con 2% de SFB, se centrifugaron por 10 minutos a 1200 rpm, se resuspendieron en medio de cultivo y se evaluó la viabilidad celular con azul de tripán y el número celular con diluyente de Turk. Posteriormente, se realizó del contenido de células positivas a linaje y células CD34+ (apartado 5.5), y se procedió a su cultivo (5.6) y evaluación de capacidad de formación de colonias (5.7).

### 5.4. Obtención de la Población II.

Se utilizó el mismo procedimiento de obtención descrito para la Población I con algunas variantes. El número mínimo de células para cada muestra fue de  $60 \times 10^6$  y el cóctel de anticuerpos contenía además de los mencionados en el cóctel para la obtención de la Población I, anticuerpos monoclonales dirigidos contra la molécula CD38, CD45RA y CD36. El resto del procedimiento fue el mismo.

## 5.5. Inmunofenotipo de las células de sangre de cordón umbilical.

### 5.5.1. Cuantificación de las células CD34+ en las poblaciones enriquecidas.

En preparaciones en portaobjetos con células recién obtenidas de la selección negativa, así como laminillas con células cultivadas, se identificó el número de células CD34 mediante inmunocitoquímica. Laminillas tanto de CMN, como de ambas Poblaciones enriquecidas (40 X 10<sup>3</sup> células por preparación) se resuspendieron en 30 µl de PBS con 2% de SFB y se colocaron en un filtro de citocentrifuga para laminillas (Becton Dickinson, USA). Las células se centrifugaron por 5 minutos a 1200 rpm; pasado este tiempo, las laminillas conteniendo las células se dejaron secar por un mínimo de 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las preparaciones se fijaron en acetona fría por 20 minutos a temperatura ambiente. Las laminillas se guardaron a -20°C hasta ser analizadas. Para ello se utilizó un paquete comercial (DAKO EnVision+ System, Peroxidasa-Diaminobencidina, DAKO, Copenhague, Dinamarca), y un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno CD34, desarrollado en ratón. Brevemente, las laminillas se sacaron de -20°C y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las laminillas se lavaron tres veces con PBS y cada una de ellas se incubó por 10 minutos con PBS con 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las laminillas se lavaron tres veces con PBS y se incubaron por 30 minutos con 100 µl de anticuerpo contra CD34 desarrollado en ratón (DAKO, Dinamarca) en una relación 1:75 en PBS con 10% de SFB. Pasado el tiempo de incubación, las laminillas se lavaron y se añadió una solución conteniendo un segundo anticuerpo marcado con biotina, que reconoce la fracción Fc de anticuerpos desarrollados en ratón. Se incubó por 30 minutos y se lavó tres veces. Las laminillas se incubaron 30 minutos más con la solución de revelado, la cual contenía un polímero conjugado con estreptavidina para el reconocimiento de la biotina del anticuerpo secundario, y con peroxidasa. Después del tiempo de incubación, las laminillas se lavaron tres veces con PBS y se incubaron por 10 minutos con diaminobenzidina, la cual reaccionó con la peroxidasa para dar un precipitado color café, en las células positivas. Las laminillas se lavaron, se contra tiñeron con hematoxilina y



se montaron para ser valoradas. De cada laminilla se contaron 300 células, para calcular el porcentaje de células positivas y negativas de cada muestra.

#### 5.5.2. Análisis inmunofenotípico por citometría de flujo.

Tanto en células mononucleares como en la Población I y II, se analizó la expresión de antígenos de superficie, con la finalidad de definir a dichas poblaciones. Aproximadamente 200,000 células se incubaron por 15 minutos con 5  $\mu$ l de anticuerpo conjugado con ficoeritrina (PE) o fluoresceína (FITC). Los anticuerpos fueron dirigidos contra las siguientes moléculas de superficie: CD3 (FITC), glicoforina A (Gly A, FITC), CD34 (FITC), CD14 (PE), CD19 (PE), y CD38 (PE); se utilizaron los controles de isotipo (Caltag, USA) tanto con marca con FITC como con PE, así como células sin marcar (autofluorescencia). Pasado el tiempo de incubación, las células se lavaron y se fijaron con la solución comercial de Beckton Dickinson (BD, San Diego, USA), para ser leídas en un citómetro de flujo (Coulter Altra); se registraron un mínimo de 10,000 eventos por ensayo. Los anticuerpos contra CD3, CD34, CD38 y Gly fueron obtenidos de la casa comercial Caltag (Burlingame, USA), mientras que los dirigidos contra CD14 y CD19 fueron desarrollados por Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, USA)

#### 5.6. Cultivos en suspensión:

Células mononucleares o aquellas obtenidas de la selección negativa se sembraron en diferentes condiciones, dependiendo del bloque de ensayos a realizar, los cuales se describen a continuación:

##### 5.6.1. Cultivos en presencia de suero: Células mononucleares y Población I.

Células obtenidas de la separación por Ficoll o bien la Población I, se cultivaron en placas de 24 pozos (Corning) a una densidad de 100, 000 células/ml y  $\text{cm}^2$  de superficie. Las células se sembraron en medio de cultivo IMDM, conteniendo 12.5% de suero fetal de bovino (SFB) y 12.5% de suero de caballo (SC) distribuido comercialmente (Long-term culture medium, LTCM, StemCell Technologies, Inc). Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: A) control: no se adicionaron citocinas recombinantes; B) Básico: se añadieron, factor de células troncales (SCF, 10 ng/ml) e interleucina 6 (IL-6, 10 ng/ml); C)

Mieloide: SCF, IL-6, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, 20 ng/ml) y factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF, 10 ng/ml); D) Eritroide: SCF, IL-6, interleucina 3 (IL-3, 10 ng/ml) y eritropoyetina (Epo, 3 UI/ml); E) Mixto I: Todas las citocinas mencionadas a las concentraciones señaladas: SCF, IL-6, IL-3, Epo, GM-CSF y G-CSF. SF, IL-6, IL-3 y G-CSF se obtuvieron de StemCell Technologies, Inc, GM-CSF (Molgramostim) de Novartis/Schering-Plough, México y Epo de Eprex, Johnson & Johnson, EUA. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y se realizaron cambios de medio total cada 5 días. Para ello, las células se obtuvieron de cada pozo en tubos eppendorf de 1.5 ml, se centrifugaron a 1500 rpm por 7 minutos; el sobrenadante se desechó y el botón celular se resuspendió en medio de cultivo (LTCM). La viabilidad celular fue evaluada por tinción con azul de tripán, mientras que el contenido de células nucleadas totales se realizó por exclusión con diluyente de Turk. De cada pozo de cultivo se sembraron 5-10 X 10<sup>4</sup> células nucleadas en las mismas condiciones. La expansión celular se evaluó por medio de ensayos de formación de colonias (Sección 5.7), en los mismos días que se realizaron los cambios de medio, así como por la expresión del antígeno CD34 (Sección 5.5). La diferenciación de las células se evaluó por análisis morfológico (Sección 5.8)

#### 5.6.2. Cultivos en medio libre de suero: Población I

Un número conocido (100,000 /ml) de células obtenidas de la selección negativa (Sección 5.3), se cultivaron en medio libre de suero (StemSpan™ SFEM, StemCell Technologies, Inc), el cual contenía, como sustituto de suero, albúmina sérica bovina (1%), insulina recombinante humana (10 µg/ml) y transferrina humana (200 µg/ml). Al medio se le adicionaron las siguientes combinaciones de citocinas hematopoyéticas recombinantes: A) Control: ausencia de citocinas; B) Seminal: SCF, IL-6, trombopoyetina (Tpo, 10 ng/ml) y ligando de Flt-3/flk-2 (FL, 10 ng/ml); C) Mixto II: Las citocinas de la combinación seminal más IL-3, G-CSF, GM-CSF y Epo. La concentración de las citocinas fue la misma que la mencionada previamente (Sección 6.6.1) Las células se cultivaron en placas de 24 pozos, a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Al igual que en los otros cultivos de estandarización, los cambios de medio se

realizaron cada 5 días, evaluando la expansión y diferenciación por los parámetros ya indicados.

#### 5.6.3. Cultivos en medio libre de suero: Población II.

Para la población II, el número inicial varió dependiendo de la cantidad obtenida en cada selección negativa (Sección 5.4). Las células se sembraron en las mismas condiciones que las establecidas para la población I (Sección 5.6.2). Los cambios de medio se realizaron cada 7 días, evaluando en cada uno de ellos, la expansión celular por ensayos de formación de colonias (Sección 5.7) y la expresión del antígeno CD34 en superficie celular (Sección 5.5), además de análisis morfológico (Sección 5.8). De cada pozo de cultivo se resembraron  $5-10 \times 10^4$  células nucleadas en las mismas condiciones del inicio del cultivo.

5.6.4. Reselección negativa: Remoción continua de poblaciones maduras (Lin+) generadas en los cultivos.

Células obtenidas por selección negativa, tanto Población I (Sección 5.3) como para la Población II (sección 5.4), se sembraron por separado en medio libre de suero, a una concentración de 100,000 células/ml, en placas de 6 pozos. Las células se cultivaron en presencia del cóctel Mixto II (Sección 5.6.2), con la variante de la eliminación de Epo. Al día 7 de cultivo, la totalidad de las células fueron recuperadas de las placas de cultivo, contadas y pasadas nuevamente por una columna de selección negativa. La nueva población obtenida, se sembró en condiciones similares a las del inicio del cultivo. Esta población se recuperó al día 14 de cultivo y nuevamente fue seleccionada, cultivando la población obtenida, la cual volvió a sembrarse en las mismas condiciones. Este proceso se repitió en el día 21 y 28 de cultivo. Tanto a las células obtenidas de la selección del día cero como a las obtenidas de selecciones secundarias fueron evaluadas en cuanto a la proliferación, expansión y diferenciación.

#### 5.6.5. Cultivos Quiméricos.

Células de ambas poblaciones fueron cultivadas por separado, en presencia o ausencia de células troncales mesenquimales (CTM) derivadas de

médula ósea normal. Las células de médula ósea fueron obtenidas de donadores sanos, a partir de protocolos de donación a pacientes relacionados con algún padecimiento hematológico. Las muestras fueron obtenidas según estándares médicos establecidos y calificados en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS). Las CTM se obtuvieron por el método descrito por Flores-Figueroa (2006), siguiendo las instrucciones de un paquete comercial para enriquecimiento de estas células (RosseteSep™, Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver, Canadá). Brevemente, el concentrado leucocitario de las muestras de médula ósea se obtuvo de la misma manera descrita para las muestras de SCU (Sección 5.2) Por cada ml de concentrado leucocitario se agregaron 50  $\mu$ l del cóctel de anticuerpos incluido en el paquete comercial. Los anticuerpos estaban dirigidos contra los siguientes marcadores de superficie: glicoforina A, CD3, CD14, CD19, CD38, CD66b. La suspensión celular se mezcló homogéneamente y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, la suspensión celular se diluyó 2 veces (v/v) con PBS con 2% de SFB y 1 mM de EDTA y se colocaron sobre una capa de Ficoll-Paque® Plus (5 ml de Ficoll por cada 3 ml de la muestra diluída). Las células se centrifugaron por 25 minutos a 300 g (1340 rpm).

Una vez separadas las células, se recuperó la banda de la interfase (células enriquecidas) y se lavaron con PBS con 2% de SFB y 1mM de EDTA. El botón celular se resuspendió en medio de cultivo MesenCult con 10% de SFB; ambos productos comerciales son específicos para favorecer el crecimiento de células mesenquimales (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver, Canadá). Las células se contaron con azul de tripán y se sembraron en cajas tipo Falcon de 25cm<sup>2</sup>, a una densidad de 10,000/ml en medio MesenCult al 10% de SFB. Se realizaron cambios de medio semanales hasta que se alcanzó una confluencia de 80-90%, entre 3 a 4 semanas. Para recuperar las células de las cajas de cultivo, se retiró el medio de cultivo, y las células adherentes se lavaron con PBS; se les añadió tripsina con 0.05% (Gibco, Carlsbad, USA) y se incubaron por 5 minutos a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, las células se lavaron con PBS con 10% de SFB y se centrifugaron a 1200 rpm por 8 minutos. El botón celular se resuspendió en LTCM y se resembraron a una densidad de 100,000 células por caja tipo

Falcon de 25 cm<sup>2</sup>. Células de la 2<sup>a</sup>-3<sup>a</sup> resiembra fueron las que se utilizaron en los cultivos quiméricos.

Las CTM se sembraron en placas de 6 pozos a una densidad de 50,000 células por pozo en medio MesenCult con 10% de SFB. Cuando alcanzaron una confluencia entre 70-80%, se les realizó cambio de medio y se añadió mitomicina C a una concentración de 0.2 µg/ml, la cual detuvo la proliferación celular. Pasadas 12 horas de incubación, las células se lavaron tres veces con PBS, añadiéndose medio fresco (medio libre de suero); después de algunas horas, se incorporaron las células hematopoyéticas de SCU, en presencia o ausencia de citocinas. Las poblaciones celulares se sembraron a una densidad de 10,000 células/pozo, en presencia o ausencia de CTM y permitiendo el contacto con el estroma o sin permitirlo. Para esta última condición, en donde se impidió el contacto con las células troncales mesenquimales se utilizó una membrana de nitrocelulosa de 4 µm (Falcon, BD), la cual permitía el paso de las proteínas pero no el de las células. Las combinaciones de citocinas fueron: Control, Seminal y Mixto II, descritas previamente. Los cambios de medio se realizaron cada 7 días; las células en suspensión se recuperaron resuspendiendo suavemente y se tomó a mitad del medio de cada pozo, sustituyéndolo por medio fresco con la misma combinación de citocinas en la que se encontraban las células, al doble de la concentración inicial. Las células contenidas en el medio obtenido de cada pozo se contaron y se utilizaron para realizar ensayos de formación de colonias, inmunocitoquímica contra el antígeno CD34 y análisis morfológico.

#### 5.7. Ensayos de formación de colonias hematopoyéticas.

Para conocer la cantidad de células hematopoyéticas capaces de formar colonias in vitro (UFC, unidades formadoras de colonias) presentes en las poblaciones trabajadas, se realizaron cultivos semi-sólidos sobre metilcelulosa (StemCell Technologies, Inc.). El medio de cultivo consistió de metilcelulosa con 0.9%, 30% de SFB, 1% de albúmina sérica bovina, 2-mercaptoetanol 10<sup>-4</sup> mM, 2 mM de L-glutamina, 50 ng/ml de SCF, 10 ng/ml de IL-3, 10 ng/ml de GM-CSF, y 3 UI/ml de Epo. 1 X 10<sup>3</sup> células obtenidas al día cero de la selección negativa para la Población I y 3 X 10<sup>3</sup> para la Población II se sembraron en 1.5 ml del medio previamente descrito. La concentración de

células sembradas en los siguientes días varió conforme se incrementaba el tiempo de cultivo y dependiendo del número de células recuperado de los mismos. Después de 14 días de cultivo, las colonias formadas se contaron con ayuda de un microscopio invertido. Las colonias hematopoyéticas se clasificaron como sigue: UFC-MIX, colonias conteniendo tanto células mieloides como eritroides; UFC-E tardías, grupos de células eritroides de 20-50 células con hemoglobina y grupos de células eritroides de >50 células con hemoglobina agrupadas en uno o varios grupos (UFC-E tempranas). Las colonias mieloides comprendieron subpoblaciones identificables de colonias puras de granulocitos (UFC-G), colonias puras de monocitos (UFC-M), y colonias conteniendo ambas poblaciones, monocitos y granulocitos (UFC-GM).

#### 5.8. Análisis morfológico.

Células obtenidas después de la selección negativa así como aquellas obtenidas de los cultivos líquidos se examinaron en preparaciones sobre laminillas teñidas con el colorante Wright-Giemsa (Sigma Diagnostics, EUA). Se contaron 300 células por laminilla.

#### 5.9. Estadística

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa computacional SPSS (versión 9.0.0, SPSS Inc., 1989-1999), para determinar si existía diferencia significativa entre ellos. Se empleó la prueba de t y un análisis de varianza multivariada. La significancia estadística fue asumida cuando los valores de P fueron inferiores a 0.05. Para el análisis estadístico se utilizaron las medias obtenidas de cada grupo de datos. Las comparaciones se realizaron con respecto al número de células o UFC obtenidas, si bien los resultados se presentan en incremento en veces relativo al número de células, UFC, o células positivas en inmunocitoquímica, con el que se inicio el cultivo.



## VI. RESULTADOS Y DISCUSION:

### 6.1 Cultivo de las poblaciones celulares en presencia de suero.

Los resultados de la presente tesis se obtuvieron de 53 muestras de sangre de cordón umbilical trabajadas por separado. En el cuadro 5 se muestran los datos generales de las muestras trabajadas, incluyéndose tanto el número de muestras obtenidas de cesáreas como las de parto vaginal; de las 53 muestras, en 8 de ellas no se registró cual fue su origen (parto o cesárea). Se obtuvo un promedio de 403 millones de células nucleadas por muestra, de las cuales el promedio de células mononucleares fue de 125.73 millones por muestra.

Cuadro 5. Datos de las muestras de sangre de cordón umbilical trabajadas

Volumen de muestra (mililitros)	37.03 ± 18.51
Número células nucleadas en cada muestra (x 10 <sup>6</sup> ) (número de células nucleadas por ml de muestra)	403.69 ± 247.44 (11.05 ± 5.10)
CMN obtenidas en cada muestra (x 10 <sup>6</sup> ) (número de CMN por ml de muestra)	125.73 ± 79.46 (3.47 ± 1.84)
Número de muestras por cesárea	21
Número de muestras obtenidas por parto normal	24
Porcentaje de viabilidad de las muestras	96.8 ± 7.86

Los resultados se muestran en promedio ± desviación estándar del total de las muestras trabajadas (n=53).

#### 6.1.1 Células mononucleares.

Se obtuvieron las células mononucleares (CMN) de 9 muestras de sangre de cordón umbilical. Al inicio del cultivo, las CMN presentaron un porcentaje de formación de colonias totales de 0.21 (± 0.10) por cada 100, 000 células cultivadas y 1.55% (± 0.88) de células CD34+, estas últimas evaluadas por inmunocitoquímica. Las características morfológicas e inmunofenotípicas de las CMN se muestran en el cuadro 9. Las CMN se cultivaron en presencia de las combinaciones de citocinas descritas en materiales y métodos, en medio con suero. La cinética de proliferación de las CMN en estas condiciones de cultivo se presenta en la gráfica 1.

En ausencia de citocinas, así como en presencia de la combinación denominada Básica (SCF + IL-6), las CMN de SCU fueron incapaces de proliferar, sin que se encontrara diferencia significativa entre ambas cinéticas a lo largo del cultivo ( $p=0.11$ ), si bien hubo un ligero incremento en el número de células recuperadas en la combinación básica. Para los otros tres cócteles (Mieloide, Eritroide y Mixto I), las CMN de SCU proliferaron rápidamente: desde los primeros 10 días en las combinaciones Eritroide y Mixto I, aunque la combinación Mieloide alcanzó rangos similares después de 20 días en cultivo.

En cuanto a la generación de progenitores, se encontró una expansión pobre e inconsistente, de 1 vez para colonias totales al día 10 de cultivo y de poco más de 2 veces para progenitores mieloides al mismo día (Cuadro 6 y Gráfica 2) para las condiciones Mieloide, Eritroide y Mixto I; existió una diferencia significativa en las condiciones Eritroide y Mixto I al contrastar contra el control (ausencia de citocinas). Con respecto a la expansión de células positivas al antígeno CD34, no existió, sino más bien una pérdida en todas las condiciones de cultivo, aunque se observó una tendencia a incrementarse el número de células CD34+ al día 10 de cultivo en los cócteles Mieloide, Eritroide y Mixto I (Cuadro 7).

Por otra parte, se observó que el tipo de citocinas tuvo efecto sobre los linajes desarrollados en el cultivo (Cuadro 8). Así, en presencia del cóctel Eritroide se favoreció la generación de este tipo de células, principalmente, durante los primeros días de cultivo. En el cóctel Mieloide, desde el día 5 hubo un predominio de células de tipo mieloides (mieloblastos y células en banda principalmente), lo cual se acentuó en los siguientes días (más del 57% para el día 10 de cultivo). En el cóctel Básico, en los primeros 5 días hubo presencia tanto de células eritroides como mieloides, aunque después de este tiempo, el linaje dominante fue el mieloides. Este comportamiento se observó también en el cóctel Mixto I, aunque la pérdida de células eritroides no fue tan acelerada, encontrándose un alto porcentaje (40%) después de 10 días en cultivo, semejante a lo visto en el cóctel Eritroide. Después del día 15 de cultivo, en todas las condiciones, el tipo celular que se observó fue de células de linaje mielo-monocítico.

### 6.1.2. Población I.

Para obtener a la Población celular I, se empleó el sistema de enriquecimiento negativo comercial StemSep™, como se describe en materiales y métodos.

La recuperación celular post columna fue de 2.69 % ( $\pm$  1.77%) del total de las células empleadas para su obtención (n=9). El enriquecimiento en la Población I con respecto a las CMN pre-columna, se analizó funcionalmente (formación de colonias) y en el porcentaje de células CD34+ presentes en ambas poblaciones, así como por morfología. Se obtuvo un promedio de formación de colonias previo a la columna de 0.34% ( $\pm$  0.34%) contra 9.08% ( $\pm$  2.96%) posterior a la misma, lo que indica un enriquecimiento de  $31.01 \pm 17.29$  veces en UFC. En base a la presencia del antígeno CD34 en la superficie celular, se paso de 1.72% ( $\pm$  0.59%) en CMN a 41.6% ( $\pm$  11.15%), con un enriquecimiento de  $26.93 \pm 9.72$  veces. Así mismo, se incrementó 8.6 veces el número de células con morfología linfoblastoide con respecto a las CMN. Sin embargo, en este último aspecto hay que considerar que en CMN la morfología de células linfoblastoides incluye también a linfocitos, por lo que el enriquecimiento puede haber sido subevaluado.

Para comprobar la disminución de células Lin+ en la Población I, se analizó la expresión de moléculas específicas de linaje sobre células obtenidas de la columna de selección por citometría de flujo. En el cuadro 9 se muestran las características inmunofenotípicas y morfológicas de la Población I comparándolas con las CMN.

La población I se cultivó en presencia de las cinco condiciones descritas para las CMN, y la cinética de proliferación se muestra en la Gráfica 3. Si bien se encontraron células vivas en ausencia de citocinas (control), no se incrementó la población y el cultivo se agotó después de 20 días. En presencia de la combinación Básica hubo un mantenimiento en el número de células por 25 días, lo que fue significativamente diferente con respecto al control ( $p < 0.05$ ). En las otras tres combinaciones de citocinas, hubo una proliferación sostenida a lo largo del cultivo dependiente del cóctel añadido. Las células en presencia del cóctel Eritroide y Mixto I proliferaron rápidamente, alcanzando su pico máximo desde el día 10 mientras en el cóctel Mieloide, las células tuvieron su pico máximo de proliferación después del día 14 de cultivo, de manera

semejante a lo observado en el cultivo de CMN. En el cóctel Mixto I, se observó el traslape de los cócteles Mieloide y Eritroide: el primer pico de proliferación, suficiente para alcanzar la meseta en estas condiciones, fue probablemente debido y mantenido durante los primeros 15 días por las citocinas contenidas en el cóctel Eritroide; posteriormente, la meseta podría mantenerse por las citocinas del cóctel Mieloide.

El número de células progenitoras, sin embargo, no se incrementó a los mismos niveles que la proliferación (Cuadro 10). Existió una mínima expansión de las CPH en la Población I en los cócteles Mieloide, Eritroide y Mixto I, tanto al día 5 como al día 10 de cultivo. Esta expansión no fue observada para un único tipo de progenitor, sino que al día 5 fue debida a UFC-Eritroides y al día 10 por UFC-Mieloides (Gráfica 4). La expansión también fue dependiente del cóctel de citocinas utilizado: Para las UFC-Eritroides, el cóctel que favoreció su expansión fue el que contenía Epo e IL-3 (cóctel Eritroide y Mixto I), mientras que todos los cócteles con citocinas fueron capaces de generar expansión de progenitores mieloides durante los primeros 10 días de cultivo. Para el control y cóctel Básico, no se encontró una expansión significativa más que en el cóctel básico al comparar con el control, en progenitores mieloides y en los primeros 10 días de cultivo.

Al analizar la expansión con respecto al antígeno CD34, hubo una pérdida en porcentaje de células que lo presentaban, pero al haberse incrementado el número de células nucleadas totales en el cultivo, en valores netos, aumentó el número de células CD34+. El incremento fue observado en los cócteles Mieloide, Eritroide y Mixto I; sin embargo, éste no fue significativo en ningún caso (Cuadro 11).

La Población I se diferenció rápidamente, aunque más despacio que las CMN (Cuadro 12). Al igual que en las CMN, se moduló la diferenciación de las células dependiendo de la presencia de las citocinas en el cóctel. Se generaron células eritroides desde los primeros días en cultivo en presencia de las citocinas añadidas con tal finalidad. Mientras en los cultivos donde sólo se administraron citocinas para inducir a un linaje meloide, este fue el que principalmente se originó.

En la Población I, a diferencia de las CMN, la presencia de blastos se mantuvo durante 10 días, principalmente en el cóctel básico, aunque en

proporciones inferiores a las observadas al día cero, desapareciendo conforme se incrementaba el tiempo en cultivo. Hay que hacer notar que, a diferencia de las CMN, para la Población I existió una clara generación transitoria de las células esperadas en cada condición.

### Discusión

Trabajos publicados por diferentes grupos de investigación, han demostrado la capacidad de proliferación de las CTH/CPH presentes en la sangre de cordón umbilical, superior a la de células de médula ósea, bajo las mismas condiciones de cultivo (Lansdorp et al, 1993). Un primer acercamiento para cumplir los objetivos de la presente tesis fue el conocer el comportamiento de las células mononucleares de SCU, antes de enriquecer, con la finalidad de poder compararlas con las células ya enriquecidas.

Parte de las controversias que se tiene en el estudio de las CPH de SCU se refiere a la población con la cual se debe iniciar la expansión (Ryu et al, 2004). Los trabajos iniciales sobre la expansión de las CPH de SCU se realizaron en CMN sin enriquecer; sin embargo el desarrollo de técnicas en base a la presencia del antígeno CD34, permitió el enriquecimiento o purificación de estas células (CD34+). En la mayoría de los trabajos sobre la expansión de CPH de SCU, las células CD34+ se han purificado por citometría de flujo o por selección positiva empleando nanoesferas magnéticas. En el presente trabajo, se usó un sistema de selección negativa, que permitió enriquecer la población CD34+ con la ventaja de ser linaje negativa (Lin-). Demostramos una disminución significativa (aunque no total) en el porcentaje de células positivas a los diferentes marcadores de linaje analizados (CD3, Gly A, CD14, y CD19), así como un incremento en células con apariencia linfoblastoide, ambas características inmunofenotípicas y morfológicas de las CPH. Funcionalmente, demostramos que las células así obtenidas contienen un alto porcentaje de UFC, y que entra en el intervalo reportado para células CD34+ purificadas por citometría de flujo (9% en las 9 muestras trabajadas contra 8-18% en otros trabajos) (Baines et al, 1988; Durand et al, 1994; Cicuttini et al, 1994).

Las cinéticas de proliferación nos muestran que ambas poblaciones (CMN y Población I) son capaces de responder a citocinas estimuladoras. Previamente, se había demostrado que células mononucleares de SCU, en



cultivos tipo Dexter eran capaces de proliferar (Mayani et al, 1998) aunque de forma inferior a lo observado con células de MO normal en ensayos similares. Es importante recordar que los cultivos tipo Dexter se establecieron por las características de la MO, donde se encuentra una gran cantidad de células adherentes, las cuales forman una capa confluyente que aporta estímulos suficientes para mantener a las células hematopoyéticas; sin embargo, en el caso de SCU no se genera una capa confluyente de células adherentes en iguales condiciones de cultivo, a pesar de la adhesión de algunos tipos celulares (células de características endoteliales y monocitos-macrófagos), pero que mantienen pobremente por sí mismas la población de células hematopoyéticas (Mayani et al, 1998; Gutiérrez-Rodríguez, 2000). Una de las diferencias importantes en el tipo de células generadas en cada fuente es la ausencia de células adiposas, características de cultivos de médula ósea. Así mismo, la adición de citocinas como SCF, IL-3 o IL-6 no favorece la formación de una capa adherente en células mononucleares de SCU (Yi et al, 1994).

Por ello, en el presente trabajo se eligieron combinaciones de citocinas que habían demostrado su efectividad en células purificadas de sangre de cordón umbilical (Mayani et al, 1993), y que se sabe son indispensables en la generación de los diferentes linajes hematopoyéticos en médula ósea (Metcalf y Nicola, 1995). La combinación Básica, constituida por SCF e IL-6 permitió el mantenimiento de la tasa de proliferación de la Población I, lo cual confirma lo observado por Dannaeus et al (1998), donde empleando este cóctel para CPH de ratón, no alcanza una alta proliferación, pero sugiere un mantenimiento de estas células en su cultivo. SCF es considerado un factor de crecimiento necesario en el mantenimiento de la inmadurez de las CTH/CPH, pues al igual que Tpo y FL disparan vías intracelulares que protegen a las células de la apoptosis (Broudy, 1997; Galli et al, 1994; Kaushansky, 1997; Dannaeus et al, 1998). Sin embargo, su efecto por sí mismo es transitorio y requiere de la sinergia con otras citocinas para que se observe algún efecto en la generación de colonias e incluso de células maduras. Resalta en nuestros resultados que se mantiene la generación de células, no así la de UFC, similar a lo observado por el grupo de Ciccutini et al (1994). Al añadir dos citocinas más en cada cóctel (Mieloide: GM-CSF y G-CSF; Eritroide: Epo e IL-3) se provocaron cambios en el comportamiento de las CMN y Población I, dependientes del tipo



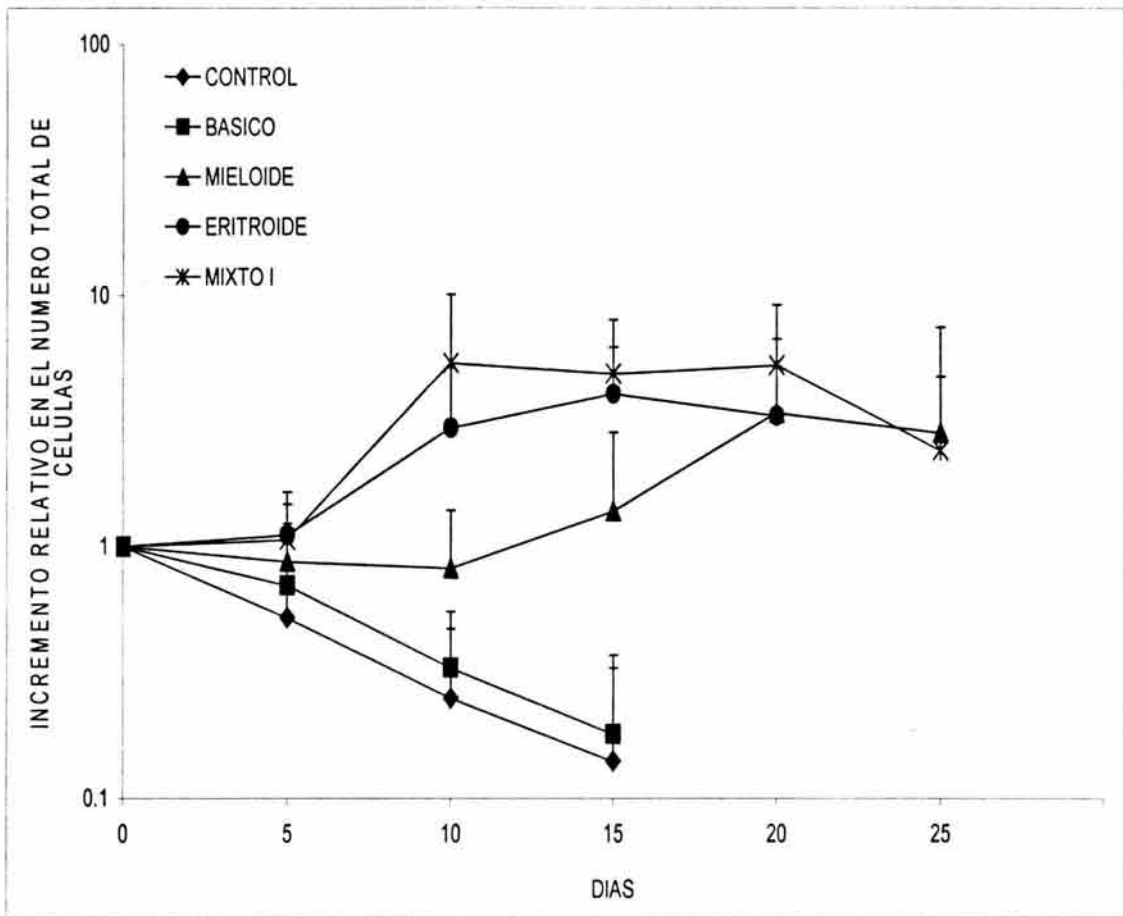
de linaje generado. Al analizar las cinéticas de proliferación de ambas poblaciones, se observa una respuesta más rápida de las células a las citocinas del cóctel Eritroide que a las del cóctel Mieloide, traslapándose ambas cinéticas en el cóctel Mixto I. Este efecto fue claro en la Población I, lo cual demuestra la heterogeneidad de las CMN. Se sugiere que existe un traslape de diferentes subpoblaciones dentro no sólo de las CMN, sino también en la Población I: por una parte existen CPH-eritroides capaces de responder rápidamente al estímulo conjunto de Epo e IL-3, mientras que la respuesta a GM-CSF y G-CSF de CPH-mielodes es menos acelerada. La respuesta de las células de linaje eritroide, sin embargo, no se mantiene por mucho tiempo (~10 días), agotando su "pool", manteniéndose la proliferación mieloide como se observa en la curva del Mixto I. En un segundo plano, se encontrarían las CTH/CPH aún no comprometidas a linaje, y que bajo el efecto de los diferentes estímulos generarían nuevas CPH. Sin embargo, ninguno de los cócteles en CMN y muy pobremente en la Población I, fueron capaces de expandir a las CPH, pese a emplearse citocinas que en poblaciones purificadas de MO y SCU han permitido su expansión (Mayani et al, 1993; Ramsfjell et al, 1999). Una causa de los datos observados puede ser la concentración de las citocinas que empleamos la cual fue inferior a la documentada en reportes de otros grupos, donde las concentraciones usadas van de 50 a 100 ng de cada citocina (Piacibello et al, 1997; De Felice et al, 1998). Sin embargo, cabe resaltar que en esta primera parte del trabajo, el objetivo fue observar el comportamiento de células mononucleares sin enriquecer y enriquecidas, para establecer el sistema de cultivo, pensando en obtener condiciones apropiadas para su estudio posterior.

Otra causa, que no excluye a la anterior, es la generación de factores inhibidores en el sistema, que afectan no sólo la proliferación sino también la expansión de las células más inmaduras. Resaltan los toques máximos de proliferación alcanzados en ambas poblaciones; de aquí se deduce que las CPH son afectadas en la proliferación por las células más maduras, ya que las CMN incluyen una población muy heterogénea, que se encuentra no sólo consumiendo nutrientes sino generando citocinas inhibitoras. Se ha documentado que monocitos-macrófagos son capaces de generar  $TNF\alpha$ .

(Khoury et al, 1992), además que puede haber la producción de MIP-1 $\alpha$  y TGF $\beta$  en cultivos líquidos en ausencia de suero de poblaciones enriquecidas en CPH (Madlambayan et al, 2005). En los cultivos realizados en esta parte, se empleo suero fetal de bovino, el cual contiene proteínas y factores no totalmente caracterizados, pero donde la presencia de factores inhibidores se han observado (Butler et al, 2000).

Por otra parte, la pobre expansión de CPH no se reflejó en un incremento de células CD34+, lo cual sugiere una disociación entre la presencia del antígeno CD34 con la formación de colonias, ensayo clásico que define a las CPH. Esto correlaciona con la observaciones del grupo de Dorrel (2000), quienes encuentran una disociación entre las células CD34+ generadas en sus condiciones de cultivo (diferentes en varios puntos a las nuestras) por citometría de flujo, con la capacidad de reconstituir la médula de ratones inmunosuprimidos.

## Gráficas y cuadros de la sección 6.1



Gráfica 1: Proliferación de CMN de SCU (n=9). CMN de SCU fueron cultivadas (100,000 células/ml) en medio de cultivo con suero, en ausencia o presencia de diferentes combinaciones de citocinas. La gráfica corresponde al promedio de 9 muestras trabajadas por separado, representado el incremento en veces con respecto al número de células sembradas al día cero de cultivo, a los diferentes días evaluados. Existió una diferencia estadísticamente significativa para los cócteles Eritroide, Mieloide y Mixto I al contrastar contra el control y cóctel seminal ( $p < 0.05$ ), pero no entre ellos.

Cuadro 6: Unidades formadoras de colonias (UFC) totales en diferentes días de cultivo en CMN de SCU en medio con suero y diferentes combinaciones de citocinas

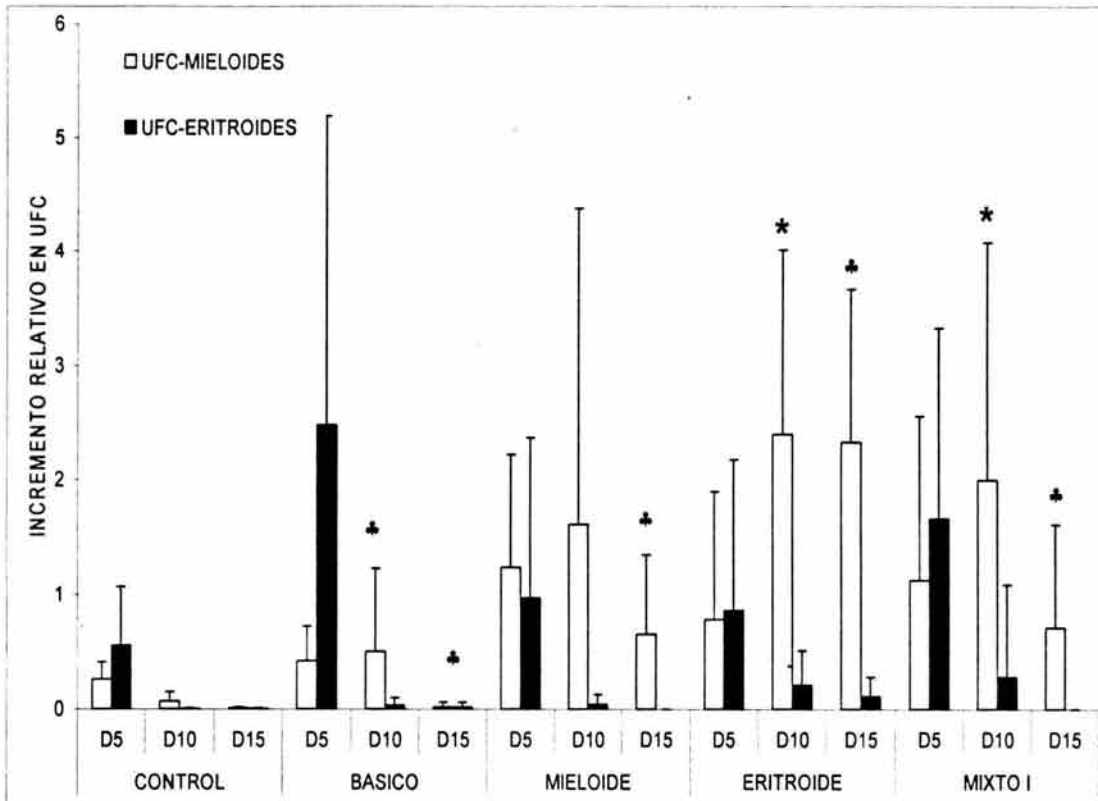
Combinación de Citocinas	UFC Totales		
	Día 5 (IV)	Día 10 (IV)	Día 15 (IV)
Control	0.3 ± 0.1	0.03 ± 0.03	0.001 ± 0.002
Básico	1.0 ± 0.8	0.7 ± 1.4	0.1 ± 0.03**
Mieloide	1.1 ± 1.0	0.5 ± 0.9	0.3 ± 0.3
Eritroide	1.1 ± 4.5	1.6 ± 1.4*	1.0 ± 0.6*
Mixto I	1.2 ± 0.6*	1.0 ± 0.9*	0.2 ± 0.3*

Células mononucleares de SCU cultivadas en diferentes combinaciones de citocinas fueron obtenidas en los diferentes días de cultivo y ensayada su capacidad de formación de colonias sobre metilcelulosa. Los resultados son el promedio de 9 muestras trabajadas por separado.

IV: incremento en veces con respecto a las UFC-T obtenidas al día cero de cultivo las cuales fueron  $210.4 \pm 109.7$  por cada 100,000 células sembradas.

\*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el control en el día marcado ( $p < 0.05$ ).

\*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el cóctel eritroide al día marcado ( $p < 0.05$ ).



Gráfica 2: Expansión de los progenitores mieloides y eritroides de CMN de SCU en medio con suero. En células obtenidas del cultivo de CMN en diferentes combinaciones de citocinas se analizó su contenido de UFC mieloides y eritroides a los diferentes días (D). Los resultados se muestran en incremento en veces con respecto a las UFC obtenidas al día cero de cultivo y son el promedio de 9 muestras trabajadas por separado. Las UFC-E y UFC-M al día cero de cultivo fueron  $130.8 \pm 77.6$  y  $82.4 \pm 35.4$ , respectivamente.

\*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el control ( $p < 0.05$ ) a los días señalados.

+: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el cóctel eritroide ( $p < 0.05$ ) a los días señalados.

Cuadro 7: Análisis de la presencia del antígeno CD34 en la superficie de las CMN en diferentes días del cultivo.

Combinación de Citocinas	Día 5 (IV)	Día 10 (IV)
Control	0.1 ± 0.1	0
Básico	0.1 ± 0.1	0
Mieloide	0.6 ± 0.5	27.7 ± 43.0
Eritroide	0.6 ± 0.8	36.0 ± 47.1
Mixto I	5.0 ± 6.0	91.0 ± 135.9

En células mononucleares de SCU obtenidas en los días 5 y 10 de cultivo en diferentes combinaciones de citocinas se analizó la presencia del antígeno CD34 por inmunocitoquímica. Los valores se obtuvieron al calcular el porcentaje de las células positivas al antígeno CD34 multiplicado por el número acumulado de células obtenidas en cada condición de cultivo. Los datos son el promedio de 5 a 7 muestras trabajadas por separado. No existió diferencia estadísticamente diferente entre las condiciones analizadas ( $p > 0.05$ )

IV: Incremento en veces con respecto al valor obtenido al día cero de cultivo ( $1.55 \pm 0.88$  por cada 100 células analizadas).



Cuadro 8: Morfología de las células generadas en cultivos de CMN de SCU.

Día de cultivo	Tipo celular o linaje.	Cóctel			
		Básico (%)	Mieloide (%)	Eritroide (%)	Mixto I (%)
10	Blastos	0.0	0.6 ± 0.9	0.1 ± 0.3	0.0
	Mieloide	50.2 ± 8.1	57.0 ± 9.2	24.2 ± 11.2	29.9 ± 9.6
	Monocitos/ macrofagos	39.7 ± 4.6	33.0 ± 1.5	25.6 ± 15.5	29.8 ± 13.9
	Eritroide	10.0 ± 12.7	9.2 ± 10.2	49.8 ± 25.1	40.2 ± 18.5
	Megacariocitos	0.0	0.0	0.07 ± 0.1	0.0
20	Blastos	ND	0.0	0.0	0.0
	Mieloide	ND	68.0 ± 10.2	35.4 ± 8.6	13.6 ± 3.1
	Monocitos/ macrofagos	ND	27.3 ± 7.5	19.7 ± 1.6	44.8 ± 20.9
	Eritroide	ND	0.0	44.7 ± 8.0	41.5 ± 23.3
	Megacariocitos	ND	0.0	0.0	0.0
30	Blastos	ND	0.0	0.0	0.0
	Mieloide	ND	39.1 ± 15.3	37.5 ± 8.6	5.1 ± 2.1
	Monocitos/ macrofagos	ND	61.8 ± 15.5	31.1 ± 17.1	80.8 ± 17.2
	Eritroide	ND	0.0	31.2 ± 24.5	14.1 ± 15.5
	Megacariocitos	ND	0.0	0.0	0.0

Células cultivadas en diferentes cócteles de citocinas fueron teñidas con Wright-Giemsa y analizadas en un microscopio óptico a un aumento de 400x. Para el control (ausencia de citocinas), no se determinó el análisis morfológico debido a la escasa recuperación de células en los diferentes días de cultivo. Los datos son el promedio de 5 a 7 muestras en cada condición.

ND: No determinado

Cuadro 9. Características inmunofenotípicas y morfológicas de las CMN y la Población I de SCU al día cero de cultivo.

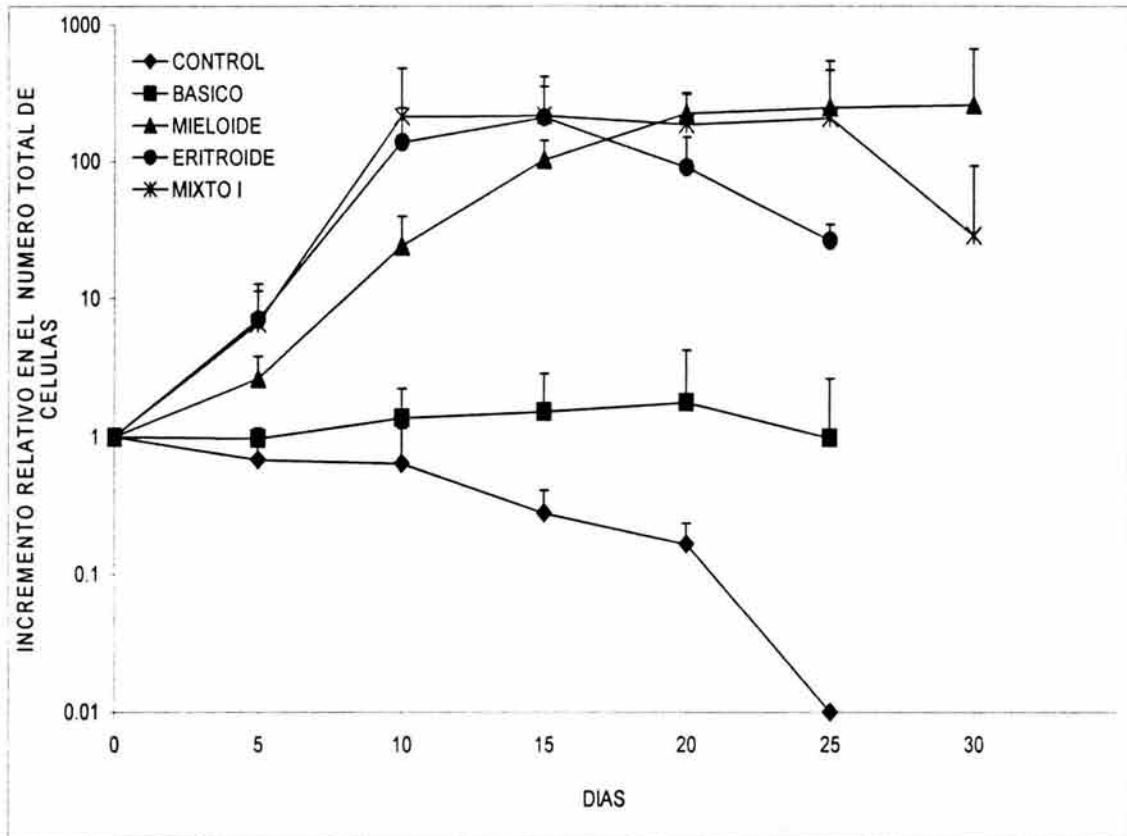
Característica analizada	CMN (%)	Población I (%)	
Inmunofenotipo (n=3)	CD14 <sup>a</sup>	13.0 ± 6.1	3.6 ± 1.3*
	Gly <sup>a</sup>	24.3 ± 19.3	9.3 ± 3.6*
	CD3 <sup>a</sup>	67.3 ± 6.5	8.9 ± 6.8*
	CD19 <sup>a</sup>	11.3 ± 2.7	2.3 ± 1.1*
	CD38 <sup>a</sup>	79.4 ± 7.9	65.7 ± 0.9*
	CD34 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.6	58.8 ± 10.4*
	CD34 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.6	41.6 ± 11.1*
Morfología (n=6)	Blastos	7.0 ± 9.5	62.0 ± 10.3*
	Linaje Mielo-monocítico	57.2 ± 34.7	31.2 ± 8.7
	Linaje Eritroide	35.5 ± 35.6	6.7 ± 11.5
	Linaje Megacariocítico	0.1 ± 0.1	0.0

Células mononucleares y la Población I obtenida por selección negativa, fueron incubadas con anticuerpos y analizadas por citometría de flujo. Un total de 10 000 eventos fueron capturados en cada caso. Los resultados son el promedio de 3 ensayos realizados por separado. Para el análisis morfológico, las células fueron teñidas con el colorante Wright-Giemsa y observadas en un microscopio óptico a un aumento de 400x.

a: Inmunofenotipo medido por citometría de flujo.

b: Inmunofenotipo medido por inmunocitoquímica.

\*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar con los valores para CMN (p < 0.05)



Gráfica 3: Proliferación de la Población I de SCU en medio con suero y diferentes combinaciones de citocinas.  $1 \times 10^5$  células de la Población I fueron cultivadas en cada combinación de citocinas por 4 semanas. Los valores son el promedio de 9 muestras trabajadas por separado. Existió una diferencia estadísticamente significativa para los cócteles Eritroide, Mieloide y Mixto I al contrastar contra el control y cóctel seminal ( $p < 0.05$ ), pero no entre ellos.

Cuadro 10. Unidades formadoras de colonias (UFC) totales medidas a diferentes días de cultivo en la Población I de SCU en medio con suero y diferentes combinaciones de citocinas.

Combinación de Citocinas	UFC Totales			
	Día 5 (IV)	Día 10 (IV)	Día 15 (IV)	Día 20 (IV)
Control	0.05 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.005 ± 0.001	0.001 ± 0.002
Básico	0.2 ± 0.04*	0.1 ± 0.1**	0.03 ± 0.007*	0.01 ± 0.01*
Mieloide	0.7 ± 0.1**	1.3 ± 1.3**	1.4 ± 1.2	0.4 ± 1.2 <sup>♠</sup>
Eritroide	2.7 ± 1.3**	1.7 ± 2.1**	1.0 ± 0.8	0.03 ± 0.06 <sup>♠</sup>
Mixto I	2.1 ± 1.0**	2.5 ± 2.3** <sup>♠</sup>	1.1 ± 1.7	0.2 ± 0.3** <sup>♠♠</sup>

Células de la Población I cultivadas en las diferentes condiciones fueron obtenidas en los días señalados, y analizada su capacidad de formar colonias sobre metilcelulosa. Nueve muestras fueron trabajadas por separadas, y los datos corresponden al promedio de las mismas.

IV: incremento en veces con respecto a las UFC-T obtenidas al día cero de cultivo el cual fue de  $9081 \pm 2969.2$  por cada 100,000 células cultivadas.

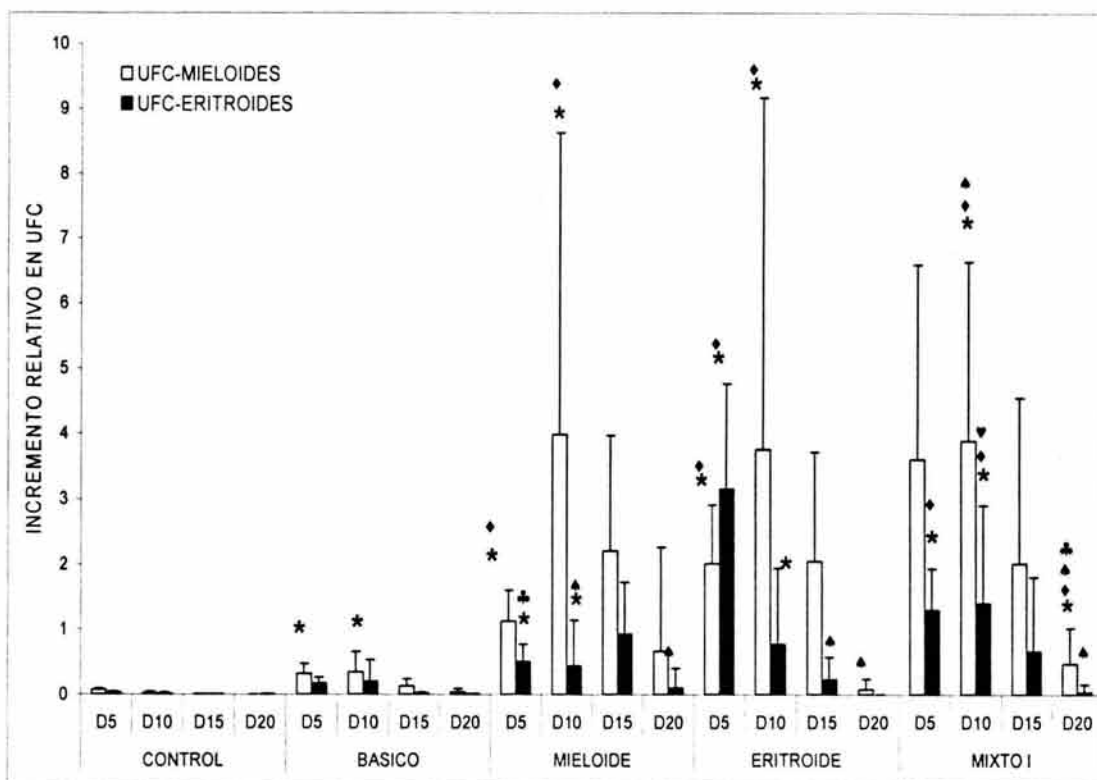
<sup>♠</sup>: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el número de colonias al día cero de cultivo ( $p < 0.05$ ).

\*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el control ( $p < 0.05$ ) a los días señalados.

<sup>♠</sup>: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el cóctel Básico ( $p < 0.05$ ) a los días señalados.

<sup>♥</sup>: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el cóctel Mieloide ( $p < 0.05$ ) a los días señalados.

<sup>♠</sup>: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el cóctel Eritroide ( $p < 0.05$ ) a los días señalados.



Gráfica 4: Expansión de los progenitores mieloides y eritroides en la Población I de SCU en medio con suero. Se analizó la expansión con respecto a la capacidad de formar colonias eritroides y mieloides de células de la Población I cultivadas en diferentes combinaciones de citocinas a lo largo de los días en cultivo (D). Los resultados se muestran en incremento en veces con respecto a las UFC obtenidas al día cero de cultivo y son el promedio de 9 muestras trabajadas por separado. Las UFC-E y UFC-M al inicio del cultivo fueron  $6044.4 \pm 3144.9$  y  $3022.2 \pm 945.7$ , respectivamente.

^: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el número de colonias al día cero de cultivo ( $p < 0.05$ ).

\*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el control ( $p < 0.05$ ) a los días señalados.

♦: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el cóctel Básico ( $p < 0.05$ ) a los días señalados.

♥: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el cóctel Mieloide ( $p < 0.05$ ) a los días señalados.

\*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el cóctel Eritroide ( $p < 0.05$ ) a los días señalados.

Cuadro 11: Análisis de la presencia del antígeno CD34 en la superficie de la Población I en diferentes días del cultivo.

Combinación de Citocinas	Día 5 (IV)	Día 10 (IV)
Control	0.8 ± 0.6	ND
Básico	0.5 ± 0.3	0
Mieloide	0.7 ± 0.5	1.8 ± 1.5
Eritroide	2.0 ± 0.8	0
Mixto I	0.8 ± 0.6	13.6 ± 15.9

En células de la Población I obtenidas de su cultivo presencia de diferentes combinaciones de citocinas a los días señalados, se analizó por inmunocitoquímica la presencia del antígeno CD34 en su superficie celular. No existió diferencia estadísticamente significativa entre los días analizados ( $p > 0.05$ )

IV: incremento en veces con respecto al porcentaje obtenido al día cero de cultivo por inmunocitoquímica, el cual fue de  $41.6 \pm 11.1$ , y son el promedio de 4 a 8 muestras analizadas.

ND: No determinado



Cuadro 12: Morfología de la Población I en cultivo en medio con suero.

Día de cultivo	Tipo celular o linaje.	Control (%)	Cóctel			
			Básico (%)	Mieloide (%)	Eritroide (%)	Mixto I (%)
10	Blastos	52.3 ± 16.3	31.0 ± 16.3	9.1 ± 6.3	2.3 ± 2.7	2.3 ± 2.2
	Mieloide	15.8 ± 17.2	39.3 ± 10.7	67.0 ± 9.7	10.7 ± 4.7	26.5 ± 12.3
	Monocitos/ macrófagos	31.7 ± 26.1	29.6 ± 15.5	23.8 ± 11.6	6.9 ± 7.5	11.9 ± 8.0
	Eritroide	0.0	0.0	0.0	78.3 ± 13.6	58.2 ± 13.8
	Megacariocitos	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
20	Blastos	ND	0.0	0.0	0.75 ± 1.0	0.0
	Mieloide	ND	33.6 ± 12.2	62.8 ± 10.5	51.3 ± 3.2	37.2 ± 8.7
	Monocitos/ macrófagos	ND	66.3 ± 12.2	37.0 ± 10.6	14.7 ± 6.7	28.5 ± 14.0
	Eritroide	ND	0.0	0.0	33.1 ± 4.5	33.1 ± 7.2
	Megacariocitos	ND	0.0	0.0	0.0	0.0
30	Blastos	ND	0.0	0.0	7.3 ± 14.7	0.0
	Mieloide	ND	81.5 ± 1.1	52.1 ± 13.8	49.4 ± 9.1	37.1 ± 14.6
	Monocitos/ macrófagos	ND	19.2 ± 1.0	47.8 ± 13.8	24.4 ± 12.1	5.6 ± 18.5
	Eritroide	ND	0.0	0.0	24.9 ± 19.5	8.6 ± 3.7
	Megacariocitos	ND	0.0	0.0	0	0

Células obtenidas en las diferentes condiciones de cultivo, se tiñeron con Wright-Giemsa y se observaron en un microscopio óptico a 400x. Los datos son el promedio de entre 6 y 9 muestras en cada condición.

Megk: Linaje Megacariocítico.

ND: No determinado.

## 6.2 Desarrollo de las poblaciones celulares en cultivos libres de suero.

### 6.2.1. Población I

En base a los resultados mostrados anteriormente, se procedió a utilizar cultivos libres de suero, pues posiblemente éste influía en la expansión de los progenitores. También se probaron dos citocinas relacionadas con la autorenovación de las células CD34+, trombopoyetina (Tpo, 10 ng/ml) y el ligando de FLT-3 (FL, 10 ng/ml). El medio de cultivo utilizado en esta parte del trabajo fue IMDM y como sustituto de suero, albúmina sérica bovina (1%), Insulina recombinante humana (10 µg/ml) y transferrina humana (200 µg/ml).

El porcentaje de células CD34+ y formación de colonias al día cero de once muestras trabajadas en estas nuevas condiciones fue  $42.01 \pm 8.83$  y  $14.15 \pm 5.92$ , respectivamente. Las células enriquecidas de la manera ya descrita para obtener la Población I fueron con las siguientes combinaciones de citocinas: a) ausencia de citocinas (Control); b) una combinación con citocinas implicadas en la expansión de CPH (Cóctel Seminal: SCF, IL-6, TPO, FL), y c) una combinación que presentaba tanto citocinas involucradas en la expansión de CPH, como en su diferenciación (Cóctel Mixto II: SCF, IL-6, TPO, FL, IL-3, EPO, G-CSF, GM-CSF).

Estas nuevas combinaciones de citocinas fueron seleccionadas después de realizar cultivos de la Población I en medio con sustituto de suero con las 5 primeras combinaciones empleadas en la estandarización (Control, Básica, Mieloide, Eritroide y Mixto I) más las combinaciones Seminal y Mixto II (n=3) (datos no mostrados). La cinética de proliferación para el cóctel Eritroide y Mixto I fue muy semejante a la obtenida con el cóctel Mixto II, tanto en el incremento en veces como en el tiempo en el que alcanza el pico de proliferación mientras que el cóctel Mieloide apenas alcanza las 590 veces de incremento en el número total de células, por debajo de lo obtenido con el cóctel Mixto. Por ello, en las siguientes muestras trabajadas se omitieron los cócteles Mielode, Eritroide y Mixto I, al considerarse que sus efectos quedaban representados en la combinación Mixto II. El cóctel Básico fue omitido al no encontrarse diferencias con respecto a lo observado en este mismo cóctel en medio con suero, mientras que en el cóctel Seminal la Población I incremento no sólo en el número total de células, sino también el número de progenitores

totales generados (1.5 veces como promedio, para el día 10 en las tres muestras analizadas).

A continuación se describen los resultados obtenidos al cultivar la Población I en medio libre de suero. Once muestras fueron cultivadas en presencia de las condiciones Control, Seminal y Mixto II. Se observó que la Población I sembrada en ausencia de citocinas y con medio con sustituto de suero fue incapaz de mantenerse, declinando los cultivos desde los primeros 5 días y la pérdida de los mismos después del día 10 (Grafica 5), lo cual representó la primera diferencia con respecto a los cultivos con suero. En los cultivos sin citocinas en presencia de suero, hubo una pérdida de la población de manera gradual, e incluso después de 15 días puede observarse ocasionalmente células en esta condición (Gráfica 3).

En presencia del Cóctel Seminal y Mixto II las células alcanzaron un pico máximo de proliferación al día 15 de cultivo (Gráfica 5), que es de 26 y 1102 veces, respectivamente. En comparación a los cultivos en presencia de suero y combinaciones Básica y Mixto I, hay un incremento notable en la proliferación, la cual fue de 1.4 y 215 veces para estos cócteles, respectivamente. Otra diferencia importante entre ambos tipos de medios utilizados corresponde al día en el que se alcanza la tasa máxima de proliferación. En presencia de medio con suero, en el caso del cóctel Mixto I, Básico y Eritroide se alcanzó la tasa máxima de proliferación al día 10 de cultivo, mientras que en medio con sustituto de suero la proliferación máxima se vio hasta después del día 15 de cultivo. Cabe mencionar que se realizaron cultivos en medio con suero con la combinación Seminal y Mixta II para observar el efecto de las citocinas Tpo y FL. Sin embargo, aunque se logró una proliferación mayor para ambas combinaciones con respecto a los cócteles Básico y Mixto I (4.54 veces para el cóctel Seminal y 377.7 veces para el Mixto II) esta resultó inferior con respecto a las mismas combinaciones en medio con sustituto de suero.

Con respecto a la expansión de CPH medido por los ensayos de formación de colonias, se encontró un incremento con respecto a lo observado en medio con suero, principalmente en colonias de tipo mieloide, donde fue de 5 y 21 veces para el cóctel Seminal y Mixto II, respectivamente (Cuadro 13 y Gráfica 6). Para el caso de aquellas muestras trabajadas en presencia de

suero, la combinación Mixto II presento un ligero incremento en las UFC totales obtenidas con respecto a los cócteles Básico y Mixto I (3.4 veces), aunque por debajo de lo obtenido en el mismo cóctel en medio con sustituto de suero.

Si bien encontramos un incremento en las UFC con respecto a las condiciones de cultivo en presencia de suero, esta diferencia no existió con respecto al antígeno CD34 en la superficie de las células cultivadas (Cuadro 14). Aunque existió una tendencia a incrementarse el número de células CD34+ en los cultivos en ausencia de suero, con respecto a aquellas condiciones en presencia del mismo, esta diferencia no fue significativa; tampoco lo fue entre los cócteles empleados en ausencia de suero, aunque el cóctel Mixto II presento la tendencia a incrementar el número de células CD34+ durante los primeros 10 días de cultivo. Con fines de comparar directamente el número total de células generadas, las UFC-mieloides, que fueron las más persistentes, y la presencia de las células CD34+ obtenidas en cultivos en ausencia de suero, los datos se graficaron conjuntamente (Gráfica 7). Se señalan los datos para los cócteles Seminal y Mixto II, dado que en ausencia de citocinas, la población se perdió en los primeros 10 días.

Una diferencia importante entre el tipo de células que se generaron fue la presencia de células eritroides en presencia del cóctel Seminal en comparación con el cóctel Básico (Cuadro 15), así como un mayor número de células de linaje monomacrofágico en los últimos días de cultivo. Se observa un mayor equilibrio en el mantenimiento de los linajes generados, en comparación a lo observado en presencia de suero, posiblemente debido a la adición de las citocinas Tpo y FL a los cultivos, así como la eliminación del suero en los mismos. También se observa un agotamiento de los linajes mieloides y eritroides, conforme avanza el cultivo, incrementándose la presencia de células monomacrofágicas.

### 6.2.2. Población II.

Para obtener la Población II, se empleó el mismo sistema de StemSep™, con variantes en el tipo de anticuerpos empleados para el enriquecimiento, como se describe en materiales y métodos. Al igual que para las CMN y la Población I, se analizaron varios antígenos de superficie en la Población II, para definir sus características, así como su capacidad clonogénica y morfología al día cero de cultivo (Cuadro 16).

Un promedio de  $0.23\% \pm 0.52\%$  (rango de 0.02-1.8) de células totales fueron recuperadas de la selección negativa ( $n=11$ ). Así mismo, la formación de colonias fue menor de manera significativa con respecto a la Población I ( $p < 0.05$ ):  $5.29 \pm 3.64$  en UFC-Totales por cada 100,000 células de la Población II (enriquecimiento de  $17.98 \pm 13.37$  veces en UFC totales con respecto a las CMN). Al analizar el tipo de células obtenidas postcolumna, se comprobó que la Población II fue enriquecida en células CD34+CD38-Lin- (Cuadro 16), lo cual indica la efectividad del cóctel de anticuerpos empleados para la obtención de esta población, el cual además de incluir los mismos anticuerpos empleados para el enriquecimiento de la Población I, incorporaba a aquellos dirigidos contra CD38, CD45RA y CD36. Las células remanentes CD45RA+ y CD36+ no fueron analizadas. El enriquecimiento medido con respecto al antígeno CD34 por inmunocitoquímica fue de  $70.92 \pm 99.4$  veces ( $n=6$ ), pero no se midió el enriquecimiento con respecto a CD38, CD45RA o CD36.

Las células de la Población II fueron sembradas en las mismas condiciones que para la Población I en medio libre de suero. En la Gráfica 8 se muestra el promedio de 11 muestras cultivadas en estas condiciones. En ausencia de citocinas, las células de la Población II desaparecen más rápido que la Población I en las mismas condiciones, ya que después de 7 días sólo ocasionalmente se encontraron células vivas. Las células de la Población II proliferan tanto en el cóctel Seminal como en el Mixto II, siendo esta última combinación la que permitió obtener mayor número de células. El incremento máximo en el número total de células fue de 1950 veces para el cóctel Mixto II y 103 veces para el cóctel Seminal, al día 21 de cultivo, siendo una diferencia significativa entre ambas curvas de proliferación ( $p < 0.05$ ).

El comportamiento en la proliferación se vio reflejado en la formación de colonias. En el Cuadro 17, se presentan las UFC-totales, donde existió no sólo un incremento significativo durante más de 28 días para ambos cócteles en comparación no sólo contra el control, sino también contra el número de progenitores totales presentes al día cero de cultivo. Este incremento corresponde a los mismos días donde se observó el pico de células nucleadas (Gráfica 10), correspondiendo con el de progenitores mieloides en ambos cócteles con citocinas, si bien en el Mixto II, los progenitores eritroides no sólo tuvieron un incremento significativo con respecto al cóctel Seminal, sino que este fue duradero durante el tiempo de cultivo (Gráfica 9).

La expansión de progenitores sin embargo, no se reflejó en una expansión significativa de células CD34+ (Cuadro 18). Morfológicamente, existió una generación de los diversos linajes de manera semejante a lo observado con la Población I (Cuadro 19). Resalta una disminución más lenta de células linfoblastoides, aunque no fue significativa en comparación con la que ocurre en la Población I en las mismas condiciones de cultivo. Otra diferencia importante es el tiempo en el que aparecen los linajes en la combinación Mixta II para la Población II en comparación con la Población I, aunque al final de los cultivos hubo mayor predominio de células monomacrofágicas.

### Discusión

Uno de los problemas a resolver dentro de la terapia clínica donde se emplean CPH de SCU, es el tiempo de injerto de las mismas. El injerto se mide en el número de ciertos linajes celulares en la sangre de los pacientes donde se aplicó la terapia. Es por ello, que la diferenciación, mantenimiento y expansión de las CPH de SCU adquiere relevancia, así como las técnicas y sistemas empleados con tal finalidad. Si bien la presencia de SFB garantiza que en ausencia de citocinas, las CPH se mantendrán por algún tiempo, la presencia de factores de origen animal (xenogénicos) en sistemas de expansión los hacen poco viables para su utilización en la clínica (Smith et al, 2004; Chivu et al, 2004). Es por ello, que el empleo de sustitutos de suero fetal bovino, basados en el componente más abundante en el mismo, la albúmina sérica bovina se han desarrollado. Alternativos a este, se encuentra el emplear



suero humano; sin embargo, el efecto de este sobre las CPH es menos efectivo tanto en proliferación como en expansión, aún y con el empleo de citocinas, ya que se pierde más rápido la presencia de las CPH y se genera un menor número de células nucleadas totales (De Bruyin et al, 2003; Butler et al, 2000).

Al cultivar las CPH de SCU en medio libre de suero, se evidenció la necesidad de estas células por citocinas que prevengan la apoptosis y/o estimulantes de la proliferación, diferenciación o mantenimiento de las poblaciones originales. La proliferación de las células de ambas poblaciones en ausencia de citocinas decrece rápidamente, en comparación con células de la Población I en medio con suero. Además de la presencia de suero, los resultados de la estandarización mostraban deficiencias en el sistema de expansión de las CPH, posiblemente debido a la ausencia de estimulantes de la autorenovación y/o inhibidores de la diferenciación. Es por ello que se adiciono Tpo y el ligando de FLT-3 (FL). Se ha documentado que ambas citocinas son necesarias para la autorenovación de las CPH de médula ósea (Wondar-Filipowicz, 2003). Incluso existen reportes que las relacionan con una expansión de CPH obtenidas de SCU y que a elevadas concentraciones no sólo incrementan el número de CPH in vitro, sino que generan células CD34+ capaces de repoblar ratones NOD-SCID (Piacibello et al, 1997). En el cóctel Seminal, las 4 citocinas (SCF, Tpo, FL e IL-6), interactúan retardando la diferenciación, y si bien se generan todos los linajes mieloides, el incremento en las UFC-Totales y el número de células totales resultó inferior al observado en la combinación Mixta II, para ambas poblaciones. La adición de Tpo tiene un efecto en la generación de megacariocitos, que no observamos en cóctel básico; se ha documentado que la combinación de Tpo e IL-3 estimula la generación de progenitores eritroides, y en ratones deficientes a esta citocina existe un daño en este linaje, si bien no se encuentra del todo suprimido.

La generación de células eritroides la atribuimos principalmente a la presencia de Tpo, ya que se ha documentado que FL necesita de la presencia de Epo para generar este linaje y en pacientes con anemias severas (congénitas o adquiridas), los niveles de FL son elevados (Wondar-Filipowicz, 2003). Así mismo, se ha documentado que el desarrollo de CPH-eritroides tempranas (BFU-E) esta regulado principalmente (no exclusivo) por SCF y su receptor, mientras que la diferenciación terminal de las células eritroides

necesita de Epo (Ratajczak et al, 2001). Lo más probable es que la generación de células rojas observado en el cóctel Seminal sea como producto de la interacción de SCF y Tpo. Por otra parte, la generación de megacariocitos podría requerir de concentraciones superiores de Tpo a las empleadas en nuestro sistema, pues en presencia de SCF e IL-3, se ha documentado un porcentaje superior al 10% en la generación de este linaje (Miyazaki y Kato, 1999; Sawai et al, 1999).

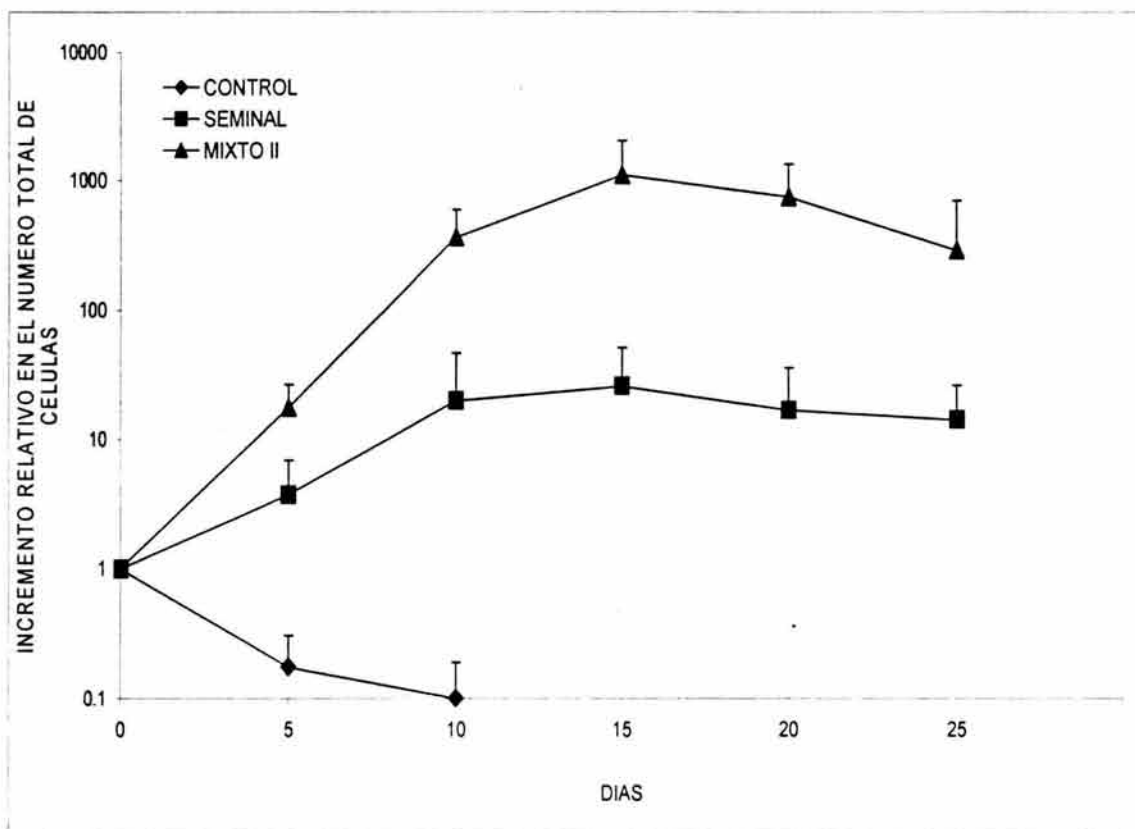
Se encontró un incremento significativo en la expansión de las CPH en relación con aquellas mismas condiciones pero en presencia de SFB, debida en parte a la eliminación de este en los cultivos y por otro lado a la presencia de las citocinas Tpo y FL. Específicamente, en el caso de la Población II, la expansión en UFC es sostenida, lo cual indica la inmadurez de las células con las que se inicio el cultivo. La Población II esta enriquecida en células CD34+CD38-Lin-, en la cual se han encontrado la gran mayoría de células con capacidad de repoblar ratones SCID (Wognum et al, 2003). Es posible que a partir de esta población se esté generando una gran parte de las células que al día cero componen la Población I. Es decir, se está generando una población más heterogénea, pero con una respuesta más rápida a citocinas. Esto se observa al comparar las cinéticas de proliferación de ambas poblaciones, donde los tiempos a los que se alcanzan los picos máximos en incremento en veces en células nucleadas, van retrasados ente 7 y 10 días entre ellas. Cuando se inicia el cultivo con la Población I (enriquecidas en células CD34+Lin-), la Población II (en su mayoría células CD34+CD38-Lin-) queda encubierta y sus efectos traslapados en la respuesta casi inmediata de la Población I. Posiblemente, no sólo la Población II queda encubierta, sino la misma generación de células maduras y condiciones de cultivo van reduciendo la posibilidad de explorar al máximo la potencialidad de las células CD34+CD38-Lin- al iniciar los cultivos con una población más heterogénea como lo es la I. Por citometría de flujo se ha encontrado que entre un 10 a un 31% de las células CD34+ de MO son CD34+CD38-Lin-, mientras que para SCU se reduce a un 3-8% en la misma población (Gallacher et al, 2000; Hao et al, 1998; Yoo et al, 2003). Esto indica la dificultad para aislar estas células y la repercusión del empleo de un sistema como el usado aquí para enriquecer en esta población, conservando otras poblaciones primitivas.

Se considera que todas las CPH presentan el antígeno CD34 en superficie, pero no todas las células CD34+ son CPH. Sin embargo, para ambas poblaciones después de 10 días en cultivo sólo en determinados casos se encontraron células CD34+ positivas, en parte por la menor sensibilidad del sistema de detección. Estos resultados fueron independientes del cóctel de citocinas empleado, ya que en ambos se repitió este patrón. Al comparar con las UFC, estas se obtuvieron aún cuando no se detectaron células CD34+ (Gráficas 7 y 10). No se descarta la posibilidad de una internalización del antígeno CD34 en las CPH. Reportes recientes indican que si bien la función específica del antígeno CD34 sobre las CPH se desconoce, este puede ser modulado en superficie, dependiendo del estado del ciclo celular, así como la presencia de ciertas citocinas, entre las que se encuentra SCF y Tpo, y el TGF- $\beta$  (Sato et al, 1999; McGukin et al, 2003; Dao et al, 2003; Zanjian et al, 2003). Es posible que parte de este proceso esté ocurriendo, no sólo porque los cócteles de citocinas en que se cultivaron las células de ambas poblaciones presentaban SCF y Tpo, sino además por la interacción que pudieron tener estas dos citocinas con el resto de los factores de crecimiento, lo cual condujo a iniciar el ciclo celular en las CPH quiescentes, durante los primeros días en cultivo. Si esto está ocurriendo, una alta proporción de las células obtenidas en cultivo se considerarían como CPH, ya que aún a pesar de no tener el antígeno CD34 en superficie, funcionalmente se comportan como tales, e incluso en el caso de la Población II, se mantiene a lo largo del cultivo, en ambos cócteles. El antígeno CD34 se modula durante el proceso de diferenciación, desapareciendo conforme las células adquieren antígenos específicos de linaje (McGukin et al, 2003; Wognum et al, 2003), así que es comprensible no encontrarlo conforme se incrementa el número de células maduras diferenciadas en los cultivos.

Los resultados en la expansión para la Población I se encuentran dentro de los intervalos documentados en la literatura para las células CD34+, obtenidas por selección positiva. Un artículo reciente (Forraz et al, 2004) donde emplean un sistema de enriquecimiento negativo, obtienen datos de recuperación a partir de CMN de SCU muy similares a los nuestros ( $0.1 \pm 0.02\%$ ); sin embargo los datos que reportan en UFC al día cero de cultivo así como el incremento en el número total de células obtenidas después de 8

semanas en cultivo en presencia de SCF, Tpo y FL es muy inferior a lo encontrado por nosotros. Un dato importante, que permite observar las cualidades de enriquecer en células Lin- (Población I aquí), es el porcentaje de células CICLP, las cuales no se midieron en el presente trabajo, pero que los autores reportan un incremento significativo con respecto a MO adulta (3.34 veces). Por su parte para la Población II, si bien no existen reportes donde se emplee un sistema semejante para enriquecer células CD34+CD38-Lin-, los datos de proliferación se encuentran dentro del intervalo documentado en estudios donde se purifican estas células de SCU (Hao et al, 1998; Schilz et al, 1998; Lewis et al, 2001). Aunque para ambas poblaciones los porcentajes de formación de colonias a los diferentes días de cultivo y la duración del mismo están en el límite inferior de otros reportes (Hao et al, 1998), algunos autores sugieren que para que un sistema de cultivo sea aplicable en la clínica, lo mínimo requerido sería aquellas condiciones que permitan un incremento de 500 veces en el número total de células y de 10 veces para el número de progenitores (Douay, 2001). Por lo tanto, nuestro sistema de cultivo sobre la Población I, dada la frecuencia en la que se encuentran las células de la Población II, es lo suficientemente eficiente para la expansión de CPH de acuerdo con el parámetro señalado si quisieran ser utilizadas con fines terapéuticos.

## Gráficas y cuadros sección 6.2



Gráfica 5: Proliferación de la Población I de SCU en medio con sustituto de suero y diferentes combinaciones de citocinas.  $1 \times 10^5$  células de la Población I fueron cultivadas en cada combinación de citocinas. Los valores son el promedio de 11 muestras trabajadas por separado. Existió una diferencia estadísticamente significativa entre los tres cócteles a los días 5 y 10 y entre el cóctel Seminal y Mixto a los días 5, 10, 15 y 20 de cultivo ( $p < 0.05$ ).

Cuadro 13. Unidades formadoras de colonias (UFC) totales medidas a diferentes días de cultivo en la Población I de SCU en medio con sustituto de suero y diferentes combinaciones de citocinas.

Combinación de Citocinas	UFC Totales			
	Día 5 (IV)	Día 10 (IV)	Día 15 (IV)	Día 20 (IV)
Control	0.02 ± 0.005 <sup>*</sup>	0.01 ± 0.01 <sup>*</sup>	ND	ND
Seminal	2.0 ± 1.0	1.7 ± 1.6 <sup>*</sup>	0.4 ± 0.3 <sup>*</sup>	0.3 ± 0.4
Mixto II	4.7 ± 2.9	6.6 ± 6.2 <sup>*♦*</sup>	3.4 ± 4.4 <sup>♦</sup>	0 <sup>*</sup>

Células de la Población I cultivadas en las diferentes condiciones fueron obtenidas en los días señalados, y analizada su capacidad de formar colonias sobre metilcelulosa. Once muestras fueron trabajadas por separadas, y los datos corresponden al promedio de las mismas ± desviación estándar.

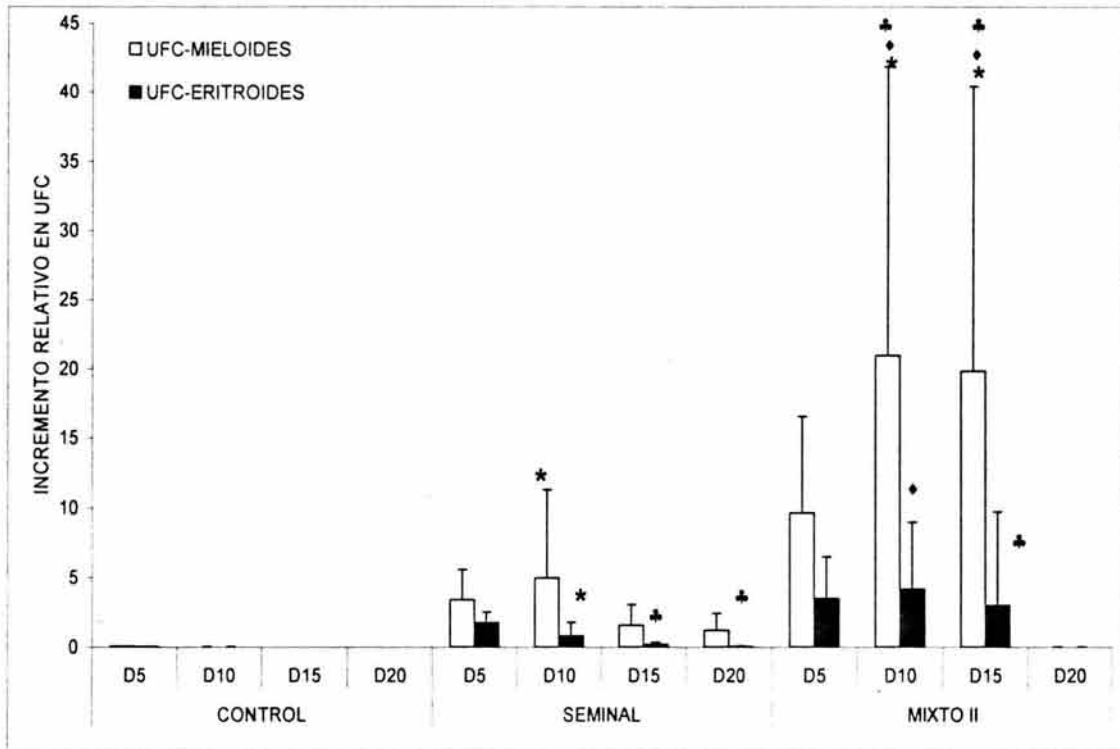
IV: incremento en veces con respecto a las UFC-T obtenidas al día cero de cultivo el cual fue de  $14154.3 \pm 5927.1$  por cada 100,000 células cultivadas.

\*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el control en los días señalados ( $p < 0.05$ ).

♦: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el cóctel seminal en los días señalados ( $p < 0.05$ ).

\*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra los valores del día cero ( $p < 0.05$ ).





Gráfica 6: Expansión de los progenitores mieloides y eritroides en la Población I de SCU en medio con sustituto de suero. Se analizó la expansión con respecto a la capacidad de formar colonias eritroides y mieloides de células de la Población I cultivadas en diferentes combinaciones de citocinas a lo largo de los días en cultivo (D). Se gráfico el promedio de 11 muestras  $\pm$  desviación estándar.

El incremento fue relativo a las UCF-M y -E obtenidas al inicio del cultivo, las cuales fueron  $3263.3 \pm 2396.3$  y  $11163.6 \pm 4909.4$ , respectivamente, por cada 100,000 células cultivadas.

\*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el control ( $p < 0.05$ ) a los días señalados.

♦: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el cóctel seminal ( $p < 0.05$ ) a los días señalados.

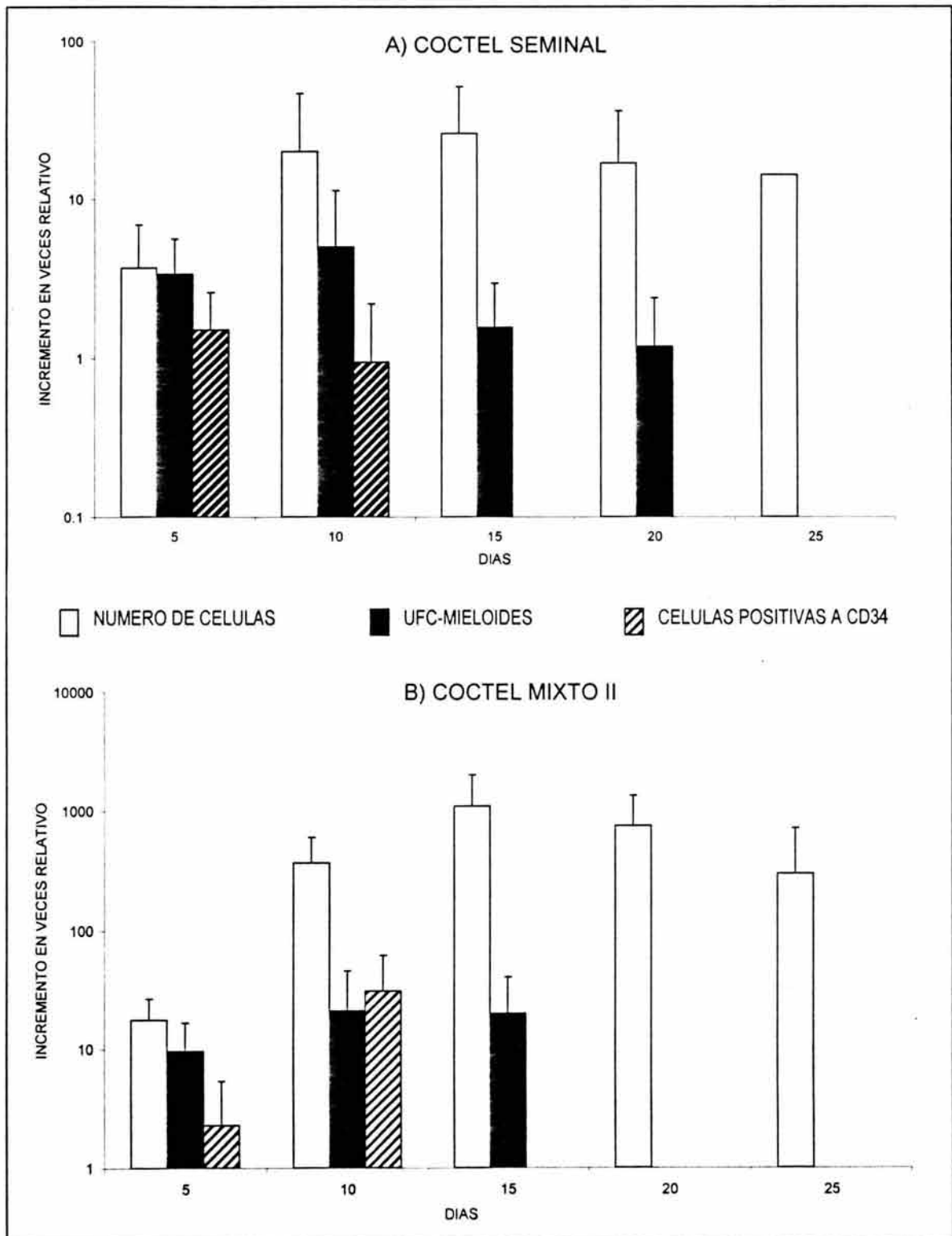
\*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra los valores día cero ( $p < 0.05$ ) a los días señalados.

Cuadro 14: Análisis de la presencia del antígeno CD34 en la superficie de la Población I de SCU en medio con sustituto de suero y diferentes combinaciones de citocinas,

Combinación de Citocinas	DIA CERO (n=10)	DIA 5 (IV)	DIA 10 (IV)
Control (n=3)	42.0±8.8	0.03±0.03	ND
Seminal (n=11)		1.5±1.0	0.9±1.2
Mixto II (n=11)		2.2±3.1	31.0±31.1

Células de la Población I, tanto al inicio (día cero) como a distintos días de cultivo se trataron por inmunocitoquímica contra el antígeno CD34. Los resultados se muestran en incremento en veces (IV) con respecto al valor obtenido al día cero de cultivo multiplicado por el número de células totales obtenidas en cada condición. Los resultados se dan en promedio ± desviación estándar del número de muestras analizadas y señaladas en cada caso.

ND: No determinado



Gráfica 7. Comparación de los parámetros analizados en células de la Población I, número de células, UFC-mieloides y células positivas al antígeno CD34 obtenidas al cultivarla en medio libre de suero y dos combinaciones de citocinas (A) Seminal y B) Mixto II). Se gráfico el incremento en veces relativo a los valores obtenidos al día cero de cultivo de cada parámetro.

Cuadro 15: Morfología de la Población I en cultivo en medio con sustituto de suero.

Cóctel	Tipo celular o linaje.	Día de cultivo			
		10 (n=11)	15 (n=9)	20 (n=5)	25 (n=5)
Seminal	Blastos	3.7±3.0	3.4±3.4	1.0±0.8	0
	Mieloide	51.0±12.0	56.4±11.9	45.4±27.2	49.7±5.7
	Monocitos/ macrófagos	38.8±10.2	36.8±10.7	34.8±1.0	47.5±5.7
	Eritroide	4.4±5.8	2.9±1.9	1.4±1.3	2.6±2.2
	MegK	1.9±2.3	10.8±1.2	0.6±0.6	0.2±0.3
Mixto II	Blastos	1.9±1.6	0.7±0.6	0	0.2±0.4
	Mieloide	32.0±8.5	44.6±12.1	48.8±13.3	44.1±10.5
	Monocitos/ macrófagos	14.6±8.8	26.3±12.9	30.5±15.0	35.3±12.5
	Eritroide	51.0±16.7	28.7±8.7	18.0±30.8	19.6±13.6
	MegK	0.4±0.6	1.3±2.5	1.7±2.8	0.7±1.2

Células obtenidas de las diferentes condiciones de cultivo, se tiñeron con Wright-Giemsa y se observaron en un microscopio óptico a 400x. Los datos se muestran en porcentaje (%) y son el promedio de las muestras señaladas en cada caso.

Megk: Linaje Megacariocítico.

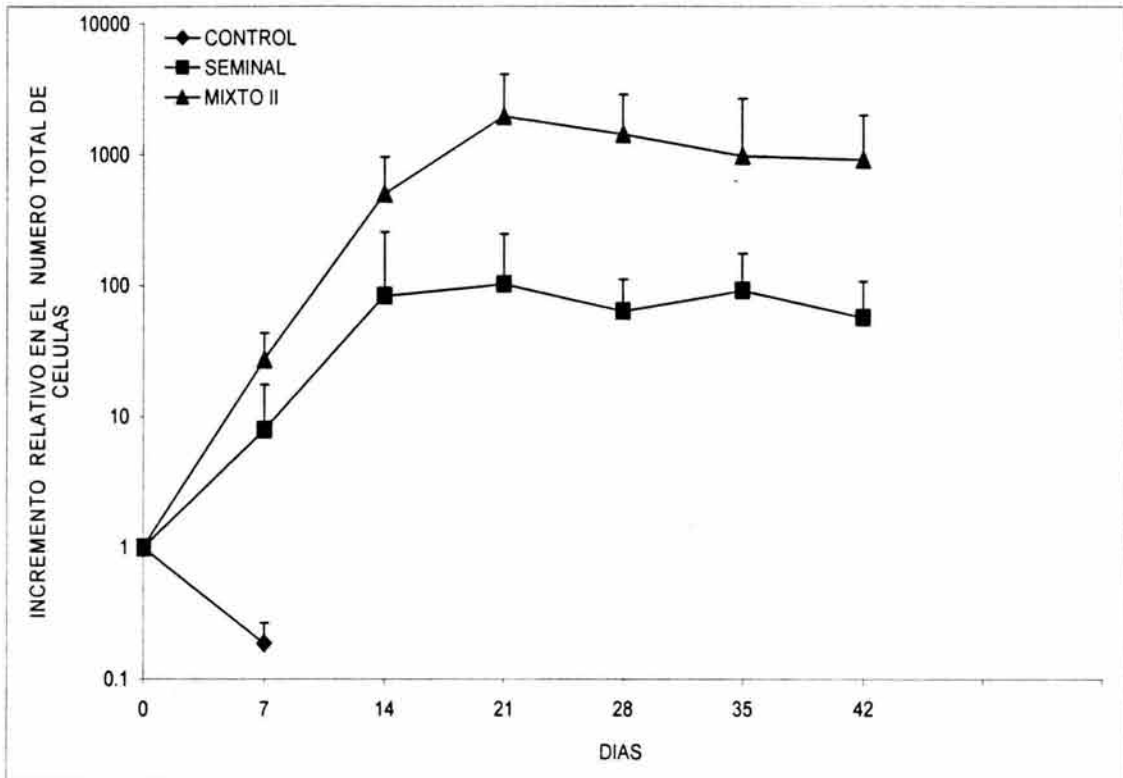
Cuadro 16. Características inmunofenotípicas y morfológicas de la Población II de SCU al día cero de cultivo.

Característica analizada	Porcentaje	
Inmunofenotipo (n=3)	CD14 <sup>a</sup>	4.3±3.2
	Gly <sup>a</sup>	12.5±10.1
	CD3 <sup>a</sup>	9.9±5.0
	CD19 <sup>a</sup>	3.0±2.8
	CD38 <sup>a</sup>	3.9±4.1
	CD34 <sup>a</sup>	60.4±10.4
	CD34 <sup>b</sup>	51.8±17.0
Morfología (n=4)	Blastos	62.6±8.5
	Linaje Mielo-monocítico	36.6±8.7
	Linaje Eritroide	5.0±1.3
	Linaje Megacariocítico	0

Células obtenidas de la selección negativa para enriquecer la Población II, fueron caracterizadas con respecto a su contenido de diversos antígenos linaje positivo. Un total de 10 000 eventos fueron capturados en cada caso. Para el análisis morfológico, las células fueron teñidas con el colorante Wright-Giemsa y observadas en un microscopio óptico a un aumento de 400x. Los resultados se muestran en promedio ± desviación estándar de tres ensayos realizados por separado.

a: Inmunofenotipo medido por citometría de flujo.

b: Inmunofenotipo medido por inmunocitoquímica.



Gráfica 8: Proliferación de la Población II de SCU en medio con sustituto de suero y diferentes combinaciones de citocinas. Los valores son el promedio de 11 muestras trabajadas por separado con su respectiva desviación estándar. Existió una diferencia estadísticamente significativa entre los tres cócteles al día 7 y entre el cóctel Seminal y Mixto II en todos los días de cultivo ( $p < 0.05$ ).



Cuadro 17. Unidades formadoras de colonias totales medidas a diferentes días de cultivo en la Población II de SCU.

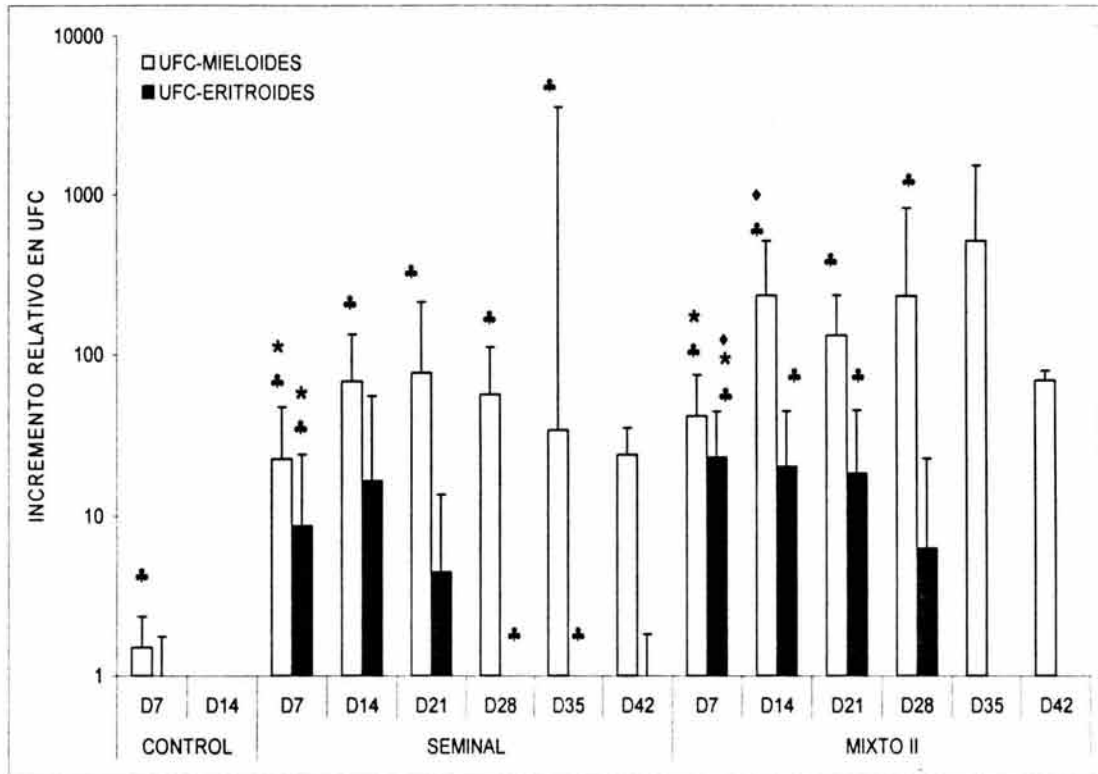
Día de cultivo	Combinación de citocinas		
	Control (IV)	Seminal (IV)	Mixto II (IV)
7	0.65±0.58	15.8±20.5 <sup>*</sup>	35.1±28.8 <sup>*♦</sup>
14		35.9±48.8 <sup>*</sup>	54.8±32.4 <sup>*</sup>
21		43.9±65.2 <sup>*</sup>	47.0±31.4 <sup>*</sup>
28		15.7±9.3 <sup>*</sup>	37.0±76.4 <sup>*</sup>
35		14.6±17.2 <sup>*</sup>	67.1±134.2
42		8.2±5.5	4.5±6.4

Células de la Población II cultivadas en medio con sustituto de suero y diferentes combinaciones de citocinas fueron analizadas en su capacidad para formar colonias sobre capas de metilcelulosa. Los resultados se muestran en promedio ± desviación estándar (n=11), en incremento en veces (IV) con respecto a las UFC obtenidas al día cero de cultivo las cuales fueron 5296.9 ± 3645.3 por cada 100,000 células cultivadas.

\*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el control (p < 0.05) en los días señalados.

♦: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el cóctel seminal (p < 0.05) en los días señalados.

\*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra los valores del día cero (p < 0.05) en los días señalados.



Gráfica 9: Expansión de los progenitores mieloides y eritroides en la Población II de SCU en medio con sustituto de suero (n=11). Células de la Población II obtenidas en distintos días de cultivo (D) en diferentes combinaciones de citocinas fueron sembradas en metilcelulosa para analizar su capacidad de formación de colonias. Los resultados se muestran en incremento en veces con respecto a las UFC-M y -E obtenidas al día cero de cultivo las cuales fueron  $1888.5 \pm 1526.3$  y  $4027.2 \pm 3031.1$ , respectivamente, por cada 100,000 células cultivadas.

\*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el control ( $p < 0.05$ ) en los días señalados.

◆: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el cóctel seminal ( $p < 0.05$ ) en los días señalados.

♣: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra los valores del día cero ( $p < 0.05$  en los días señalados).

Cuadro 18: Análisis de la presencia del antígeno CD34 en la superficie de la Población II en diferentes días del cultivo.

Combinación de Citocinas	Día 7 (IV)	Día 14 (IV)
Control	ND	ND
Seminal (n=5)	1.5±1.3	2.0±2.3
Mixto II (n=7)	4.8±7.6	20.8±33.2

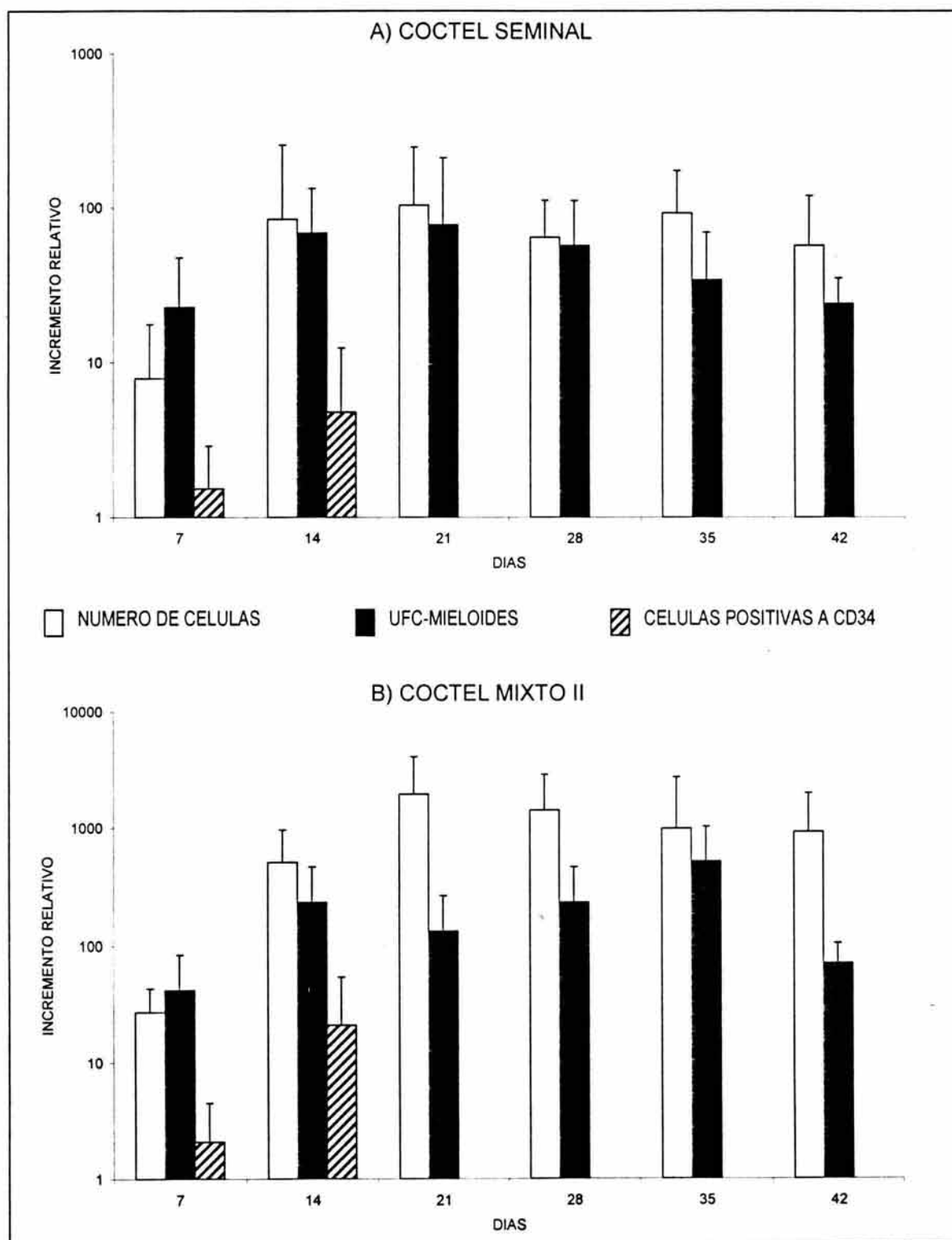
Células de la Población II, cultivadas en diferentes condiciones fueron analizadas por inmunocitoquímica dirigida contra el antígeno CD34. Los resultados se muestran en promedio  $\pm$  desviación estándar de las muestras marcadas en cada caso. El incremento en veces (IV) es el resultado de multiplicar el % de células positivas obtenidas en cada caso con el incremento en el número total de células al día de realizar el ensayo, y dividirlo con valor obtenido al día cero de cultivo, el cual se muestra en el cuadro 16.

ND: No determinado por el bajo número de células recuperadas en esta condición.

Cuadro 19: Morfología de la Población II en cultivo en medio con sustituto de suero.

Cóctel	Tipo celular o linaje.	Día de cultivo			
		7 (n=5)	14 (n=8)	21 (n=5)	35 (n=4)
Seminal	Blastos	6.7±5.1	3.4±1.3	0.5±0.7	0.2±0.3
	Mieloide	42.0±3.0	42.3±6.0	54.9±12.8	54.4±7.0
	Monocitos/ macrófagos	41.4±3.3	46.1±6.7	34.6±3.6	36.0±5.5
	Eritroide	4.1±3.6	6.6±4.6	8.2±8.1	8.6±5.5
	Megacariocitos	2.2±0.7	1.5±1.2	1.7±0.3	0.6±0.5
Mixto II	Blastos	1.6±2.5	0.7±0.8	0.9±0.5	0.0
	Mieloide	48.2±7.4	31.0±13.5	27.9±10.7	38.3±4.0
	Monocitos/ macrófagos	7.1±1.7	21.8±7.1	31.5±15.4	23.7±6.3
	Eritroide	39.7±8.4	45.3±13.1	39.0±26.2	36.2±10.5
	Megacariocitos	3.2±2.5	0.9±0.4	0.5±0.7	1.6±2.0

Células obtenidas de las diferentes condiciones de cultivo, se tiñeron con Wright-Giemsa y se observaron en un microscopio óptico a 400x. Los datos se muestran en promedio ± desviación estándar de las muestras señaladas en cada caso y son dados en porcentaje (%).



Gráfica 10. Comparación de los parámetros analizados en células de la Población II, número de células, UFC-mieloides y células positivas al antígeno CD34 obtenidas al cultivarla en medio libre de suero y dos combinaciones de citocinas (A) Seminal y B) Mixto II). Se gráfico el incremento en veces relativo a los valores obtenidos al día cero de cultivo de cada parámetro.

### **6.3 Desarrollo de las poblaciones celulares en cultivo en presencia de células troncales mesenquimales (CTM) de médula ósea normal.**

Si bien las CPH de SCU, al momento de ser obtenidas se encuentran en circulación, su sitio de residencia final será la médula ósea. Parte de la interacción célula-célula que tiene lugar en este sitio, se lleva a cabo con células que componen el estroma de la MO. Con el objetivo de analizar el efecto sobre la proliferación, expansión y diferenciación de las CPH obtenidas de SCU sobre células que forman parte del estroma de la MO, se realizaron cocultivos sobre capas de CTM provenientes de donadores sanos de MO.

Un total de 9 muestras de SCU se emplearon en esta parte del trabajo: 4 para obtener la Población I y 5 para la Población II. El promedio de recuperación postcolumna y UFC al día cero fue: 1.95% ( $\pm$  1.18) y 14.2% ( $\pm$  5.46) para la Población I y 0.26% ( $\pm$  0.12) y 6.91% ( $\pm$  5.69) para la Población II. Para la Población I existió un ligero incremento en las UFC para estas 4 muestras en relación con los datos obtenidos previamente, pero no fue significativo. Las células fueron sembradas sobre capas preformadas de CTM de médula ósea normal, las cuales fueron previamente incubadas con Mitomicina C para detener su proliferación. La mitomicina C es un agente quimioterapéutico, que se incorpora al ADN de las células durante la replicación de las mismas, formando uniones covalentes en las cadenas complementarias, evitando síntesis posteriores de ADN y deteniendo la proliferación (Humeau et al, 1996). A determinadas concentraciones la Mitomicina C es capaz de detener la proliferación celular sin interferir en la síntesis de ARN y/o proteínas. Para establecimiento de la concentración de la Mitomicina C así como el tiempo de exposición a la misma, se tomó de referencia un estudio previo (Ponchio et al, 2000), así como lo establecido por Flores-Figueroa (2006); se realizaron estudios de proliferación y apoptosis para conocer la concentración adecuada (Datos referidos en Flores-Figueroa, 2006). La concentración final empleada fue de 0.2  $\mu$ M por 12 horas sobre capas preformadas (80-90% de confluencia) de las CTM.

Células de la Población I y II se sembraron en tres grupos diferentes: I) Cultivos estándar: En ausencia de CTM; II) Cultivos con contacto: En presencia de CTM y III) Cultivos sin contacto: En presencia de CTM pero separada de las



mismas por una membrana con un poro de  $0.2\mu$ , para permitir el flujo de proteínas y factores solubles, pero impidiendo el contacto célula-célula. Los tres grupos estuvieron en ausencia (Control) y presencia de los cócteles de citocinas empleados anteriormente (Seminal y Mixto II).

La proliferación para la Población I sobre la capa de CTM no resultó significativamente diferente en comparación con el grupo estándar en los cócteles Seminal y Mixto II, en ninguna de las dos variantes (Gráfica 11). En ausencia de citocinas, la presencia de CTM, con contacto o sin él, es suficiente para mantener la proliferación de ambas poblaciones (Gráficas 11 y 12). Para la Población II, sólo para el cóctel Seminal hubo mayor proliferación de manera significativa en presencia de CTM donde se permitió el contacto (Gráfica 12).

Al analizar la expansión de las CPH medidas por la presencia de UFC en presencia de CTM, se encontraron sólo algunas variaciones en los resultados observados en los cultivos estándar (Cuadros 20 y 21). Para la ambas poblaciones, en ausencia de citocinas y en presencia de CTM, hubo menor UFC que al día cero, pero en número mayor en relación con las condiciones estándar. Para la Población I, la expansión de progenitores se modificó por la presencia de las CTM, aunque no significativamente (Cuadro 20): existió una disminución en el número de UFC-totales en presencia de CTM para el cóctel Seminal después del día 14 de cultivo, mientras que en el cóctel Mixto II aunque se generaron mayor número de UFC en comparación con sus respectivos controles, no existió diferencia entre grupos. Para la Población II, hubo una tendencia a generarse mayor número de UFC en presencia de CTM permitiendo el contacto pero sólo fue significativa para el cóctel Seminal en determinados días (Cuadro 21). Nuevamente, el tipo de progenitores generados son principalmente de linaje mieloide para ambas poblaciones (Gráfica 13), aunque para la Población II se mantuvo un número elevado de UFC-Eritroides en presencia de CTM, aún en días tardíos (Gráfica 13B).

Al analizar al antígeno CD34 sobre las células generadas en cultivo en presencia de CTM, existió una tendencia a mantenerse e incrementarse el número de células CD34+ con respecto al día cero, pero no hubo diferencia significativa en comparación con el grupo en condiciones estándar, ni con respecto a la ausencia de contacto con las CTM (Gráfica 14). Para la

Población I, los linajes celulares generados no difirieron de los obtenidos en condiciones estándar (Cuadro 22), aunque hubo mayor generación de linaje monomacrofágico y menor de células eritroides al día 21 de cultivo para los grupos en presencia de CTM en presencia de citocinas. En ausencia de citocinas, no se obtuvieron suficientes células para evaluar la morfología para ninguna de las dos poblaciones ni condiciones analizadas. En la Población II, la generación de los diferentes linajes se vio afectada por la presencia de de CTM con respecto al grupo de cultivo estándar (Cuadro 23). En el cóctel Seminal en presencia de CTM con contacto se mantuvo la generación de células eritroides, aún y cuando en condiciones estándar disminuyó este linaje conforme avanzó el tiempo de cultivo; en presencia de la capa de CTM pero sin permitir el contacto, el porcentaje de células eritroides también disminuyó paulatinamente de la población madura. Para el cóctel Mixto II, no existió diferencia entre el porcentaje de células de los diferentes linajes obtenidos, si bien una tendencia a generarse mayor número de células monomacrófagicas en presencia de CTM, independientemente del contacto.

### Discusión

La utilización de capa estromal en los cultivos de CPH de SCU para expandir su número ha sido objeto de controversia. Debido a que estas células se encuentran en circulación en etapa fetal, y no han tenido interacción estrecha con un microambiente medular, sitio que será su lugar de residencia después del nacimiento, la adición de factores de crecimiento en cultivos líquidos al parecer, es suficiente para alcanzar altos niveles de proliferación y expansión (Piacibello et al, 1997; De Felice et al, 1999; Cacoullos et al, 2002).

Para cultivos de CPH provenientes de MO normal, se considera que la presencia de una capa estromal es necesaria para conseguir la expansión de estas células, así como su diferenciación (Aiuti, 1998). Sin embargo, también se ha documentado que la presencia de una capa estromal no sólo no es necesaria, sino que incluso puede inhibir la proliferación de las CPH de MO y CICLP (Verfaillie, 1992; Verfaillie et al, 1996).

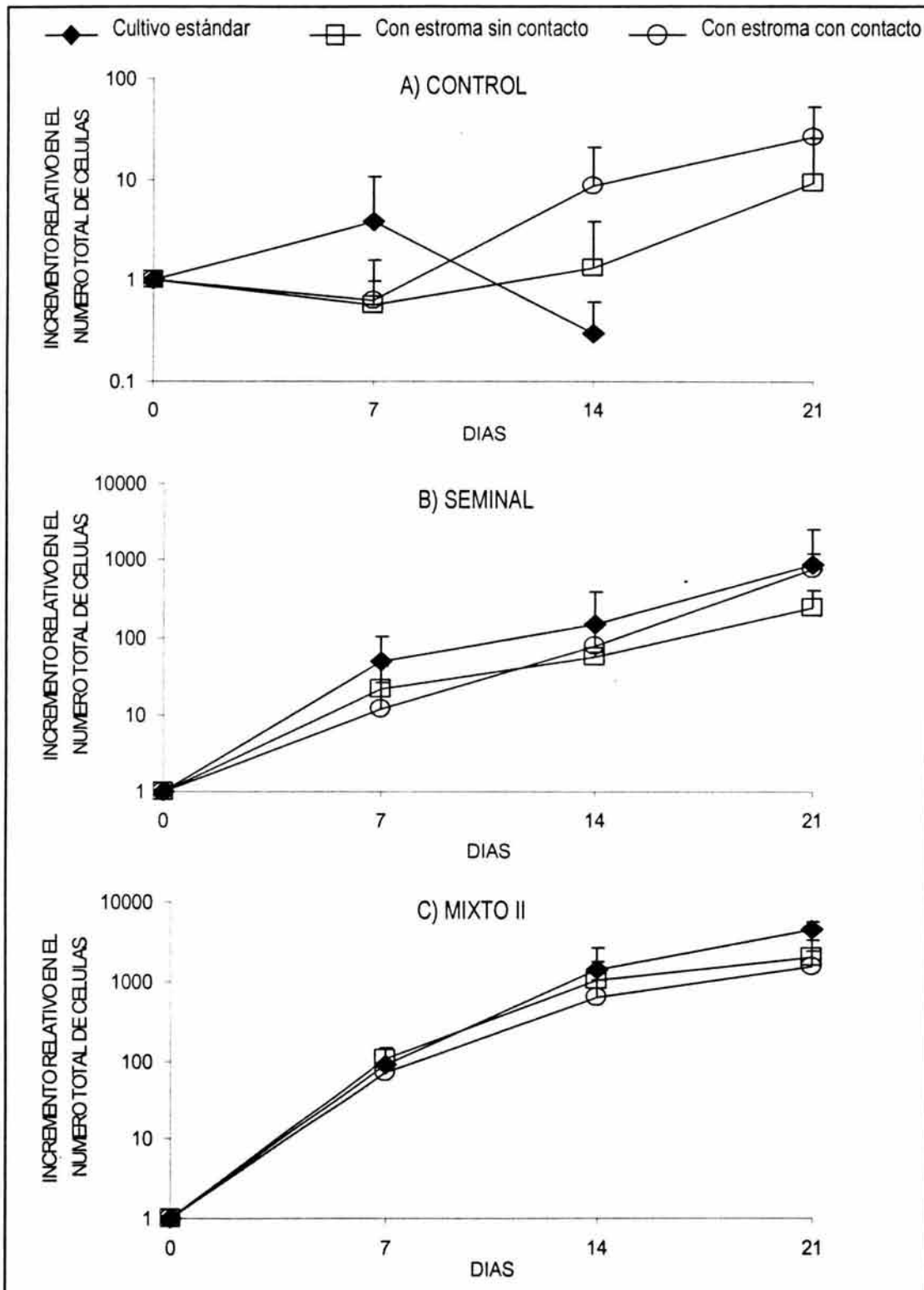
En esta parte del trabajo se empleó una capa de células troncales mesenquimales, que si bien se considera precursora de varios linajes que componen el estroma de la MO, no presentaba al momento del cocultivo tal

heterogeneidad. Así, por los resultados obtenidos en nuestro trabajo, pensamos que la interacción célula-célula aportada por las CTM a CPH de SCU no es indispensable para su expansión y/o mantenimiento *in vitro*, siempre y cuando se añadan citocinas recombinantes que eviten la muerte celular. Esto se puede observar en aquellos cultivos donde no se añadieron cócteles de citocinas, la sola presencia de la capa de CTM fue suficiente para retrasar la pérdida de las CPH sembradas al día cero. Se ha documentado que las CTM de MO normal son capaces de producir diferentes factores de crecimiento reguladores de la hematopoyesis, como IL-6, IL11, LIF, M-CSF, GM-CSF, SCF, FL, Tpo (Zhu et al, 2003; Majumdar et al, 2000; Flores-Figueroa, 2006). Sin embargo, por sí misma las cantidades de citocinas aportadas por las CTM así como las interacciones celulares no fueron suficientes para exponer el potencial de proliferación y expansión de las CPH de SCU observado en cultivos estándar en presencia de las citocinas.

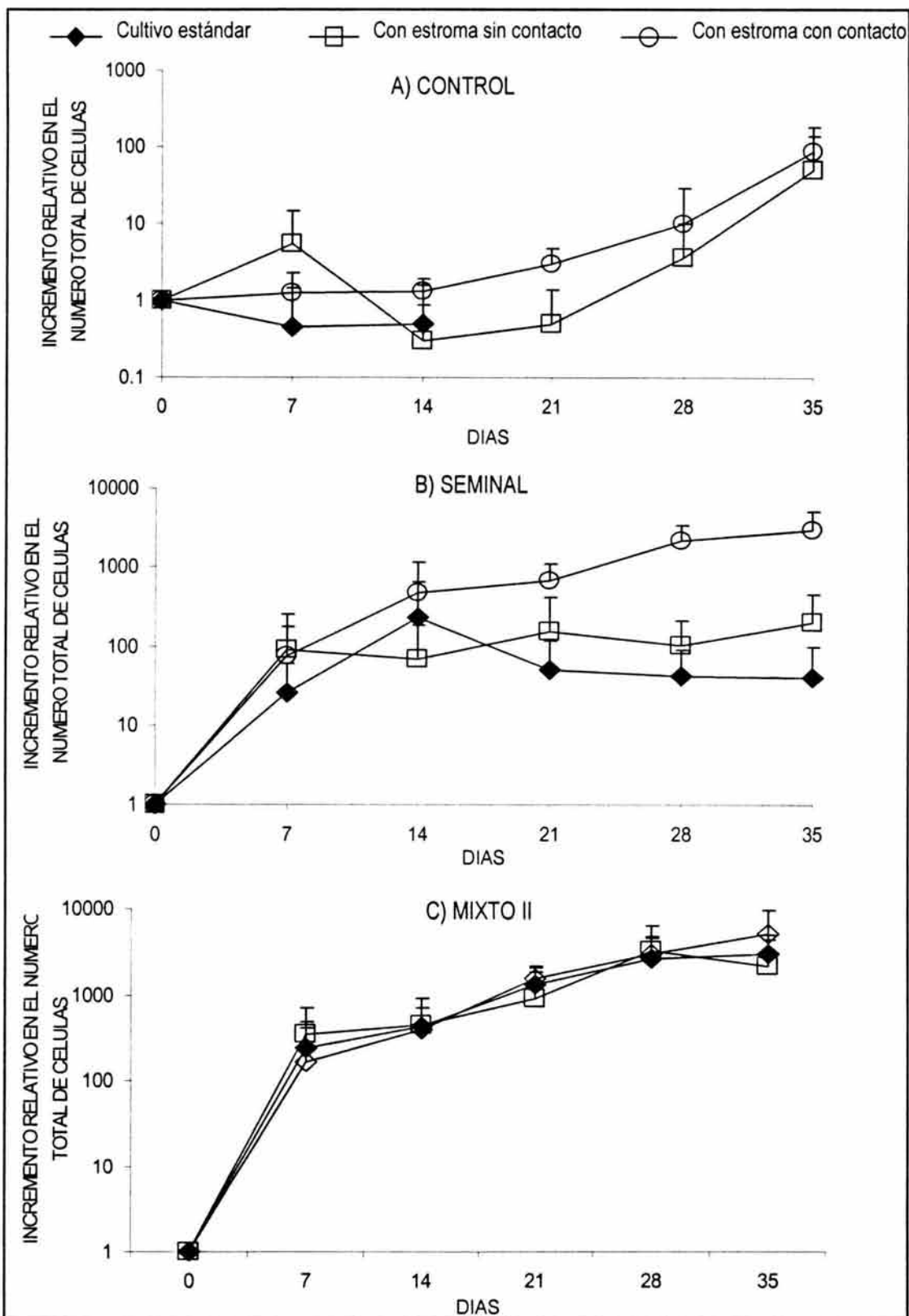
En los cultivos donde se añadieron las combinaciones de citocinas Seminal y Mixto II, aunque encontramos una tendencia a incrementarse el número de colonias totales en presencia de las CTM, de manera independiente al tipo de población utilizada, este incremento no fue significativo. Estos últimos datos fueron contradictorios al compararlos con algunos artículos donde el cultivo de CPH de SCU en presencia de células estromales de MO o células endoteliales de vena de cordón umbilical resulta en un incremento significativo de las primeras tanto a nivel de proliferación como de expansión (Yamaguchi et al, 2001; Rafii, 1994, Yoo et al, 2003). Este comportamiento sugiere que en nuestro sistema, la combinación de citocinas recombinantes empleada puede estimular a las Poblaciones I y II lo suficiente para alcanzar su tasa máxima de proliferación y expansión. Otra posibilidad (no excluyente de la anterior) es que la población estromal de MO contiene grupos celulares no presentes en las CTM de nuestros cultivos, que sean necesarias para mantener la población de CPH por aporte no sólo de interacciones celulares sino también con citocinas; esta alternativa explicaría la tendencia a generarse mayor número durante más tiempo en presencia de una capa estromal, ya sea con contacto como sin él.

En base a los resultados obtenidos, se sugiere que la capa de CTM podría ser importante para el mantenimiento, pero no es indispensable para alcanzar la tasa máxima de proliferación de las CPH de SCU.

Gráficas y cuadros sección 6.3



Gráfica 11: Proliferación de la Población I de SCU en presencia de los cócteles de citocinas (estándar), y/o en presencia de CTM de MO. Se gráfico el promedio  $\pm$  desviación estándar de 4 muestras trabajadas por separado. Se encontró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre cada cóctel de citocinas (Control vs Seminal vs Mixto II), pero no entre la presencia o ausencia de CTM.



Gráfica 12: Proliferación de la Población II en presencia de los cócteles de citocinas (estándar), y/o en presencia de CTM de MO. Se gráfico el promedio  $\pm$  desviación estándar de 5 muestras trabajadas por separado. Se encontró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre cada cóctel de citocinas (Control vs Seminal vs Mixto II) y para Seminal estándar con respecto a la presencia de las CTM.

Cuadro 20. UFC totales de la Población I en ausencia o presencia de CTM de MO normal.

Combinación de Citocinas	Día de Cultivo	Condición de Cultivo		
		Cultivos Estándar	Cultivos sobre CTM	
			Sin contacto	Con contacto
Control	7	0.4 ± 0.8	0.1 ± 0.1*	0.2 ± 0.3*
	14	0.005 ± 0.01*	0.2 ± 0.4	0.8 ± 0.8
	21	0.0	0.2 ± 0.4	0.8 ± 0.9
Seminal	7	17.7 ± 22.6	5.4 ± 5.3	3.1 ± 2.3*
	14	33.9 ± 62.9	12.0 ± 4.2**	15.6 ± 4.8**
	21	32.1 ± 52.2	14.2 ± 3.6**	57.3 ± 58.9
Mixto II	7	13.6 ± 9.4**	10.9 ± 6.5*	10.6 ± 8.9*
	14	18.9 ± 16.4	22.1 ± 19.8*	59.3 ± 45.3*
	21	21.8 ± 23.7	17.2 ± 14.0*	35.3 ± 46.7

Células de la Población I cultivadas en presencia y/o ausencia de CTM y diferentes combinaciones de citocinas fueron analizadas en su capacidad para formar colonias sobre capas de metilcelulosa. Los resultados se muestran en promedio ± desviación estándar (n= 4), en incremento en veces (IV) con respecto a las UFC obtenidas al día cero de cultivo las cuales fueron 14200 ± 5468 por cada 100,000 células cultivadas.

\*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra su respectivo control (p < 0.05).

♦: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra su similar en condiciones estándar (p < 0.05).



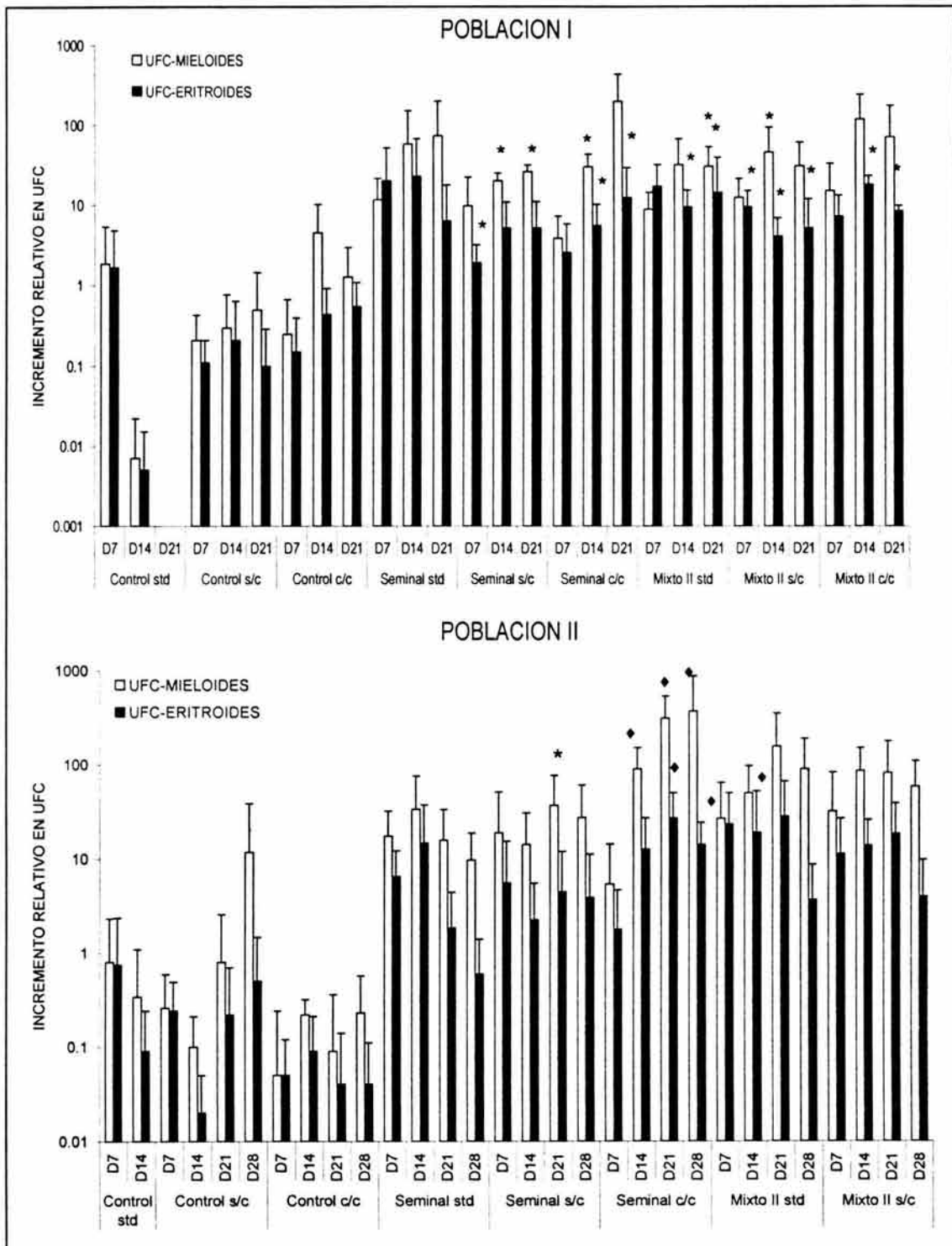
Cuadro 21. UFC totales de la Población II en ausencia o presencia de CTM de médula ósea normal.

Combinación de Citocinas	Día de Cultivo	Cultivos Estándar	Condición de Cultivo	
			Cultivos sobre CTM	
			Sin contacto	Con contacto
Control	7	0.7 ± 1.6	0.2 ± 0.3	0.06 ± 0.08
	14	0.1 ± 0.3	0.06 ± 0.07	0.1 ± 0.1
	21	0.001 ± 0.001	0.6 ± 1.2	0.05 ± 0.09
	28	0.0	7.2 ± 16.2	0.1 ± 0.1
	35	0.0	0.001 ± 0.003	0.1 ± 0.1
Seminal	7	9.1 ± 6.5*	11.8 ± 20.2	3.3 ± 5.7
	14	23.0 ± 31.9	8.1 ± 9.3	48.9 ± 34.5*♦
	21	8.0 ± 7.7*	20.0 ± 24.2	160.5 ± 115.2*♦
	28	3.5 ± 3.9	16.6 ± 23.0	275.9 ± 301.3
	35	8.4 ± 15.7	6.9 ± 7.9	232.5 ± 145.2*♦
Mixto II	7	25.6 ± 21.5	7.5 ± 11.9	19.7 ± 19.5*
	14	28.1 ± 43.6	15.1 ± 14.4*	37.9 ± 40.4
	21	119.7 ± 165.6	22.0 ± 25.4	193.4 ± 207.1
	28	43.1 ± 50.3	43.6 ± 37.9	66.0 ± 76.1
	35	21.1 ± 11.2*	14.2 ± 19.3	45.7 ± 53.9

Células de la Población II cultivadas en presencia y/o ausencia de CTM y diferentes combinaciones de citocinas fueron analizadas en su capacidad para formar colonias. Los resultados se muestran en promedio ± desviación estándar (n= 5), en incremento en veces (IV) con respecto a las UFC obtenidas al día cero de cultivo las cuales fueron 6913.2 ± 5695.9 por cada 100,000 células cultivadas.

\*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra su respectivo control (p < 0.05).

♦: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra su similar en condiciones estándar (p < 0.05).



Gráfica 13: Expansión de progenitores mieloides y eritroides en ausencia o presencia de CTM en ambas poblaciones. Las gráficas representan el incremento en veces con respecto a las UFC-M y – E presentes al inicio del cultivo, las cuales fueron  $6175 \pm 1961.92$  y  $7850 \pm 3731.39$ , respectivamente para la Población I. Para la Población II, las UFC-M y –E al inicio del cultivo fueron  $2926 \pm 2037.2$  /  $3713.3 \pm 3711.6$ , respectivamente.

\*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra su respectivo control ( $p < 0.05$ ).

◆: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra su similar en condiciones estándar.

Cuadro 22: Análisis Morfológico en la Población I cultivada en ausencia o presencia de CTM de médula ósea normal.

Cóctel	Tipo celular o linaje.	Cultivos sobre CTM												
		Cultivos estándar				Sin contacto				Con contacto				
		Día 14 (%)	Día 21 (%)	Día 14 (%)	Día 21 (%)	Día 14 (%)	Día 21 (%)	Día 14 (%)	Día 21 (%)	Día 14 (%)	Día 21 (%)	Día 14 (%)	Día 21 (%)	
Seminal	Blastos	1.2 ± 2.1	0.0	1.4 ± 1.1	0.5 ± 0.8	1.1 ± 1.3	0.7 ± 0.7							
	Mieloide	51.0 ± 14.7	61.5 ± 2.1	53.1 ± 4.9	43.6 ± 20.0	61.2 ± 17.3	50.4 ± 15.3							
	Monocitos/ macrofagos	32.7 ± 15.3	19.8 ± 0.2	39.2 ± 4.2	47.6 ± 21.9	27.3 ± 15.4	37.1 ± 11.8							
	Eritroide	14.8 ± 4.2	18.0 ± 1.4	6.0 ± 2.7	8.0 ± 3.8	9.7 ± 5.3	10.8 ± 4.9							
	Megacariocitos	0.1 ± 0.1	0.6 ± 0.4	0.1 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.4 ± 0.7	0.8 ± 0.9							
Mixto II	Blastos	1.0 ± 1.4	0.4 ± 0.3	0.7 ± 0.5	0.6 ± 0.6	0.6 ± 0.7	0.0							
	Mieloide	41.5 ± 11.7	34.5 ± 19.1	47.7 ± 19.3	46.1 ± 15.9	42.2 ± 19.4	44.3 ± 20.2							
	Monocitos/ macrofagos	18.0 ± 6.3	17.3 ± 9.9	17.6 ± 7.3	24.2 ± 13.1	19.3 ± 6.3	21.0 ± 14.8							
	Eritroide	38.6 ± 8.8	46.6 ± 9.9	33.3 ± 20.2	28.2 ± 13.6	37.3 ± 19.7	34.3 ± 18.2							
	Megacariocitos	0.8 ± 0.5	1.1 ± 0.2	0.4 ± 0.4	0.4 ± 0.3	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.5							

Células obtenidas de las diferentes condiciones de cultivo, se tiñeron con Wright-Giemsa y se observaron en un microscopio óptico a 400x. Los datos se muestran en promedio ± desviación estándar de 3 a 4 muestras analizadas en cada caso y están dados en porcentaje (%).

Cuadro 23: Análisis Morfológico en la Población II cultivada en ausencia o presencia de CTM de médula ósea normal.

Cóctel	Tipo celular o linaje.	Cultivos sobre CTM																	
		Cultivos estándar						Sin contacto						Con contacto					
		Día 14 (%)	Día 21 (%)	Día 28 (%)	Día 14 (%)	Día 21 (%)	Día 28 (%)	Día 14 (%)	Día 21 (%)	Día 28 (%)	Día 14 (%)	Día 21 (%)	Día 28 (%)						
Seminal	Blastos	2.8 ± 3.0	0.5 ± 0.7	0.0	1.2 ± 0.9	0.0	0.0	1.2 ± 1.0	0.7 ± 1.1	0.3 ± 0.5									
	Mieloide	50.5 ± 12.0	54.9 ± 12.8	34.5 ± 9.1	33.4 ± 2.6	22.0 ± 10.5	36.1 ± 13.9	31.2 ± 21.9	38.1 ± 19.2	31.1 ± 7.6									
	Monocitos/ macrofagos	21.3 ± 13.2	34.6 ± 3.6	60.5 ± 2.1	44.3 ± 17.2	50.5 ± 27.4	50.1 ± 17.2	26.1 ± 12.7	19.6 ± 8.9	21.7 ± 13.5									
	Eritroide	24.3 ± 0.4	8.2 ± 80.1	3.5 ± 4.9	20.3 ± 17.6	27.4 ± 29.3	13.1 ± 2.5	40.8 ± 29.5	41.0 ± 23.2	46.0 ± 18.7									
	Megacariocitos	1.0 ± 1.4	1.7 ± 0.3	1.5 ± 2.1	0.6 ± 0.3	0.0	0.5 ± 0.7	0.5 ± 0.6	0.3 ± 0.2	1.08 ± 0.3									
Mixto II	Blastos	1.3 ± 1.7	0.0	0.0	0.7 ± 1.1	0.2 ± 0.4	0.0	0.2 ± 0.1	0.0	0.0									
	Mieloide	32.6 ± 2.6	42.9 ± 18.0	27.2 ± 9.6	39.7 ± 22.6	39.3 ± 13.3	42.4 ± 10.4	45.2 ± 15.1	50.5 ± 14.8	37.6 ± 11.8									
	Monocitos/ macrofagos	26.3 ± 0.6	29.1 ± 10.4	37.7 ± 17.8	23.3 ± 14.5	31.3 ± 12.3	33.7 ± 17.2	22.9 ± 10.0	23.2 ± 10.5	31.0 ± 14.3									
	Eritroide	39.4 ± 2.4	27.5 ± 13.6	32.3 ± 18.6	36.6 ± 28.2	28.5 ± 19.0	23.3 ± 13.3	31.0 ± 17.4	28.7 ± 18.1	30.3 ± 9.2									
	Megacariocitos	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.4	0.5 ± 0.4	0.3 ± 0.3	0.5 ± 0.5	0.4 ± 0.4	0.5 ± 0.5	0.5 ± 0.1	1.0 ± 0.3									

Células obtenidas de las diferentes condiciones de cultivo, se tiñeron con Wright-Giemsa y se observaron en un microscopio óptico a 400x. Los datos se muestran en promedio ± desviación estándar de 3 a 4 muestras analizadas en cada caso y están dados en porcentaje (%).

#### **6.4. Desarrollo de la población celular en cultivo ante la remoción continúa de células maduras (Lin+).**

El cultivo de las CTH/CPH genera células maduras, por un proceso de diferenciación. Si existió la expansión, como se ha definido previamente (Flores-Guzmán, 2002) entonces dentro de las poblaciones generadas, existirán una alta proporción de células con características semejantes a las originales. Pero las más, serán células precursoras o maduras, de acuerdo con el esquema de amplificación de la hematopoyesis. Para reconocer las cinéticas de proliferación, expansión y diferenciación de las nuevas CPH generadas en los cultivos, se realizaron enriquecimientos secundarios de igual forma que al día cero, a diferentes tiempos en el cultivo (días 7, 14 y 21 de cultivo). El tipo de cultivo empleado en esta parte del trabajo fue similar al usado en los ensayos anteriores, con la variante de la exclusión de Epo del cóctel de citocinas Mixto II, única combinación empleada en esta parte.

En el cuadro 24 se muestra el porcentaje de recuperación y el contenido de CPH después de cada enriquecimiento para la Población I (n=7). Los porcentajes de recuperación se incrementaron significativamente a partir de la 2da. Columna (realizada al día 7 del cultivo), el cual fue el pico máximo de recuperación (Cuadro 24). Un comportamiento similar se observa en la formación de colonias totales, aunque existió una disminución considerable en células CD34+ conforme se incrementaba el número de selecciones.

Las células obtenidas a partir de cada selección, se cultivaron en presencia del cóctel Mixto II sin Epo, realizándose cambios de medio cada 7 días, como se indica en materiales y métodos. Cada nueva selección fue cultivada de manera independiente para registrar cada cinética. Con cada selección se enriqueció la proporción de CPH en la Población I, sin embargo, las células generadas presentaron una tasa de proliferación inferior a la selección inmediatamente anterior (Gráfica 15A). Existió una diferencia significativa en la cinética de proliferación de las células obtenidas en una tercera y cuarta selección (días 14 y 21, respectivamente) mientras que una segunda selección si bien mostró una tendencia de menor proliferación, esta no fue significativamente distinta con respecto a la realizada al día cero. El pico máximo de proliferación se alcanza entre los siguientes 14 días inmediatos al

enriquecimiento. Al graficar el número de células acumulado, obtenido cuando a cada nueva selección se le sumaron las derivadas de la selección inmediatamente anterior (Gráfica 15B), se observaron dos grupos: Uno conformado por la 1ª y 2ª selección y otro por la 3ª y 4ª selección. Las proliferaciones entre ambos grupos fueron estadísticamente diferentes.

Al igual que la generación de células, la capacidad de formación de colonias disminuyó conforme incrementó el número de selecciones de manera significativa ( $p < 0.05$ ) tanto analizadas de manera independiente (Cuadro 25) como acumulada (Cuadro 26). Nuevamente, los progenitores principales que se obtuvieron fueron de tipo mielóide, si bien fue posible observar progenitores eritroides aún al día 28 de cultivo (Gráfica 16, 3ª selección) a pesar de no adicionar Epo en el cóctel de citocinas. Al analizar la morfología de las células obtenidas después de cada selección, así como las generadas en los cultivos de las mismas, se encontró que excepto la 1ª selección, donde el porcentaje de blastos fue arriba del 50% ( $50.60 \pm 11.3$ , para este grupo de muestras) para las posteriores recuperaciones, no excedieron el 10% (Cuadro 27). Morfológicamente se designó como blastos a células primitivas cuyas características bajo el microscopio no permitiera discernir a que linaje se dirigían; sin embargo, dentro de los linajes definidos se incluyeron células precursoras muy primitivas, consideradas en algunos manuales como blastos de algún linaje en particular. Por otra parte, la capacidad para generar los linajes estudiados no cambia entre las selecciones, aunque para el 4<sup>to</sup> enriquecimiento se encontró una tendencia a obtener poblaciones claramente maduras desde el día en que se realizó la selección.

Los datos obtenidos de esta parte indican que a pesar de conseguir porcentajes elevados de células postcolumna a los diferentes días de cultivo de la misma manera que al día cero, las células obtenidas posteriores a día 7, son funcionalmente distintas.

### Discusión

Al cultivar CTH/CPH, trátense de poblaciones puras o como es el caso presente, enriquecidas, existe una expansión aunque también una generación



de células precursoras y maduras de la sangre, como lo muestran los resultados presentados en los apartados anteriores. El enriquecer las poblaciones generadas *in vitro* a diferentes días de cultivo nos permitió analizar de manera separada la proliferación, expansión y diferenciación de las CPH generadas en nuestras condiciones de cultivo, que en los ensayos anteriores se englobaron en la respuesta total de la Población I a los diferentes días de cultivo.

Se encontró que al eliminar las células maduras por selecciones secundarias, la proliferación de la Población I se incremento sin afectar su capacidad de diferenciación hacia los linajes analizados. Sin embargo, conforme avanza el tiempo de cultivo, la capacidad de proliferación y el contenido de CPH disminuyen. En un modelo semejante, pero de células hematopoyéticas provenientes de SPM, al realizar nuevas selecciones positivas en base al antígeno CD34, encuentran una expansión reducida en comparación con los cultivos estándar, si bien los autores no mencionan porcentajes de recuperación entre cada selección (Engelhardt et al, 1997). Una explicación para la baja en la proliferación es la liberación de citocinas inhibitorias por parte de las células maduras (Gilmore et al, 2000). En un trabajo recientemente publicado, Madlambayan et al (2005), en un sistema muy semejante al nuestro encuentran la liberación de factores inhibitorios de la proliferación como TGF $\beta$  y MIP-1 $\alpha$ ; aunque el efecto de anticuerpos contra estas dos moléculas no altera la proliferación de la población seleccionada (con características semejantes a la Población I definida por nosotros), demuestran la secreción de estos factores. TGF- $\beta$  se ha demostrado que puede inhibir la proliferación y expansión de CTH/CPH, e incluso puede modular la presencia del antígeno CD34 en superficie (Fortunel et al, 1998, Batard et al, 2000). Si bien este efecto es dosis dependiente, es posible que a las concentraciones en las que se encuentra en los cultivos pueda realizar esta función sin afectar la proliferación. De ser así, explicaría en parte las elevadas recuperaciones de células postcolumna, pero que presentan una baja expresión del antígeno CD34. Esta explicación sería aplicable a la 2<sup>a</sup> selección, no así para las subsecuentes. La proliferación y expansión de la 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> selección fue inferior a las dos primeras a pesar de que las células obtenidas de estas últimas

selecciones son negativas para los marcadores de linaje empleados en el cóctel de anticuerpos, pero el número de CPH que contienen es inferior a lo observado en la 1ª y 2ª. Encontramos bajos porcentajes de células CD34+ en la fracciones enriquecidas de la 3ª y 4ª selección. Estos resultados confirman que existe una disociación del inmunofenotipo con la función de las células generadas en cultivo, como se había sugerido en los apartados anteriores.

Tanto las células como las colonias generadas en cada selección, fueron sumadas a la selección inmediatamente previa. Esto obedeció a que si bien cada selección se comporta de manera diferente y técnicamente fue cultivada de manera independiente, todas provenían de la población enriquecida al día cero de cultivo. Al sumar el número de células obtenidas de cada selección (gráficas 15B, 16B y 17B), se encontró que existió un rompimiento del techo de la proliferación encontrado en los cultivos estándar realizados en la Población I, con una sola selección. Se obtuvieron valores de casi 50 veces a los registrados en el cultivo estándar en células nucleadas (cuarta selección día 28,  $56064.74 \pm 47911.77$  incremento en veces con respecto al número de células sembradas al inicio del cultivo) y más de 100 veces en UFC-mieloides ( $2253 \pm 3202$  incremento en veces con respecto a las UFC-Mieloides obtenidas al día cero de cultivo). Estos resultados sugieren que las células en etapa precursora/madura de diferenciación (compartimiento III y IV en el esquema jerárquico hematopoyético) afectan el microambiente, influyendo en la expansión de las CPH, aún y cuando las CPH generadas tengan menor potencial de proliferación y expansión que al día cero de cultivo.

Desde el punto de vista de expansión con fines de aplicación clínica, las condiciones de cultivo de las CPH deberán ser consideradas dentro de los primeros 10 días, pues las CPH al día 7 aún presentan elevado nivel de proliferación y expansión. Con un mayor tiempo en cultivo se verían comprometidas las características de las CPH obtenidas, que las definen como tales. Esta conclusión es compatible con los resultados presentados por el grupo de Madlambayan et al (2005), si bien ellos no analizan las cinéticas de proliferación por tanto tiempo como en nuestro caso.

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo sugieren que la mayoría de las CPH formadas *in vitro* son funcionalmente inferiores a las

obtenidas de células sin cultivar. La pérdida del potencial hematopoyético, sin embargo, es gradual y posiblemente tenga correlación con el número de divisiones de las CPH *in vitro*. Se ha sugerido que si bien las CPH de SCU no varían su capacidad de injerto en ratones NOD-SCID de manera dependiente de su fase en ciclo celular en el que se encuentren al momento de realizar el trasplante, siempre y cuando se trate de células frescas (Wilpsher et al, 2000); sin embargo en células CD34+ de SCU cultivadas se ha observado un incremento en la apoptosis después de más de 4 divisiones, lo que sugiere que quizá éste sea el mecanismo por el cual se controla la progenie de las CPH (Traycoff et al, 1998). Probablemente, el efecto observado en nuestro modelo de selecciones secundarias sea un reflejo del comportamiento *in vivo* visto cuando se realizan trasplantes secundarios en ratones, lo cual ha llevado a suponer una capacidad de injerto de las CPH finita (Lewis et al, 2001).

Finalmente, se sugiere que los resultados obtenidos podrían confirmar la existencia del límite Hayflick, que establece que todas las células somáticas normales presentan un límite intrínseco de número de veces que pueden dividirse; este concepto, compartido con el de "pérdida de potencial hematopoyético", propuesto por Kay (1965), sugiere entonces que la pluripotencialidad de las CTH podría estar inversamente relacionada con el tamaño de la progenie ("pedigrí celular"); así, la hematopoyesis sería mantenida por una sucesión clonal. Esta sugerencia tendría apoyo en los trabajos donde hay una pérdida del potencial proliferativo, asociado a su vez con la pérdida del ADN telomérico en las CPH en cultivo (Morrison, et al, 1995; Vaziri et al, 1994; Young et al, 1996; Engelhardt et al, 1997). Esto llevaría a pensar que existe una maduración progresiva y una pérdida en la capacidad de producción celular como consecuencia de las divisiones celulares que tienen que suceder para observar los eventos de expansión y proliferación, representados bajo nuestras condiciones de cultivo y después de cierto tiempo. Por la evidencia obtenida de los cultivos realizados así como datos en la literatura, donde se incluyen trabajos de trasplantes secundarios en ratones, se sugiere que tanto las CTH como las CPH puedan tener un número máximo de divisiones *in vitro*.

Gráficas y cuadros sección 6.4.

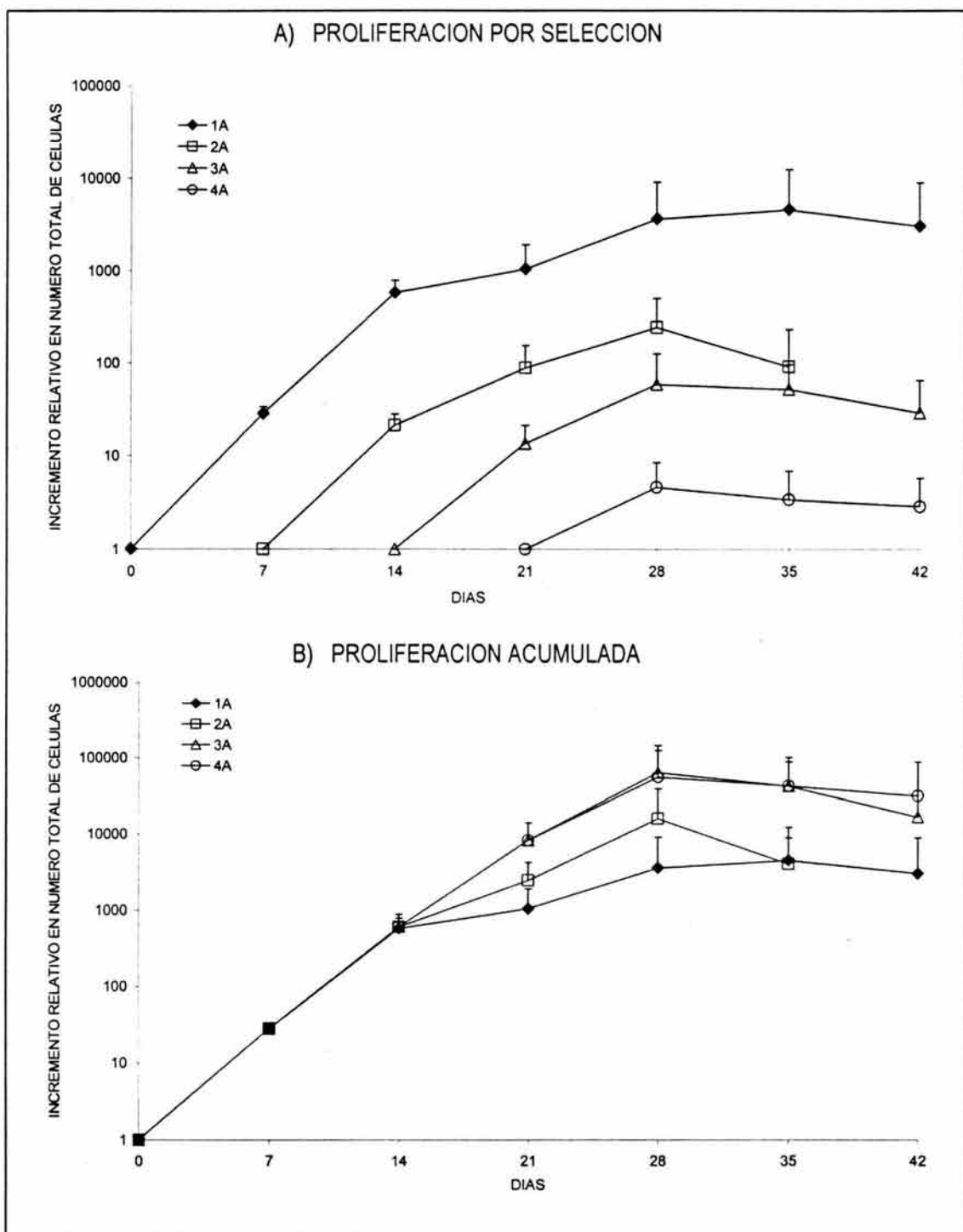
Cuadro 24. Porcentaje de recuperación post-columna, capacidad de formación de colonias y células CD34+ presentes en la Población I, previa y posterior a su enriquecimiento en selecciones secundarias.

Número y día de selección	Recuperación en cada selección del total de células (%)	Previo al enriquecimiento		Posterior al enriquecimiento	
		UCF-Totales (%)	Células CD34+ (%)	UCF-Totales (%)	Células CD34+ (%)
1ª (D0)	2.0 ± 1.2	0.3 ± 0.2	1.3 ± 1.2	11.0 ± 2.6♦	44.5 ± 9.1♦
2ª (D7)	41.7 ± 12.8*	6.3 ± 2.2	2.6 ± 2.4	16.6 ± 10.7*♦	19.2 ± 9.4♦
3ª (D14)	15.7 ± 6.6*	1.2 ± 8.3	1.6 ± 1.2	6.5 ± 3.0*♦	14.6 ± 11.8
4ª (D21)	17.5 ± 7.7*	0.5 ± 0.3	4.0 ± 3.0	3.6 ± 4.2*	9.1 ± 7.6

Células obtenidas previa y posterior a cada selección negativa fueron analizadas en su contenido de UFC y en el número de células CD34, este último parámetro por inmunocitoquímica. Se señala el número de selecciones así como los días (D) a los que se realizaron. Los resultados son el promedio de 7 muestras trabajadas por separado y se presentan ± desviación estándar.

\*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra la primera o segunda selección ( $p < 0.05$ ).

♦: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra la población inmediatamente anterior sin enriquecer ( $p < 0.05$ ).



Gráfica 15. Proliferación de la Población I en un enriquecimiento primario y secundarios (n=7). Los resultados se muestran en cinéticas de proliferación para cada selección (A) y acumulada (B), donde se considera el número de células generadas en la selección inmediatamente anterior y se suma al número de células obtenidas en cada nueva selección. Los resultados se muestran en promedio  $\pm$  desviación estándar del incremento en veces con respecto al número de células sembradas al inicio del cultivo. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre 1<sup>a</sup> - 2<sup>a</sup> vs 3<sup>a</sup> -4<sup>a</sup> selección pero no entre ellas en A.

Cuadro 25. Unidades formadoras de colonias totales medidas a diferentes días de cultivo en la Población I de SCU con selecciones sucesivas.

Día de cultivo	UFC Totales			
	1 <sup>a</sup> IV	2 <sup>a</sup> IV	3 <sup>a</sup> IV	4 <sup>a</sup> IV
Día 0	1 (82.9 ± 67.8)			
Día 7	15.5 ± 6.0	1 (103.5 ± 72.2)		
Día 14	29.5 ± 10.5	3.8 ± 3.2	1 (33.2 ± 22.5)	
Día 21	53.5 ± 47.1	32.0 ± 55.8	2.9 ± 4.1*	1 (5.2 ± 5.0)
Día 28	144.0 ± 216.1	6.0 ± 12.7	7.0 ± 7.2*	6.5 ± 9.9*
Día 35	0.0	0.1 ± 0.2	0.9 ± 1.0*	6.3 ± 14.0*

En células de SCU a las cuales se les eliminó la presencia de células positivas a linaje en varias selecciones negativas, a los diferentes días de cultivo (1<sup>a</sup>, día 7; 2<sup>a</sup>, día 14; 3<sup>a</sup>, día 21; 4<sup>a</sup>, día 28 de cultivo), se analizó su capacidad de formación de colonias. Los resultados se muestran en promedio ± desviación estándar de 7 muestras trabajadas por separado. Los datos se dan en incremento en veces (IV) con respecto a las UFC obtenidas el día de la selección, que se muestran entre paréntesis. Los datos de UFC al día de la selección están dados en número de colonias X10<sup>3</sup>.

\*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra la primera o segunda selección ( $p < 0.05$ ). La diferencia fue en el número de colonias generadas en cada caso, no en el incremento en veces.

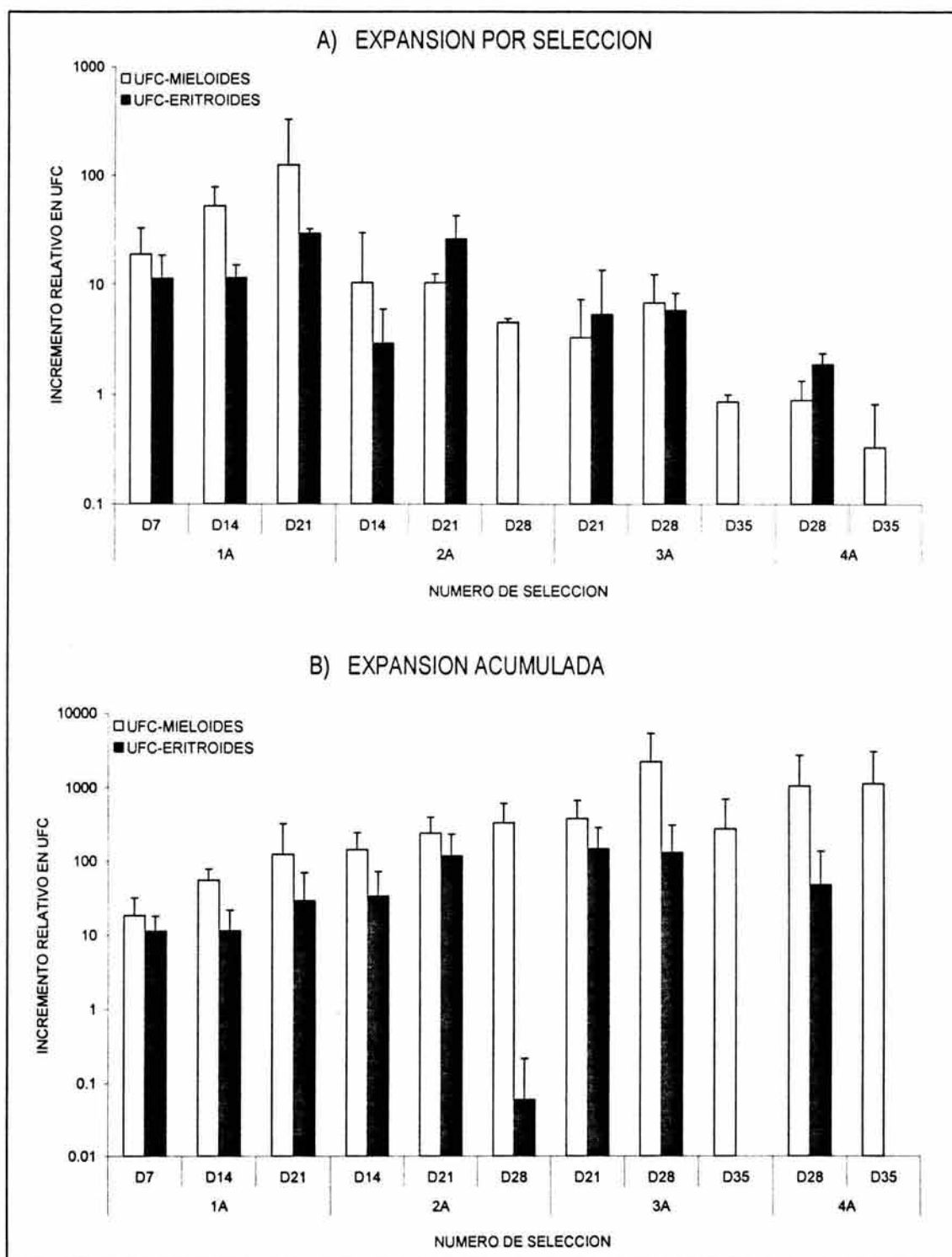


Cuadro 26. Unidades formadoras de colonias totales acumuladas para la Población I de SCU de SCU con selecciones sucesivas.

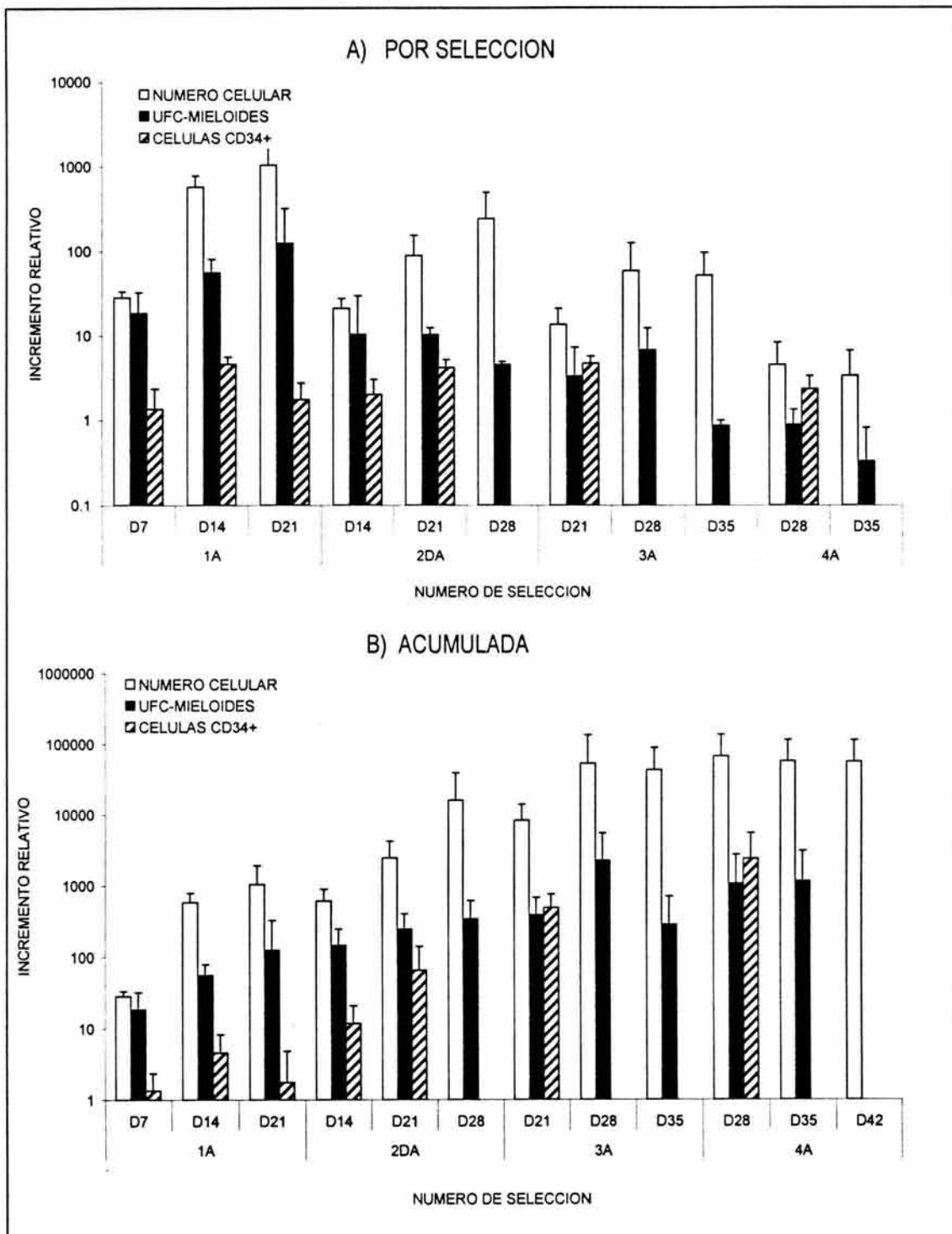
Día de cultivo	UFC Totales			
	1 <sup>a</sup> IV	2 <sup>a</sup> IV	3 <sup>a</sup> IV	4 <sup>a</sup> IV
Día 7	15.53±6.03			
Día 14	29.50±10.57	80.92±69.12		
Día 21	53.51±47.08	173.48±117.73	232.66±221.07*	
Día 28	144.07±216.15	109.23±152.36	956.38±1206.81*	446.06±715.57
Día 35	0	4.64±10.37	147.76±179.44*	454.11±764.24

Células obtenidas en las selecciones sucesivas para eliminar a las células de linaje generadas en el cultivo, fueron analizadas en su capacidad de formación de colonias. Los resultados se muestran en promedio ± desviación estándar de 7 muestras trabajadas por separado, y están dados en incremento en veces con respecto a las UFC obtenidas al día cero de cultivo (primera selección); se considera el número de UFC generadas en la selección inmediatamente anterior y se suma al número de UFC obtenidas en cada nueva selección.

\*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra la primera selección ( $p < 0.05$ ).



Gráfica 16: Expansión de los progenitores mieloides y eritroides en la Población I de SCU tanto con una primera selección como las secundarias. Los datos se muestran en cinéticas de expansión independientes (A) y acumuladas (B). Los resultados se muestran en promedio  $\pm$  desviación estándar de 7 muestras trabajadas por separado. Al igual que los progenitores totales, existió una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre grupos de selecciones: 1<sup>a</sup>-2<sup>a</sup> vs 3<sup>a</sup>-4<sup>a</sup>, tanto en las cinéticas independientes como en la acumulada.



Gráfica 17: Comparación del número de células obtenido, progenitores mieloides y células CD34+ en la Población I de SCU tanto con una primera selección como las secundarias. Los datos se muestran en cinéticas comparativas independientes (A) y acumuladas (B). Los resultados son el promedio  $\pm$  desviación estándar de 7 muestras trabajadas por separado.

Cuadro 27. Morfología de de la Población I a diferentes días de cultivo tanto para una primera selección como las secundarias.

Selección	Día de cultivo	Linaje o Tipo Celular				
		Blastos	Mieloide	Mono/ macrófagos	Eritroide	MegK
1a	7 (n=7)	3.93±1.98	58.55±10.37	23.87±10.00	13.00±5.28	0.62±0.98
	14 (n=6)	1.72±1.02	51.86±9.93	32.55±7.30	4.83±3.68	0.44±0.45
	21 (n=4)	0.77±1.34	49.29±26.77	40.30±21.75	6.71±7.07	0.06±0.10
2da	7 (n=7)	9.58±4.97	63.26±10.42	17.8±5.29	9.12±4.6	0.20±0.30
	14 (n=6)	2.18±2.07	52.46±15.04	33.61±14.63	11.23±6.37	0.53±0.61
	21 (n=6)	1.01±1.57	36.77±17.74	53.66±15.26	7.15±5.22	1.36±1.63
3a	14 (n=6)	5.93±4.08	71.44±9.78	15.54±3.26	5.70±3.65	0.35±0.42
	21 (n=5)	0.72±0.49	52.59±26.31	38.42±26.80	7.89±3.40	0.33±0.40
	28 (n=3)	0	45.93±17.99	33.30±0.97	7.00±0.02	0.82±0.70
4a	21 (n=5)	7.00±6.54	52.27±30.07	28.35±25.47	10.76±9.35	1.62±1.20
	28 (n=3)	3.50 ±0.70	60.66±10.83	18.82±0.71	16.00±11.32	1.00±0.47

Células obtenidas de las diferentes selecciones, se tiñeron con Wright-Giemsa y se observaron en un microscopio óptico a 400x. Los datos se muestran en promedio ± desviación estándar de las muestras señaladas en cada caso y son dados en porcentaje (%).

I

## VII. DISCUSION GENERAL.

La expansión de las CTH de SCU *in vitro* con el fin de emplearlas en trasplantes para adultos es uno de los principales objetivos de la investigación sobre la biología de estas células. Si bien los resultados hasta ahora son alentadores, en la clínica no se han mostrado ventajas en el empleo de células expandidas (Devine et al, 2003; Hough et al, 2004). Gracias a los numerosos trabajos realizados sobre la expansión de SCU, existe la certeza que las células mantenidas durante largos periodos de tiempo pierden sus características de CPH, llegando a una diferenciación terminal de las mismas. Es por ello que el estudio de su biología permitirá el diseño de sistemas más adecuados para su selección y expansión con fines de aplicación clínica.

Con este objetivo, en el presente trabajo se analizaron dos poblaciones obtenidas por la eliminación de células linaje positivo, a partir de CMN de SCU. Se realizó un enriquecimiento y no una purificación en base a la molécula CD34 como la gran mayoría de los protocolos en la literatura. Al contrario de otros trabajos en los que se realiza una selección positiva, donde la proporción de células progenitoras definidas por el antígeno CD34 es del 85 al 98%, (Piacibello et al, 1998; Ramsfjell et al, 1999; Su et al, 2002) el porcentaje de CTH/CPH obtenido por el sistema empleado en el presente trabajo fue entre 40% y 70% en ambas poblaciones analizadas. A pesar de ello, la actividad funcional medida al día cero por ensayos de UFC se encontró dentro de los rangos reportados para CPH obtenidas por una selección positiva. Los resultados obtenidos de las cinéticas de proliferación y expansión también se encontraron dentro del rango documentado en la literatura. Se demostró que las células cultivadas son capaces de diferenciarse a los diversos linajes analizados y que las mismas células linaje positivas que se generan, afectan la autorenovación de las células más indiferenciadas en los cultivos. Además, las poblaciones analizadas resultaron diferentes entre sí, no sólo en el número obtenido de cada una de ellas en la selección, sino también a nivel funcional, resultando una más inmadura con respecto a la otra (Población II con respecto a la Población I). Esto se hace evidente también por diferencias en la dependencia a citocinas y/o estímulos célula-célula, que en el caso de la Población II, es más elevada.

El obtener poblaciones celulares enriquecidas en células Lin<sup>-</sup>, presenta diversas ventajas con respecto a los sistemas donde se purifica con respecto al antígeno CD34. Entre ellas, se considera la ausencia de un anticuerpo dirigido contra CD34, que en los trabajos publicados donde se usa un sistema de selección positiva para obtener a las CPH, no se separa del antígeno que reconoce. Aunque no se ha documentado si presencia del anticuerpo unido al antígeno CD34 interfiere con la expansión y proliferación *in vitro* de las CPH obtenidas por selección positiva, un efecto sobre las células que lo presentan no se descarta. Además, el antígeno CD34 se pierde durante la maduración de las células sanguíneas; sin embargo, durante algunas etapas de este proceso, las células son CD34+Lin<sup>+</sup>. Si únicamente se realiza una purificación en base al antígeno CD34 para expansión a nivel clínico, la gran mayoría de las células con la que se iniciaría los cultivos serían células CD34+Lin<sup>+</sup>. Entonces, para conseguir poblaciones CD34+Lin<sup>-</sup> mediante un sistema de selección positiva, se tendrían que adicionar nuevos anticuerpos contra marcadores de linaje, lo cual repercutiría en el tiempo de selección y en los costos del procedimiento, incrementando la manipulación de las CPH y su exposición a una eventual contaminación. La selección negativa presenta una ventaja biológica adicional: en la población seleccionada se mantienen no sólo a las CPH (CD34+Lin<sup>-</sup>) sino también incluye a células CD34-Lin<sup>-</sup>. Aunque la polémica sobre la presencia del antígeno CD34 en superficie de las verdaderas CTH continúe, un acercamiento factible para obtener la totalidad de estas células presentes en SCU es por la eliminación de células Lin<sup>+</sup>.

Además del sistema de selección empleado para evaluar la capacidad de proliferación, expansión y diferenciación de las poblaciones obtenidas de SCU, nuestro modelo de cultivo permitió analizar la importancia de la concentración de citocinas empleada en el mismo. La mayoría de los trabajos en la literatura donde se han reportado los valores más elevados en proliferación y expansión, emplean concentraciones de citocinas entre 50 y 100 ng/ml (específicamente de SCF y Tpo) (Piacibello et al, 1998). El empleo de elevadas concentraciones de factores de crecimiento no sólo repercute en los costos del sistema de cultivo con fines terapéuticos, sino en la rápida diferenciación de las células cultivadas. La optimización de las condiciones de



cultivo depende de cada grupo de investigación; sin embargo, recientemente se publicó un sistema de cultivo empleando CMN de SCU, donde las concentraciones óptimas de citocinas resultan ser muy semejantes a las empleadas por nosotros (rango de 1.5 a 15 ng/ ml, dependiendo de la citocina empleada) (Yao et al, 2004). Esto sugiere que una concentración elevada de citocinas puede no ser necesaria para la expansión y diferenciación de las CTH/CPH de SCU.

El proceso de comprometimiento y diferenciación hematopoyética no es lineal, a pesar del modelo jerárquico (Figura 4A). Este modelo agrupa a las células hematopoyéticas en diferentes compartimientos, pero el paso entre ellos no está sincronizado en tiempo y espacio, pudiendo existir un intercambio entre ellos. La existencia de los compartimientos se demuestra al enriquecer cada población celular (CMN vs Población I vs Población II), en las cinéticas de proliferación y expansión. Sin embargo, dado las propias limitantes del sistema, no se define la evolución de una población en otra o de un compartimiento en otro (Población II → Población I → CMN). Lo que existe es la inmersión de una población en otra: Población II  $\subset$  Población I  $\subset$  CMN, con el respectivo traslape de las cinéticas.

Existe discrepancia al cultivar las células de SCU con fines de expandirlas para su uso en la clínica, sobre el tipo de células con las que se debe iniciar dicho cultivo (Fietz et al, 1999; Yao et al, 2004). Por los resultados obtenidos, nos atrevemos a sugerir que deberían iniciarse con poblaciones enriquecidas en células CPH, pues las células maduras si bien condicionan el medio con factores necesarios para la regulación de las células más inmaduras, también lo hacen con factores inhibitorios (Janowska-Wieczorek, 2001; Majumdar, 2000).

En el establecimiento de cultivos con fines de expansión clínica, es importante considerar la interrelación que ocurre entre los compartimientos hematopoyéticos *in vitro*. Es decir, a pesar de tener poblaciones definidas como Lin<sup>-</sup>, existen células prontas a ser Lin<sup>+</sup>, que son las primeras en diferenciarse, seguidas de poblaciones celulares que quizá requieran de dos divisiones o más para hacerlo. Se demostró una expansión en base a la presencia del antígeno CD34 y UFC de ambas poblaciones, pero no resulta claro si las nuevas células

definidas en base a estas características son resultado de la expansión en el cultivo o lo son de una expresión tardía de su potencialidad. El sistema empleado no permite discernir al respecto. La posibilidad de rastrear a las subpoblaciones dentro de la Población I en base a otros antígenos permitiría su análisis, para conocer su estatus en el ciclo celular, comprometimiento y maduración, y en un determinado momento, la competencia que establezcan una con otra.

Se sugiere realizar estudios más específicos para determinar si existe una expansión real o si sólo es un reflejo de diversos estadios de comprometimiento y maduración expresados a diferentes tiempos en cultivo. Creemos que ensayos de CICLP y de CRS de ambas poblaciones nos permitirá comparar nuestros resultados con aquellos realizados con células purificadas y analizar si existe un traslape de los compartimientos en nuestras poblaciones enriquecidas. Así, si bien es posible que la Población II sea capaz de traslapar en algún momento en cultivo las cinéticas de la Población I, no necesariamente se generarían células con potencialidad semejante a la vistas en la Población I desde el día cero.

Si bien no creemos contar con la información suficiente para esclarecer con precisión como se regulan los procesos de proliferación y expansión en nuestras poblaciones, los resultados obtenidos, sumados a datos en la literatura nos permiten acoplarnos al concepto de modelo de continuidad en la hematopoyesis. Este modelo plantea que la CTH puede diferenciarse, autorenovarse, permanecer latente o morir por apoptosis, dependiendo de la presión ejercida sobre ella por estímulos de algún tipo (fuerza atrayente) la cual va a definir la conducta de dicha célula (Kikland, 2004; Colvin et al, 2004; Quesenberry et al, 2005). La fuerza atrayente está constituida no por un solo factor, sino que puede ser un conjunto de factores (celulares, humorales, etc.), los cuales dependiendo del estado intrínseco de la célula determinará la manera como esta responde. Este efecto, sin embargo, no es exclusivo sobre las CTH (compartimiento I), sino que afecta de manera semejante a cada compartimiento, disminuyendo su injerencia conforme las células avanzan a su maduración final, generando células con diferentes capacidades de proliferación y de expansión. En cada uno de los compartimentos, sin embargo,

las fuerzas atrayentes son diferentes, conforme cambien los requerimientos de las células. En la figura 4B se ilustra el concepto. Recibe el término de continuidad porque plantea la posibilidad de una reversibilidad entre las células en los diferentes compartimentos; es decir, las CTH al adquirir un fenotipo o cierta restricción en sus capacidades (diferenciación) pueden revertirlo dependiendo de las condiciones microambientales que las rodean, transitando así entre uno o dos compartimentos.

El modelo de continuidad sugiere que las CTH alternan continuamente su fenotipo, y que estas alteraciones son reversibles. Por resultados obtenidos en la presente tesis, así como en la literatura, existe una disociación de la presencia del antígeno CD34+ en la superficie celular. Sin embargo, estas células que pueden o no presentar el antígeno CD34 con el que se definen, tienen la capacidad de generar colonias *in vitro* (Dorrel et al, 2000). Por otra parte, células generadas *in vitro*, presentando el antígeno CD34+ pueden no ser capaces de injertar ratones NOD/SCID. La evidencia sugiere que el antígeno CD34 puede ser modulado en superficie celular por acción de citocinas o las condiciones en cultivo (Dao et al, 2003). De acuerdo con el modelo jerárquico, una célula que pierde su potencial de desarrollo a un linaje específico nunca recupera tal potencial. Si se ha definido a las CPH como células CD34, y existen células que lo modulan ¿Deben dejar de considerarse como tales, aunque tengan la capacidad de injertar a largo plazo?

En base a la concepción del modelo de continuidad, se modificó el esquema, presentando lo que creemos que ocurre en los cultivos *in vitro*, no sólo basándonos en los resultados obtenidos en nuestro trabajo, sino también en la literatura (Figura 4C). Al parecer las CTH/CPH son más dependientes que su contraparte madura, de señales que eviten la apoptosis, trátase de factores humorales o el contacto con una capa estromal; así mismo, el modelo de continuidad puede aplicarse en etapas tempranas de la diferenciación hematopoyética (con ciclos de reversibilidad), poniéndose en tela de juicio la autorenovación estricta, pero existe un límite el cual al ser sobrepasado, las CPH son incapaces de regresar a ser progenitores más inmaduros, llegando a la diferenciación terminal. Además, dicha reversibilidad va a ser dependiente de las características del cultivo.

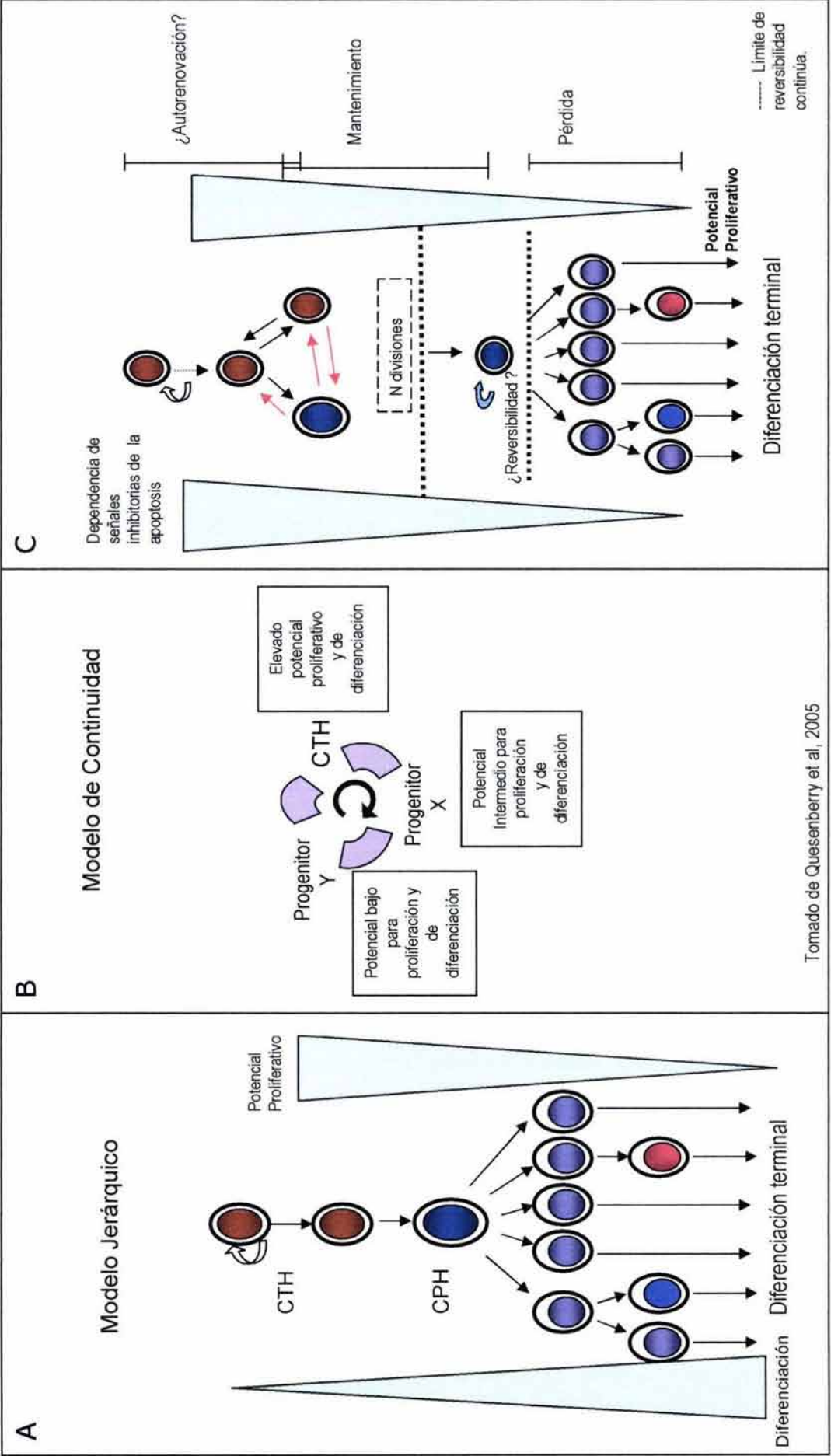


Figura 4: Representación del modelo jerárquico lineal (A), continuo (B) y sugerido (C) de la hematopoyesis.

## VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS:

En base a los resultados obtenidos así como al análisis de los mismos, se llegó a las siguientes conclusiones:

- La expansión de células progenitoras de SCU es factible con el empleo de un sistema de selección negativa, medio libre de suero y una combinación de citocinas, a una baja concentración de las mismas (10ng/ml, en general).
- Las dos poblaciones analizadas son funcionalmente diferentes. A pesar de no tratarse de poblaciones purificadas en base al antígeno CD34 o a la ausencia de células CD38+, el sistema de enriquecimiento negativo permite obtener poblaciones con cinéticas de proliferación y expansión diferentes. La Población I (enriquecida en células CD34+Lin-) a pesar de estar altamente enriquecidas en CPH, aún es una población heterogénea, presentado un traslape de los diferentes compartimentos de la jerarquía hematopoyética. Por su parte la Población II (enriquecida en células CD34+CD38-Lin-), es una población más homogénea, altamente enriquecida en CPH más inmaduras que las que componen a la Población I. Como poblaciones diferentes presentan distinto potencial de generación de células nucleadas, por efecto de citocinas estimuladoras. Así mismo, de cualquiera de las dos poblaciones enriquecidas fue posible regular su diferenciación hacia linaje mieloide o eritroide, dependiendo de la combinación de citocinas empleada.
- Por otra parte, nuestro estudio confirma una disociación entre la presencia del antígeno CD34+ en la superficie de las CPH y la actividad de formación de colonias *in vitro*. Si bien aún falta comprobar la actividad de CICLP de las CPH generadas *in vitro*, los resultados de inmunocitoquímica, así como las cinéticas de proliferación de las CPH obtenidas en cultivo, permite sugerir que se pueden obtener, durante los primeros días, células funcionalmente similares a las que les dieron origen, pero que no presentan en su superficie el antígeno CD34. Esto cuestionaría el empleo de este antígeno como medida de probabilidad de injerto dependiente del número de células CD34 introducidas en los



pacientes; posiblemente, para células expandidas *in vitro*, este parámetro debe reconsiderarse.

- En nuestras condiciones de cultivo, la presencia de células mesenquimales no estimula a una mayor expansión de las CPH de SCU que la obtenida con citocinas recombinantes, si bien permite su mantenimiento de manera más favorable que las citocinas solas.
- Las células linaje positivo, generadas lo largo del cultivo tienen un efecto sobre las poblaciones más primitivas, encubriendo su cinética de proliferación en cultivos donde no se eliminan. Este antecedente será importante en el establecimiento de protocolos que contemplen el empleo de cultivo de células de SCU con fines de expansión preclínica.
- En vista de los resultados explorados en la presente tesis, así como datos en la literatura, se sugiere la revisión de los modelos que explican el comportamiento de las células hematopoyéticas *in vitro*.

La siguiente fase del trabajo, se relaciona con extrapolar el sistema establecido hacia condiciones de expansión preclínica. Se plantea la posibilidad de emplear un biorreactor para incrementar el número de CPH, el cual es un sistema cerrado que permitiría un manejo controlado de las condiciones establecidas. Otra opción es el empleo de bolsas de Teflón™, lo cual reduciría tiempo y costos en la expansión de CPH de SCU.

Así mismo, como parte final de este trabajo se sugiere analizar si existen cambios en la expresión de moléculas relacionadas con la direccionalidad que las conducen a médula por efecto de su expansión, así como conocer con certeza el inmuofenotipo de las célula generadas en nuestro sistema de cultivo por citometría de flujo. También se pretende analizar si las células maduras generadas *in vitro* mantienen todas las características que las definen.

Los resultados obtenidos en la presente tesis permiten vislumbrar la posibilidad de obtener un sistema de cultivo que permita expandir a las CPH de SCU sin una pérdida excesiva de su potencialidad, con una reducción en los costos por tal procedimiento, con la finalidad de aplicarlo en protocolos clínicos a futuro.

## IX. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 4a edición. 2000. WB Saunders Company, USA. 553 pp..
2. Abe T, Takane Y, Kawano Y, Kuroda Y. Effect of recombinant erythropoietin in interactions with stromal factors on cord blood hematopoiesis. *Blood* 1996, 87:3212-3217.
3. Aiuti A, Friedrich C, Sieff CA, Gutierrez-Ramos JC. Identification of distinct elements of the stromal/microenvironment that control human hematopoietic stem/progenitor cell growth and differentiation. *Experimental Hematology* 1998, 26:143-157.
4. Akashi K, Weissman IL. Stem Cells and Hematolymphoid Development. En L. Zon ed, Hematopoiesis. A developmental approach. 2001. Oxford University Press, 814 pp.
5. Ando K, Nakamura Y, Chargui J, Kawada H, Sato T, Tsuji T, Kato S, Hotta T. Extensive generation of human cord blood CD34(+) stem cells from Lin(-)CD34(-) cells in a long-term in vitro system. *Experimental Hematology* 2000, 28:690-699.
6. Arai S, Klingemann HG. Hematopoietic stem cell transplantation: Bone marrow vs mobilized peripheral blood. *Archives of Medical Research* 2003, 34: 545-553.
7. Baines P, Mayani H, Bains M, Fisher J, Hoy T, Jacobs A. Enrichment of CD34 (My10)-positive myeloid and erithroyd progenitor from human marrow and their growth in cultures supplemented with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Experimental Hematology* 1988, 16:785-789.
8. Barker JN, Davies SM, DeFor TE, Ramsay NK, Weisdorf DJ, Wagner JE. Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis. *Blood* 2001, 97: 2957-2961.



9. Batard P, Monier M, Fortunel N, Ducos K, Sansilvestri-Morel P, Phan T, Hatzfeld A, Hatzfeld J. TGF $\beta$ -1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation. *Journal & Cell Science* 2000, 113:383-390.
10. Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nature Medicine* 1998, 4: 1038-1045.
11. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Gehron-Robey P. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001, 19:180-192.
12. Bridell RA, Brandt JE, Leemhuis TB, Hoffman R. Role of cytokines in sustaining long-term human megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 1992, 79:332-337.
13. Broudy VC. Stem cell factor and Hematopoiesis. *Blood* 1997, 90:1345-1364.
14. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Boyse E. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantation hematopoietic stem/ progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989, 86:3828-3832.
15. Broxmeyer HE. Proliferative, self renewal and survival characteristics of cord blood hematopoietic stem and progenitor cells. En Broxmeyer HE ed. *Cord blood: Biology, Immunology, Banking, and Clinical Transplantation*. 2004, USA. 455 pp.
16. Butler AC, Fitzsimmons EJ, Graham GJ. Ex vivo expansion of cord blood cells: The clinical potential. En Cohen SBA, Gluckman E, Rubinstein P, Madrigal JA ed. *Cord blood Characteristics: Role in Stem Cell Transplantation*. 2000, USA. 283 pp.
17. Cacoullos NT, Gritzapis AD, Tsitsilonis AE, Tsiatas ML, Boxevanis CN, Papamichail. Efficacy of novel culture environments on the ex vivo expansion kinetics of cord blood progenitor cells. *Haematologica* 2002, 87:320-321.
18. Chivu M, Diaconu CC, Bleotu C, Alexiu I, Brasoveanu L, Cernescu C. The comparasion of different protocols for expansion of umbilical-cord blood hematopoietic stem cells. *Journal of Cellular Molecular Medicine* 2004, 8:223-231.

19. Christensen JL, Wrigth DE, Wagers AJ, Weissman IL. Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells. *Plos Biology* 2004, 2:0368-0377
20. Chrysler GR, McKenna DH, Schierman T, Kadidlo D, Askari S, Miller J, Clay ME, McCullough J. Umbilical cord blood banking. En Broxmeyer HE ed. *Cord blood: Biology, Immunology, Banking, and Clinical Transplantation*. 2004, USA. 455 pp.
21. Cicuttini FM, Welch KL, Boyd AW. The effect of cytokines on CD34+Rh-123<sup>high</sup> and <sup>low</sup> progenitor cells from human umbilical cord blood. *Experimental Hematology* 1994, 22:1244-1251.
22. Cohen Y, Nagler A. Hematopoietic stem-cell transplantation using umbilical-cord blood. *Leukemia & Lymphoma* 2003, 44: 1287-1299.
23. Cohen Y, Nagler A. Umbilical cord blood transplantation –how, when and for whom? *Blood Reviews* 2004, 18:167-179.
24. Colvin GA, Lambert JF, Moore BE, Carlson JE, Dooner MS, Abedi M, Cerny J, Quesenberry PJ. Intrinsic hematopoietic stem cell/progenitor plasticity: inversions. *Journal of Cell Physiology* 2004, 199:20-31.
25. Danaeus K, Nilsson K, Jönson J. Distinct actions of Flt-3 ligand and stem cell factor on myeloid lineage selection and maturation of granulocytes versus macrophages. *Experimental Hematology* 1998, 26:345-352.
26. Dao MA, Arevalo J, Nolta JA. Reversibilidad of CD34 expression on human hematopoietic stem cells that retain the capacity for secondary reconstitution. *Blood* 2003, 101:112-118.
27. De Bruyin C, Delforge A, Bron D. Ex vivo myeloid differentiation of cord blood CD34+ cells: comparison of four serum free containing bovine or human albumin. *Cytotherapy* 2003; 5:153-160.
28. De Felice L, Di Pucchio T, Mascolo MG, Agostini F, Breccia M, Guglielmi C, Ricciardi MR, Tafuri A, Screni M, Mandelli F, Arcese W. Flt3L induces the ex-vivo amplification of umbilical cord blood committed progenitors and early stem cells in short-term cultures. *British Journal of Hematology* 1999, 106:133-141.
29. De León A, Mayani H, Ramírez OT. Design, characterization, and application of a minibioreactor for the culture of human hematopoietic cells under controlled conditions. *Cytotechnology* 1999, 28: 127-138.

30. De Wynter EA, Buck D, Hart C, Heywood R, Coutinho LH, Clayton A, Rafferty JA, Burt D, Guenechea G, Bueren JA, Gagen D, Fairbairn LJ, Lord BJ, Testa NG. CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/CID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells* 1998, 16:387-396.
31. De Wynter EA, Durig J, Cross MA, Heyworth CM, Testa NG. Differential response of CD34+ cells isolated from cord blood and bone marrow to MIP-1 $\alpha$  and the expression of MIP-1 $\alpha$  receptors on these immature cells. *Stem Cells* 1998, 16:349-356.
32. Denning-Kendall PA, Evely R, Singha S, Chapman M, Bradley BA, Hows JM. In vitro expansion of cord blood does not prevent engraftment of severe combined immunodeficient repopulating cells. *British Journal of Haematology* 2002, 116:218-228.
33. Deryugina EI, Müller-Sieburg CE. Stromal cells in long-term cultures: keys to the elucidation of hematopoietic development. *Critical Reviews in Immunology* 1993, 13: 115-150.
34. Devine SM, Lazarus HM, Emerson EG. Clinical application of hematopoietic progenitor cell expansion: current status and future prospects. *Bone Marrow Transplantation* 2003, 31: 241-252.
35. Dexter TM, Allen TD, Lathja LG, Schofield R, Lord BI. Stimulation of differentiation and proliferation of hematopoietic cells in vitro. *Journal of Cell Physiology* 1973, 82:461-473.
36. Dorrel C, Gan OI, Pereira DS, Hawley RG, Dick J E. Expansion of human cord blood CD34+CD38- cells in ex-vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SCR phenotype and function. *Blood* 2000, 95: 102-110.
37. Douay L. Experimental culture conditions are critical for ex vivo expansion of hematopoietic cells. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 2001, 10: 341-346.
38. Durand B, Eddleman K, Migliaccio AR, Migliaccio G, Adamson JW. Long-term generation of colony-forming cells (CFC) from CD34+ human umbilical cord blood cells. *Leukemia and Lymphoma* 1994, 11:263-273.

39. Dürig J, De Wynter EA, Kasper C, Cross MA, Chang J, Testa NG. Expression of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  receptors in human CD34+ hematopoietic cells and their modulation by tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$ . *Blood* 1998, 92:3073-3081.
40. Engelhardt M, Kumar R, Albanell J, Pettengell R, Han W, Moore MAS. Telomerase regulation, cell cycle, and telomerase stability in primitive hematopoietic cells. *Blood* 1997, 90:182-193.
41. Engelhardt M, Lübbert M, Guo Y. CD34+ or CD34-: which is the more primitive? *Leukemia* 2002; 16:1603-1608.
42. Fallen PR, Cohen SB. Cord blood T-cell immunobiology. En Cohen SBA, Gluckman E, Rubinstein P, Madrigal JA ed. 2000. Cord blood Characteristics: Role in Stem Cell Transplantation. USA. 283 pp.
43. Fietz T, Berdel WE, rieder H, Reufi B, Hopp H, Thiel E, Knauf WU. Culturing human umbilical cord blood: a comparison of mononuclear vs CD34+ selected cells. *Bone Marrow Transplantation* 1999, 23: 1109-1115.
44. Flores-Figueroa. 2006. Estudio in vitro de las células mesenquimales presentes en la médula ósea de pacientes con síndrome mielodisplásico. Tesis Doctorado, Facultad de Medicina, UNAM, México.
45. Flores-Guzmán P, Gutiérrez-Rodríguez M, Mayani H. In vitro proliferation, expansion, and differentiation of a CD34+ cell-enriched hematopoietic cell population from human umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. *Archives of Medical Research* 2002, 33:107-114.
46. Forraz N, Pettengell P, McGukin CP. Characterization of a lineage-negative stem-progenitor cell population optimized for ex vivo expansion and enriched for LTC-IC. *Stem Cells* 2004, 22:100-108.
47. Fortunel N, Batard P, Hatzfeld A, Monier M, Panterne B, Lebkowski J, Hatzfeld J. High proliferative potential-quiescent cells: a working model a study primitive quiescent hematopoietic cell. *Journal of Cell Science* 1998, 111:1867-1875.
48. Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. Transforming growth factor  $\beta$ : pleiotropic role in the regulation. *Blood* 2000, 96: 2022-2036.

49. Gallacher L, Murdoch B, Wu D, Karanu F, Fellows F, Bathia M. Identification of novel circulating human embryonic blood stem cells. *Blood* 2000, 96:1740-1747.
50. Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN. The kit ligand, stem cell factor. *Advances in immunology* 1994, 55:1-40
51. Gilbert S. *Developmental Biology*. 2003. 7a ed. Sinauer Associates Inc., USA. 837 pp.
52. Gilmore GL, DePasquale DK, Lister J, Shaddud RK. Ex vivo expansion of human umbilical cord blood and peripheral blood CD34+ hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology* 2000, 28:1297-1305.
53. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *New England Journal Medicine* 1989, 321:1174-1178.
54. Gluckman E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Experimental Hematology* 2000, 28:1197-1205.
55. Greenberg AW, Kerr WG, Hammer DA. Relationship between selectin-mediated rolling hematopoietic stem and progenitor cells and progression in hematopoietic development". *Blood* 2000, 95: 478-486.
56. Gupta P, McCarthy JB, Verfaillie CM. Stromal fibroblast heparin sulfate is required for cytokine-mediated ex vivo maintenance of human long-term culture-initiating cells. *Blood* 1996, 87:3229-3263.
57. Gutiérrez-Rodríguez M, Reyes Maldonado E, Mayani H. Characterization of the adherent cells developed in Dexter-type long-term cultures from human umbilical cord blood. *Stem Cells* 2000, 18:46-52.
58. Hao Q, Smogorzewska EH, Barsky LW, Crooks GM. In vitro identification of single CD34+CD38- cells with both lymphoid and myeloid potential. *Blood* 1998, 91: 4145-4151.
59. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL-1 $\alpha$ . *Journal of Cellular Physiology* 1996, 166:565-592.

60. Heaney ML, Golde DW. Soluble cytokine receptors. *Blood* 1996, 87: 847-857.
61. Herzog EL, Chai Li, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003, 102:3483-3493.
62. Hough RE, Barker JN, Wagner JE. Innovation in umbilical cord blood transplantation. En Broxmeyer HE ed. *Cord blood: Biology, Immunology, Banking, and Clinical Transplantation*. 2004, USA. 455 pp.
63. Humeau L, Bardin F, Maroc C. Phenotypic, molecular and functional characterization of human peripheral blood CD34+/THY1+ cells. *Blood* 1996, 87:949-955.
64. Ito T, Tajima F, Ogawa M. Developmental changes of CD34 expression by murine hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology* 2000, 28:1269-1273.
65. Janowska-Wieczorek A, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. *Stem Cells* 2001, 19:99-107.
66. Jarosca J, Goltry K, Smith A, Waters-Pick B, Martin PL, Driscoll TA, Howreg R, Cho N, Douville J, Burhop S, Fu P, Kurtzberg J. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase I trial using Aastrom Replicell System. *Blood* 2003, 101: 5061-5167.
67. Just U, Stocking C, Spooncer E, Dexter TM, Ostertag W. Expression of the GM-CSF gene after retroviral transfer in hematopoietic stem cell lines induces synchronous granulocyte-macrophage differentiation. *Cell* 1992, 64:1163.
68. Kadereit S, Deeds LS, Haynesworth SE, Koc ON, Kozic MM, Szekely E, Daum-Woods K, Goetchius GW, Fu P, Welniak LA, Murphy WJ, Laughlin MJ. Expansion of LTC-IC and maintenance of p21 and Bcl-2 in cord blood CD34(+)/CD38(-) early progenitors cultured over human MSCs as a feeder layer. *Stem Cells* 2002, 20:573-582.
69. Kalthoff K. *Analysis of Biological Development*. 2<sup>a</sup>. 2001. McGraw-Hill Higher education. USA.



70. Kaufman RL, Gunter KC, Visser JWM. Related and Autologous Cord Blood Banking and Transplantation. En Broxmeyer HE ed. 2004. Cord blood: Biology, Immunology, Banking, and Clinical Transplantation, USA. 455 pp.
71. Kaushansky K. Thrombopoietin: More than a lineage-specific megakaryocyte growth factor. *Stem Cells* 1997, 15:97-103.
72. Kay HE. How many cell-generations. *Lancet* 1995, 15: 418-419.
73. Khoury E, Lemoine FM, Baillou C, Kobari L, Deloux J, Guigon M, Najman A. Tumor necrosis factor alpha in human long-term bone marrow cultures: Distinct effects on nonadherent and adherent progenitors. *Experimental Hematology* 1992, 20:991-997.
74. Kikland MA. A phase space model of hematopoiesis and the concept of stem cell renewal. *Experimental Hematology* 2004, 32:511-519.
75. Knudtzon S. In vitro growth of granulocyte colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* 1974, 43:357-361
76. Kobari L, Pflumio F, Giarratana MC, Li X, Titeux M, izac B, Leteurtre F, Coulombel L, Douay L. In vitro and in vivo evidence for long-term multilineage (myeloid, B, NK and T) reconstitution capacity of ex vivo expanded human CD34+ cord blood cells. *Experimental Hematology* 2000, 28:1470-1480.
77. Köhler T, Plettig R, Wetzstein W, Schaffer B, Ordeman R, Nagels HO, Ehninger G, Bornhäuser M. Defining optimum conditions for the ex-vivo expansion of human umbilical cord blood cells. Influences of progenitor enrichment, interference with feeder layers, early-acting cytokines and agitation of culture vessels. *Stem Cell* 1999, 17:19-24.
78. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annual Reviews in Immunology* 2003, 21:759-806.
79. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cell migrate throughout forebrain a cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999, 96:10711-10716

80. Krause D, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001,105:369-77.
81. Kutzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, Ciocchi G, Carrier C, Stevens CE, Rubinstein P. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *New England Journal Medicine* 1996, 18: 157-166.
82. Lansdorp PM, Dragowska W, Mayani H. Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *Journal Experimental Medicine* 1993, 178:787-791.
83. Leary AG, Ogawa M. Blast cell colony assay from umbilical cord blood and adult bone marrow progenitors. *Blood* 1987, 69:953-956.
84. Lee Y, Gotoh A, Kwon HJ, You M, Kohli L, Mantel C, Cooper S, Hangoc G, Miyazawa K, Ohyashiki K, Broxmeyer HL. Enhancement of intracellular signaling associated with hematopoietic progenitor cell survival in response to SDF-1/CXCL12 in synergy with other cytokines. *Blood* 2002, 99:4307-4312.
85. Lemischka I. Regulation of hematopoietic stem cells: some conceptual and practical considerations. En L. Zon ed, *Hematopoiesis. A developmental approach*. 2001. Oxford University Press, 814 pp.
86. Lewis ID, Almeida-Porada G, Du J, Lemischka IR, Moore KA, Zanjani ED, Verfaillie CM. Umbilical cord blood cells capable of engrafting in primary, secondary, and tertiary xenogeneic hosts are preserved after ex vivo culture. *Blood* 2001, 97:3441-3449.
87. Li Q, Gui-Qiu L, Li Q, Meng HX, Han JH, Herzig RH, Hon ZH. Short term ex vivo expansion sustains the homing-related properties of umbilical cord blood hematopoietic stem and progenitors cells. *Haematologica* 2004, 89: 265-272.
88. Lin SJ, Waang LY, Huang YJ, Kuo ML. Effect of interleukin (IL)-12 and IL-15 on apoptosis and proliferation of umbilical cord blood mononuclear cells. *Bone Marrow Transplantation* 2001, 28: 439-45.
89. Luens KM, Travis MA, Chen BP, Hill BL, Scollay R, Murray LJ. Thrombopoietin, kit ligand and flk2/fit3 ligand together induce increased numbers of primitive hematopoietic progenitors from human CD34+Thy-

- 1+Lyn- cells with preserved ability to engraft SCID-hu bone. *Blood* 1998, 91:1206-1215.
90. Lyman SD, James L, Vande Bos T, deVries P, Brases K, Gliniak B, Hollingsworth LT, Picha Ks, MxKenna HJ, Splett RR, Fletcher FA, Maraskovsky E, Farrah T, Foxworthe D, Williams DE, Beckmann HP. Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell* 1993, 75:1153-1167.
91. Madlambayan GJ, Rogers I, Kirouac DC, Yamanaka N, Mazurier F, Doedens M, Casper RF, Dick JE, Zandstra PW. Dynamic changes in cellular and microenvironmental composition can be controlled in vitro human hematopoietic stem cell expansion. *Experimental Hematology* 2005, 33:1229-1239.
92. Majka M, Kucia M, Ratajczak MZ. Stem cell biology- a never ending quest for understanding. *Acta Biochemical Polonica* 2005, 52:353-358.
93. Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research* 2000, 9:841-848.
94. Marone M DeRitis D, Bonnano G, Mozzetti S, Rutella S, Scambia G, Pierelli L. Cell cycle regulation in human hematopoietic stem cells: from isolation to activation. *Leukemia and Lymphoma* 2002, 43:493-501.
95. May G, Enver T. The lineage commitment and self renewal of blood stem cells. En L. Zon ed, *Hematopoiesis. A developmental approach*. 2001. Oxford University Press, 814 pp.
96. Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzmán P. Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation. *Archives of Medical Research* 2003, 34:476-488.
97. Mayani H, Gilbert LJ, Janowska-Wieczorek A. Biology of the hematopoietic microenvironment. *European Journal of Hematology* 1992, 49:225-233.
98. Mayani H, Gutierrez-Rodríguez M, Esponiza L, López-Chalini E, Huerta-Zepeda A, Flores E, Sanchez-Valle E, Luna-Bautista F, Valencia I, Ramirez OT. Kinetics of hematopoiesis in Dexter-type long-term cultures established from human umbilical cord blood cells. *Stem Cells* 1998, 16:127-135.

99. Mayani H, Lansdorp PM. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cell. *Stem Cells* 1998, 16:153-165.
100. Mayani H, Lansdorp PM. Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. *Blood* 1994, 83: 2410-2417.
101. McGukin CP, Pearce D, Forraz N, Tooze JA, Watt SM, Pettengell R. Multiparametric analysis of immature cell populations in umbilical cord blood and bone marrow. *European Journal of Hematology* 2003, 71:341-350.
102. McNiece I. Ex vivo expansion of hematopoietic cells. Part II: Control of proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology* 2004, 32: 692-697.
103. Medvinsky A, Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 1996, 86:897-906.
104. Mehta K, Shahid U, Malavasi F. Human CD38, a cell surface protein with multiple functions. *FASEB Journal* 1996, 10: 1408-1417.
105. Metcalf D, Nicola NA. *The Hematopoietic Colony-Stimulating Factors*. 1995. Cambridge University Press, U.S.A., 327 pp.
106. Metcalf D. Some general aspects of hematopoietic cell development. En L. Zon ed, *Hematopoiesis. A developmental approach*. 2001. Oxford University Press, 814 pp.
107. Miraglia I, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke, R, Holde JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997, 90:5013-5021.
108. Miyazaki M, Kato T. Thrombopoietin: biology and clinical potentials. *International Journal of Hematology* 1999, 70:216-225.
109. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annual of Cellular and Developmental Biology* 1994, 11:35-71.
110. Nakamura Y, Ando K, Chegui J, Kawada H, Sato T, Tsuji T, Hotta T, Kato S. Ex vivo generation of CD34+ cells from CD34- hematopoietic cells. *Blood* 1999, 94: 4053-4059.
111. Nishikawa S, Nishikawa S, Fraser S, Fujimoto T, Yoshida H, Hirashima M, Ogawa M. Developmental relationship of hematopoietic stem cells and

- endothelial cells. En L. Zon ed, Hematopoiesis. A developmental approach. 2001. Oxford University Press, 814 pp.
112. Ogawa M, Porter PN, Nakahata T. Renewal and commitment to differentiation of hematopoietic stem cells (a interpretative review). *Blood* 1983, 61:823-829.
  113. Ogawa M. Changing phenotypes of hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology* 2002, 30: 3-6.
  114. Ogawa M. Differentiation y proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993, 81:2844-2853.
  115. Omori M, Omori N, Evarts RP, Teramoto T, Thorgeirsson SS. Coexpression of flt-3 ligand/flt-3 and SCF/c-kit signal transduction systems in bile-duct-ligated SL and W mice. *American Journal of Pathology*, 1997: 150:1179-1189.
  116. Orlic D, Bodine M. What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up! *Blood* 1994, 84:3992-3994.
  117. Peled T, Landau E, Mandel J, Gluckman E, Goudsmid NR, Nagler A, Fibach E. Linear polyamine copper-chelator tetraethylenepentamine augments long-term ex vivo expansion of cord blood-derived CD34+ cells and increases their engraftment potential in NOD/SCID mice. *Experimental Hematology* 2004, 32:547-555.
  118. Pertengell R, Morgenstern GR, Woll PJ, Chang J, Rowlands M, Young R, Radford JA, Scarffe JH, Testa NG, Crowther D. Peripheral blood progenitor cell transplantation in lymphoma and leukemia using a single apheresis. *Blood* 1993, 82: 3770-3776
  119. Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Severino A, Bergandi D, Ferrario J, Fagiolli F, Berger M, Aglietta M. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood* 1997, 89: 2644-2653.
  120. Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Severino A, Dane A, Gammaitoni L, Aglietta M. Differential growth factor requirement of primitive cord blood hematopoietic stem cell for self renewal and amplification vs proliferation. *Leukemia* 1998, 12:718-727.
  121. Piacibello W, Sanavio F, Severino A, Dane A, Gammaitoni L, Fagiolli F, Perissinotto E, Cavalloni G, Kollet O, Lapidot T Aglietta M. Engraftment in

- nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34+ cord blood cells after ex vivo expansion: Evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood* 1999, 93: 3736-3749.
122. Pittinger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circulation Research* 2004; 95:9-20.
123. Ponchio I, Duma L, Oliviero B, Gibelli N, Pedrazzoli, P, Robustelli della Cuna G. Mitomycin C as an alternative to irradiation to inhibit the feeder layer growth in long-term culture assays. *Cytotherapy* 2000, 2:281-286.
124. Quesenberry PJ, Dooner G, Colvin G, Abedi M. Stem cell biology and the plasticity polemic, *Experimental Hematology* 2005, 33: 389–394
125. Rafii S, Shapiro F, Rimarachin J, Nachman RL, Ferris B, Weksler B, Moore MAS, Asch AS. Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hematopoietic progenitor cell adhesion. *Blood* 1994, 84:10-19.
126. Ramsfjell V, Bryder D, Björguinsdóttir H, Kornfält S, Nilsson L, Borge OJ, Jacobsen SEW. Distinct requirements for optimal growth and in vitro expansion of human CD34+CD38- bone marrow long-term culture-initiating cells (LTC-IC) extended LTC-IC and murine in vivo long-term reconstituting stem cells. *Blood* 1999, 94:4093-4102.
127. Ratajczak J, Majka M, Kijowski J, Baj M, Pan ZK, Marquez LA, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Biological significance of MAPK, AKT and JAK-STAT protein activation by various erythropoietic factors in normal human early erythroid cells. *British Journal of Haematology* 2001, 115:195-204.
128. Robinson S, Niu T, de Lima M, Ng J, Yang H, McMannis J, Karandish S, Sadeghi T, Fu P, del Angel M, O'Connor S, Champlin R, Shpall E. Ex vivo expansion of umbilical cord blood. *Cytotherapy* 2005, 7: 243-250.
129. Rossmanith T, Schröder B, Bug G, Müller P, Klenner T, Knaus R, Hoelzer D, Ottmahn OG. IL-3 improves the ex vivo expansion of primitive human cord blood progenitors cells and maintains the engraftment potential of SCID repopulating cells. *Stem Cells* 2001, 19:313-320.
130. Ryu KH, Shin HY, Ahn HS, Kim YJ, Woo SY, Seoh JY. Comparison of efficiency of ex vivo expansion of whole blood, mononuclear cells and



- purified CD34+ cells from human umbilical cord blood. *Haematologica* 2004, 89: 606-607.
131. Sato T, Laver JH, Ogawa M. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1999, 94:2548-2554.
  132. Sawai N, Koike K, Mwamtemi HH, Kinoshita T, Kuyokawa Y, Sakashita K, Higuchi T, Takeuchi K, Shiohara M, Kamijo T, Ito S, Kato T, Miyazaki K, Yamashita T, Komiyama A. Thrombopoietin augments stem cell factor-dependent growth of human mast cells from bone marrow multipotential hematopoietic progenitors. *Blood* 1999, 93:3703-3712.
  133. Schilz AJ, Brouns G, KnöB H, Ottmann OG, Hoelzer D, Fauser AA, Thiasher AJ, Grez M. High efficiency gene transfer to human hematopoietic SCID-repopulating cells under serum free conditions. *Blood* 1998, 92:3163-3171.
  134. Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells. *Archives of Medical Research* 2003, 34:565-571.
  135. Simmons PJ, Gronthos S, Zannettino ACW. Developmental relationship of hematopoietic stem cells and endothelial cells. En L. Zon ed, *Hematopoiesis. A developmental approach*. 2001. Oxford University Press, 814 pp.
  136. Smith FO, Srour EF, Broxmeyer HE. Ex-vivo expansion and gene transduction of cord blood stem cells. En Broxmeyer HE ed. *Cord blood: Biology, Immunology, Banking, and Clinical Transplantation*. 2004, USA. 455 pp.
  137. Smith FO. Immune reconstitution following umbilical cord blood transplantation. En Broxmeyer HE ed. *Cord blood: Biology, Immunology, Banking, and Clinical Transplantation*. 2004, USA. 455 pp.
  138. Stingl G, Bergstresser PR. Dendritic cells: a major history unfolds. *Immunology Today* 1996, 16:330-333.
  139. Su RJ, Zhang XB, Li K, Yang M, Li CK, Fok TF, James AE, Pong H, Yuen PMP. Platelet-derived growth factor promotes ex vivo expansion of CD34+ cells from human cord blood and enhances long-term culture-initiating cells, non-obese diabetic/severe combined immunodeficient repopulating cells and formation of adherent cells. *British Journal Hematology* 2002, 117:735-746.

140. Szilvassy SJ, Hoffman R. Enriched hematopoietic stem cells: Basic biology and clinical utility. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 1995, 1: 3-7.
141. Szilvassy SJ. The biology of hematopoietic stem cells. *Archives of Medical Research* 2003, 34(6): 446-460
142. Tajima F, Deguchi T, Laver JH, Zeng H, Ogawa M. Reciprocal expression of CD38 and CD34 by adult murine hematopoietic stem cells. *Blood* 2001, 97: 2618-2624.
143. Tavassoli M. Embryonic and fetal hematopoiesis: An Overview. *Blood Cells* 1991, 1: 269-281.
144. Testa U, Fossati C, Samoggia P, Masciulli R, Mariani G, Hassan HJ, Sposi NM, Guerriero R, Rosato V, Gabbiabelli M, Pelosi E, Valtieri M, Peschle C. Expression of growth factor receptor in unilineage differentiation culture purified hematopoietic progenitors. *Blood* 1996, 88:3391-3401.
145. Thomas TE, Fairhurst MA, Lansdorp PM. Rapid single step immunomagnetic isolation of highly enriched primitive human hematopoietic progenitors. *Blood* 1997, 90:347
146. Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L. A stochastic model of stem cell proliferation based on the growth of spleen colony-forming cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1964, 51:29.
147. Traycoff CM, Orazi A, Ladd AC, Rice S, McMahel J, Srour EF. Proliferation-induced decline of primitive hematopoietic progenitor cell activity is coupled with an increase in apoptosis of ex vivo expanded CD34+ cells. *Experimental Hematology* 1998, 26:53-62.
148. Tse W, Laughlin M. Umbilical cord blood transplantation: a new alternative option. *Hematology* 2005, 377-383.
149. Van Zant G, Rummel SA, Koller MR, Larson DB, Drubachevsky I, Palsson M, Emerson SG. Expansion in bioreactors of human progenitor populations from cord blood and mobilized peripheral blood. *Blood Cells* 1994, 20:482-90.
150. Vaziri H, Benchimol S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Current Biology* 1998, 8:279-282.

151. Verfaillie CM, Catanzaro P. Direct contact with stroma inhibits proliferation of human long-term culture initiating cells. *Leukemia* 1996, 10:498-504.
152. Verfaillie CM, Catanzarro PM, Li WN. Macrophage inflammatory protein 1 alpha, interleukin 3 and diffusible marrow stromal factors maintain human hematopoietic stem cells for at least eight weeks in vitro. *Journal Experimental Medicine* 1994, 179:643-649.
153. Verfaillie CM. Direct contact between human primitive hematopoietic progenitors and bone marrow stroma is not required for long-term in vitro hematopoiesis. *Blood* 1992, 79: 2821-2826.
154. Voermans C, Gerritsen WR, vander Borne AEGK, van der Schoot CE. Increased migration of cord blood-derived CD34+ cells as compared to bone marrow and mobilized peripheral blood CD34+ cell across uncoated or fibronectin-coated filters. *Experimental Hematology* 2000, 27:1806-1814.
155. Wagner JE, Rosenthal J, Sweetman R, Shu XO, Davies SM, Ramsay NK, McGlave PB, Sender L, Cairo MS. Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood* 1996, 1:795-802.
156. Watowich SS, Wu H, Socolovsky M, Klingmuller U, Constantines SN, Lodish HF. Cytokine receptor signal transduction and the control of receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development. *Annual Review of Cellular and Developmental Biology* 1996, 12:91-128.
157. Wilpsher J, Falkenburg JHF, Tong X, Noort WA, Breese B, Heilman D, Kanhai H, Orschell-Traycoff CM, Srour EF. Similar repopulating capacity of mitotically active and resting umbilical cord blood CD34+ cells in NOD/SCID mice. *Blood* 2000, 96:2100-2107.
158. Wodnar-Filipowicz A. Flt3 ligand: Role in control of hematopoietic and immune functions of the bone marrow. *News in Physiology Science* 2003, 18:247-251.
159. Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Archives of Medical Research* 2003, 34:461-475.
160. Yagi M, Ritchie KA, Sitnicka E, Storey C, Roth GJ, Bartelmez S. Sustained ex vivo expansion of hematopoietic stem cells mediated by

- thrombopoietin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999, 96:8126-8136.
161. Yamaguchi M, Hirayama F, Kenai M, Sato N, Fukuzawa K, Yamashita K, Sawada K, Koike T, Kuwabara M, Ikeda H, Ikebuchi K. Serum-free coculture system ex vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. *Experimental Hematology* 2001, 29:174-182.
  162. Yao C, Chu I, Hsieh T, Hwuang S. A systematic strategy to optimize ex vivo expansion medium for human hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood mononuclear cells. *Experimental Hematology* 2004, 32: 720-727
  163. Yi ZQ, Burkholder JK, Qiu P, Schultz JC, Shahidi NT, Yang NS. Establishment of an adherent cell feeder layer from human umbilical cord blood for support of long-term hematopoietic progenitor cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1994, 91:12140-12144.
  164. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almedia-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997, 90:5002-5012.
  165. Yonemura Y, Ku H, Hirayama F, Souza LM, Ogawa M. Interleukin 3 or interleukin 1 abrogates the reconstituting ability of hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996, 96:4040-4044.
  166. Yonemura Y, Ku H, Lyman SD, Ogawa M. In vitro expansion of hematopoietic progenitors and maintenance of stem cells: Comparison between FLT3/FLK-2 ligand and KIT ligand. *Blood* 1997, 89:1915-1921.
  167. Yoo E, Lee K, Seo J, Yoo E, Lee M, Im S, Mun Y, Lee S, Huh J, Kim M, Jo D, Ahn J, Lee S, Chung W, Kim J, Seon C. Adherent cells generated during long-term culture of human umbilical cord blood CD34+ cells have characteristics of endothelial cells and beneficial effect on cord blood ex vivo expansion. *Stem cells* 2003, 21:228-235.
  168. Young JC, Varmu A, DiGiusto D, Backer MP. Retention of quiescent hematopoietic cells with high proliferative potential during ex vivo stem cell culture. *Blood* 1996, 87: 545-556.

169. Zambrano-Ramírez IR, Santiago-Osorio E, Weiss-Steider B, Cáceres-Córtés JR. Biología de las células totipotenciales hematopoyéticas. *Revista de Investigación Clínica* 1999, 51:53-68.
170. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M. Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes living rise to CD34+ cells. *Experimental Hematology* 1998, 26:353-360.
171. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Zeng H, Ogawa M. Reversible expression of CD34 by adult human bone marrow long-term engrafting hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology* 2003, 31:406-412.
172. Zhang JX, Mao P. Expansion of erythroid progenitors and CD34+ cells by umbilical cord blood mononuclear cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2005, 13:429-33.
173. Zhu GR, Zhou XY, Lu H, Zhou JW, Li AP, Xu W, Li JY, Wang CY. Human bone marrow mesenchymal stem cells express multiple hematopoietic growth factors. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2003, 11:115-119.
174. Ziegler BL, Müller R, Valtieri M, Lamping CP, Thomas CA, Gabbianelli M, Giesert C, Bühring H, Kanz L, Peschle C. Unicellular-unilineage erythropoietic cultures: molecular analysis of regulatory gene expression at sibling cell level. *Blood* 1999, 93: 3355-3368.

ORIGINAL ARTICLE

## *In Vitro* Proliferation, Expansion, and Differentiation of a CD34<sup>+</sup> Cell-Enriched Hematopoietic Cell Population from Human Umbilical Cord Blood in Response to Recombinant Cytokines

Patricia Flores-Guzmán, Margarita Gutiérrez-Rodríguez and Héctor Mayani

Unidad de Investigación Médica en Oncología, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN-SXXI), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City, Mexico

Received for publication June 22, 2001; accepted October 4, 2001 (01/098).

**Background.** The conditions and mechanisms that control the *in vitro* growth of hematopoietic stem/progenitor cells (contained within the population of CD34<sup>+</sup> cells) are still not completely understood.

**Methods.** By using an immunomagnetic system, we have enriched for umbilical cord blood (UCB)-derived CD34<sup>+</sup> cells (55% of total cells recovered vs. 0.8% of total cells prior to the enrichment procedure) and analyzed their *in vitro* growth (proliferation, expansion, and differentiation) in a liquid culture system in the absence or presence of different recombinant cytokine combinations.

**Results.** When the selected cells were cultured in the absence of recombinant cytokines, no proliferation or expansion was observed. In the presence of steel factor (SF) and interleukin-6 (IL-6), total cell number was increased nearly fourfold; however, no progenitor cell expansion took place. When cultures were supplemented with SF and IL-6 together with IL-3 and erythropoietin (EPO), a rapid proliferation of the CD34<sup>+</sup>-enriched cell population was observed with a selective stimulation of erythropoiesis. However, this stimulation was only transient, suggesting that there was a rapid exhaustion of erythroid progenitor cells within the first 10 days. Significantly higher levels of proliferation and expansion of progenitor cells were observed in the presence of SF, IL-6, GM-CSF, and G-CSF with preferential stimulation of myelopoiesis. Interestingly, such stimulation of myelopoiesis was sustained for the entire culture period (>30 days). The highest levels of proliferation and expansion were observed in the presence of all six cytokines. Under these conditions, erythropoiesis was also sustained only transiently (10 days), whereas myelopoiesis was sustained for >30 days.

**Conclusions.** This study indicates that significant proliferation and expansion of hematopoietic progenitors can be achieved *in vitro* when culturing a cell population in which CD34<sup>+</sup> cells comprise only >50% of the total cells. Our results also suggest that myeloid progenitors (those responding to GM-CSF and G-CSF) possess higher expansion potentials *in vitro* than their erythroid counterparts. The methods described here for the enrichment and culture of CD34<sup>+</sup> cells may be relevant in the development of protocols for the *ex vivo* proliferation and expansion of hematopoietic progenitors for transplantation. © 2002 IMSS. Published by Elsevier Science Inc.

**Key Words:** Differentiation, Expansion, Hematopoietic progenitor cells, *In vitro*, Recombinant cytokines, Proliferation, Umbilical cord blood.

Address reprint requests to: Héctor Mayani, Ph.D., Unidad de Investigación Médica en Oncología, Hospital de Oncología, CMN-SXXI, IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, 06720 México, D.F., México. Tel.: (+52) (55) 5627-6959; FAX: (+52) (55) 5761-0952; E-mail: hmayaniv@conacyt.mx

### Introduction

Blood cell production—hematopoiesis—depends on the continuous proliferation, expansion, and differentiation of a small subset of primitive cells that includes both hematopoi-



etic stem cells (HSC) and their immediate progeny, i.e., hematopoietic progenitor cells (HPC) (1–3). Together, HSC and HPC comprise no more than 0.4% of the total number of marrow cells. These cell subpopulations are characterized by the expression of the CD34 antigen, an integral membrane glycoprotein of 90–120 kD that functions as a regulator of hematopoietic cell adhesion to stromal cells within the marrow microenvironment (4,5). CD34<sup>+</sup> cells comprise approximately 1% of the cells present in bone marrow (6).

The growth of HSC and HPC is regulated by a group of proteins known as hematopoietic cytokines. These include both soluble and cell-associated molecules. Most if not all are pleiotropic, in that they act on different cell types and have different effects, depending on their target cell, their concentration, and the presence of other cytokines. It is clear, however, that some cytokines—such as the colony-stimulating factors (CSF), erythropoietin (EPO), and steel factor (SF)—act primarily as hematopoietic stimulators, whereas others such as tumor necrosis factor- $\alpha$  and transforming growth factor- $\beta$  primarily act as inhibitors (7,8).

During the last decade, increasing interest has been generated concerning the *in vitro* expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells, not only from bone marrow but also from umbilical cord blood (UCB) (9,10), this due to the fact that the latter represents an excellent source of hematopoietic cells for transplantation (9). Because of the evident clinical relevance of human hematopoietic stem and progenitor cells, several research groups have devoted themselves to the development of optimal culture conditions for the *in vitro* expansion of these cells. The experimental conditions described to date are based on the use of recombinant stimulatory cytokines; interestingly in some cases, antibodies against hematopoietic inhibitors have been used and certain research groups have also included different stromal cell lines in their cultures (11–17). Although impressive increments in stem and progenitor cell numbers have been reported (18), the conditions and mechanisms that control their proliferation, expansion, and differentiation are still not completely understood at present.

In the vast majority of the studies reported to date, purification of CD34<sup>+</sup> cells has been done by fluorescence-activated cell sorting (FACS), which allows the recovery of a cell population consisting of >95% CD34<sup>+</sup> cells. However, FACS is costly and time consuming; thus, it has been suggested that for clinically oriented procedures, immunomagnetic columns—for either positive or negative selection of primitive cells—might be more appropriate because they are less expensive and the procedure can be carried out in only 2 h. The frequency of CD34<sup>+</sup> cells in the enriched population, however, is usually lower than when using FACS.

To contribute to our understanding of the *in vitro* biology of hematopoietic stem and progenitor cells and to the characterization of CD34<sup>+</sup> cells obtained by negative selection based on immunomagnetic procedures, in the present study

we have enriched for CD34<sup>+</sup> cells from UCB and characterized their long-term *in vitro* response to different recombinant cytokine combinations. The cytokine combinations used here included those that selectively stimulate erythroid and/or granulocyte-macrophage development, as well as a combination of cytokines that acts on primitive uncommitted cells without favoring any particular hematopoietic lineage. The patterns of proliferation, expansion, and differentiation of these cells were followed throughout a 30-day culture period in a stroma-free liquid culture system.

## Materials and Methods

**Cell collection.** UCB cells collected according to institutional guidelines were obtained from 12 normal full-term deliveries at the Troncoso Hospital (IMSS, Mexico City). These procedures were approved by the Ethical Committee of the XXI Century National Medical Center, IMSS.

**Cell processing.** Buffy coat cells were obtained by centrifugation (400 g for 7 min), and low-density mononuclear cells (MNC, <1.077 g/mL) were isolated using Ficoll-Paque Plus (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Cells were then resuspended in Iscove Modified Dulbecco Medium (IMDM) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS, StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada). Total numbers of nucleated and viable cells were determined with a hemocytometer using Turck solution and trypan blue stain, respectively.

**CD34<sup>+</sup> cell enrichment.** CD34<sup>+</sup> cells were enriched from MNC by negative selection using StemSep™ system, according to manufacturer instructions (StemCell Technologies, Inc.). Briefly, MNC ( $50 \times 10^6$ /mL) were labeled with an antibody cocktail (20 min at room temperature) followed by incubation with a magnetic colloid (20 min at room temperature). The antibody cocktail included monoclonal antibodies to the following cell surface antigens: CD2; CD3; CD14; CD16; CD19; CD24; CD56; CD66b, and glycophorin A. Cells were then passed through a plastic column in the presence of a magnet. Unwanted (labeled) cells were retained in the column and desired cells were collected in a plastic tube containing IMDM supplemented with 2% FBS. The entire procedure was performed inside a laminar flow hood. Cells were then centrifuged, resuspended in culture medium, and counted.

**CD34<sup>+</sup> cell quantification.** On day 0 (immediately after negative selection) and on days 5, 10, and 20 of culture, CD34<sup>+</sup> cells were identified and quantified by immunocytochemistry. This was performed using a commercially available kit (DAKO EnVision<sup>+</sup> System, Peroxidase-Diaminobenzidine, DAKO, Copenhagen, Denmark), which uses a specific monoclonal antibody directed to the CD34 antigen.

Slides containing  $40 \times 10^3$  cells were prepared and the entire procedure was carried out according to manufacturer instructions. Once the slides were ready, 300 cells/slide were scored.

**Liquid cultures.** Cells obtained after negative selection were resuspended in long-term culture medium (MyeloCult, StemCell Technologies, Inc.). Culture medium composition was as follows: alpha medium supplemented with 12.5% horse serum; 12.5% FBS; 0.2 mM inositol; 20  $\mu$ M folic acid;  $10^{-4}$  M 2-mercaptoethanol, and 2 mM L-glutamine. The medium was supplemented with different combinations of the following recombinant hematopoietic cytokines: steel factor (SF, StemCell Technologies, Inc., added at 10 ng/mL); interleukin-3 (IL-3, StemCell Technologies, Inc., added at 10 ng/mL); IL-6 (StemCell Technologies, Inc., added at 10 ng/mL), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, Molgramostim, Novartis/Schering-Plough, Mexico City), added at 10 ng/mL); G-CSF (StemCell Technologies, Inc., added at 10 ng/mL), and erythropoietin (EPO; Eprex; Johnson & Johnson (USA), added at 3 U/mL). Control cultures contained no recombinant cytokines. Cells were cultured in 24-well tissue culture plates at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air, at a concentration of  $1 \times 10^5$  cells/mL/well. After 5 days of culture, cells were harvested from the wells, counted, and analyzed for progenitor cell content (CD34<sup>+</sup> cells and CFC) and morphology. Secondary cultures were initiated with  $5\text{--}10 \times 10^4$  nucleated cells. Cultures were processed in this manner every 5 days.

**Hematopoietic colony assays.** Hematopoietic progenitor cells capable of forming colonies *in vitro* (colony-forming cells = CFC) were assayed in methylcellulose-based, semisolid cultures (StemCell Technologies, Inc.), as previously described (19). The culture medium consisted of 0.9% methylcellulose, 30% fetal bovine serum (FBS), 1% bovine serum albumin,  $10^{-4}$  M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 50 ng/mL rhSF, 10 ng/mL rhIL-3, 10 ng/mL rhGM-CSF, and 3 U/mL rhEPO. Cells obtained after negative selection were plated at a final concentration of  $1 \times 10^3$  cells/mL and the cultures were incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. Cells obtained from the liquid culture on days 10 and 20 were also cultured in this manner; however, plating cell concentration varied from  $5 \times 10^4$  to  $1 \times 10^4$ , depending on the cell number recovered from the cultures. After 14–17 days of culture, colonies were scored in the same dish using an inverted microscope. Hematopoietic colonies were classified as follows: CFU-MIX, colonies containing both erythroid and myeloid cells; CFU-E, erythroid clusters of 20–50 hemoglobinized cells, and BFU-E, erythroid colonies of >50 hemoglobinized cells grouped in one or several clusters. Myeloid colonies comprised the identifiable subpopulations of pure granulocytic colonies (CFU-G), pure macrophagic colonies (CFU-M), and colonies containing both granulocytes and macrophages (CFU-GM).

**Morphologic studies.** Cells obtained after negative selection as well as cells obtained from liquid cultures were ex-

amined on slide preparations stained with Wright-Giemsa stain. Approximately 300 cells per slide were scored.

**Statistics.** Statistical analysis was performed using Student *t* test.

## Results

**Characteristics of the cell population obtained by negative selection.** A median of  $200 \times 10^6$  MNC was obtained from each particular experiment. These cells were passed through the immunomagnetic column and a median of  $4 \times 10^6$  cells was recovered (2% of the MNC number). Solely >60% of the cells showed a blast morphology (lymphoblast-like cells); the remainder corresponded to granulocytic, monocytic, and erythroid cells (Table 1). Approximately 55% of the recovered cells were positive for the CD34 antigen, indicating that (i) there was a very close correlation between the proportion of CD34<sup>+</sup> and blast cells, and that (ii) CD34<sup>+</sup> cells corresponded to 1% of the MNC from UCB. This latter number correlated with that observed when CD34<sup>+</sup> cells were directly determined in MNC samples (0.8%).

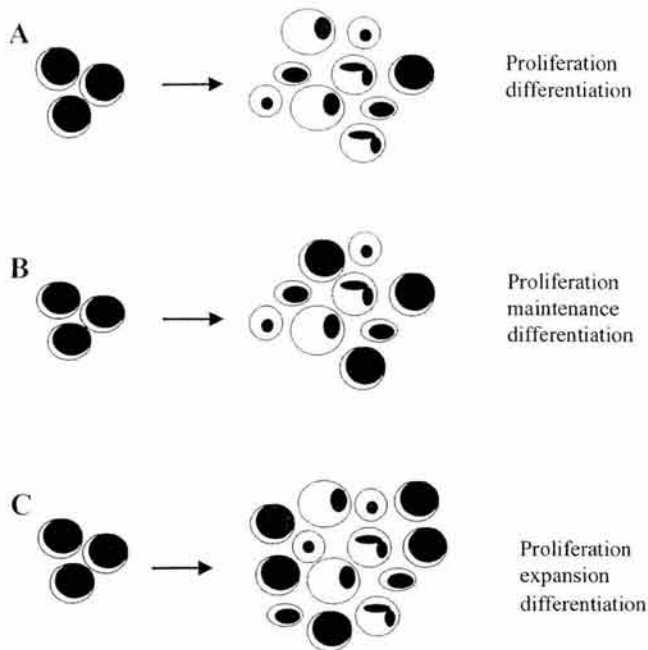
A median of 14% of the recovered cells was capable of forming hematopoietic colonies in semisolid cultures (Table 1). This was in sharp contrast to the reduced proportion of CFC observed in the MNC population (0.4%) (experiments not shown) (19). Thus, there was a 35-fold enrichment in the number of CFC. Among these cells, 37% corresponded to myeloid progenitors, 59% to erythroid progenitors, and 4% to multipotent progenitors (Table 1).

**Cell proliferation.** In the present study we have defined cell proliferation as the production of new cells from a particular cell population, regardless of the cell types being produced (Figure 1). Thus, the *in vitro* proliferation of a cell population was determined simply by the total cell number generated in culture. As shown in Figure 2, the CD34<sup>+</sup>-enriched cell population obtained by negative selection was unable to

**Table 1.** Characteristics of the cell population obtained by negative selection

Cell morphology (%)	
Granulocytic cells	30.5 (21.7–39.3)
Monocytic cells	2.0 (0.2–4.4)
Erythroid cells	3.7 (0–7.2)
Blasts	63.3 (52.1–74.5)
Progenitor cell content (%)	
CD34 <sup>+</sup> cells	55.2 (46.3–76.4)
Cloning efficiency	13.9 (5.0–19.8)
Colony-forming cell type (%)	
Myeloid	36.7 (21.1–44.7)
Erythroid	59.2 (42.4–69.2)
Multipotent	3.8 (0.8–9.1)

Results represent median (range) from 8 to 12 separate experiments, each corresponding to a particular UCB sample.



**Figure 1.** Schematic representation of the *in vitro* growth of hematopoietic stem/progenitor cells. A, the input cell population is capable of generating new cells; thus, there is an increase in total cell number (proliferation). The cells produced show mature features of different hematopoietic lineages (differentiation). However, there is a reduction in the number of cells that retain characteristics of the input cells; B, the input cell population proliferates and differentiates; the number of cells that retains characteristics of the input cell population is maintained, and C, the input cell population proliferates and differentiates; the number of cells that retains characteristics of the input cell population is increased (expansion).

proliferate in the absence of recombinant cytokines. The total number of nucleated cells in culture decreased gradually, reaching <1% of the input number by day 25 of culture. In contrast, in the presence of the early-acting cytokines SF and IL-6, a slight increase (3.7-fold) in total cell number was observed between days 10 and 30 of culture (Figure 2).

When intermediate- and late-acting cytokines were included in the cytokine combinations, significant increments in cell numbers were observed. In the presence of a cytokine combination that included SF and IL-6 together with the erythroid-stimulating factors IL-3 and EPO (erythroid cytokine mixture = ECM), there was an immediate and significant response in cell number (10-fold increase by day 5), which reached a peak by day 15 of culture (225-fold increase). Subsequently, however, a continuous decline was observed.

When cultures were supplemented with SF, IL-6, GM-CSF, and G-CSF (myeloid cytokine mixture = MCM), a slow increase was observed during the first 10 days as compared with ECM-supplemented cultures ( $p < 0.05$ ); however, total cell number in MCM-supplemented cultures continued to rise, reaching nearly a 500-fold increase by days 25 and 30 (Figure 2).

When all six cytokines (SF, IL-6, IL-3, EPO, GM-CSF, and G-CSF; erythroid/myeloid cytokine mixture = E/MCM) were added to the cultures, increase in cell number was the highest observed (750-fold on day 25). Interestingly, during the first 15 days of culture the proliferation pattern was similar to that observed with ECM (no significant difference), whereas during the following 15 days the proliferation pattern was similar to that observed with MCM (no significant difference) (Figure 2).

**Cell expansion.** Cell expansion was defined as the production of more cells that retain specific characteristics of the input cell population (Figure 1). In the present study we assessed the expansion of both CD34<sup>+</sup> cells and progenitors capable of forming hematopoietic colonies in semisolid cultures (CFC). In the absence of recombinant cytokines, there was no expansion of CD34<sup>+</sup> cells that reached undetectable levels by day 10 (Figure 3). In the presence of SF and IL-6, CD34<sup>+</sup> cell numbers were sustained for the first 5 days; however, undetectable levels were also reached on day 10.

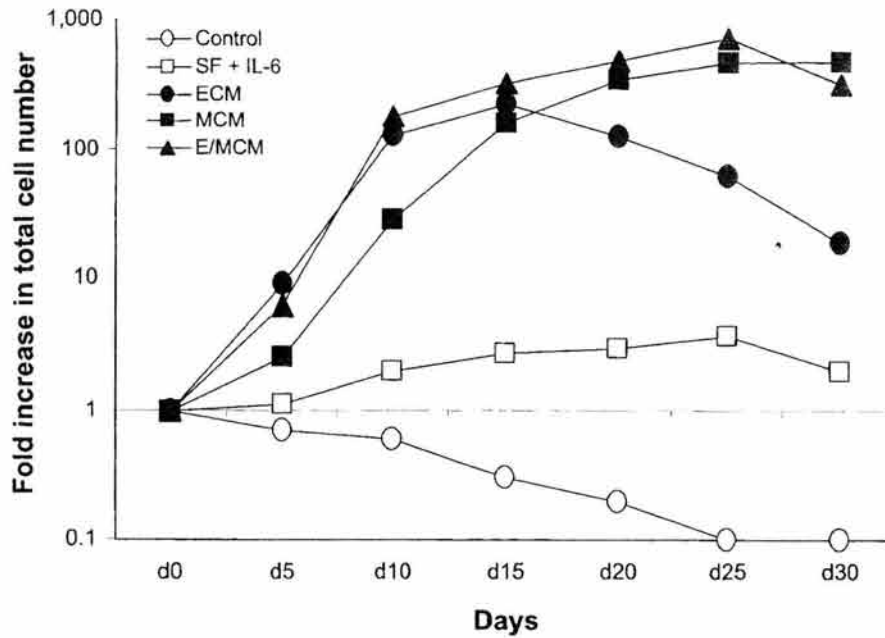
When cultures were supplemented with ECM, CD34<sup>+</sup> cells were increased fourfold by day 5, followed by a drastic decrease and reaching undetectable levels on day 10 (Figure 3). In contrast, in cultures with MCM the number of CD34<sup>+</sup> cells remained practically constant during the first 5 days; however, by day 10 a sharp increase (ninefold) was observed after which a continuous decrease occurred. A similar pattern of CD34<sup>+</sup> cell expansion was observed with E/MCM, except that on day 5 the number increased nearly 3-fold, and on day 10 approximately 13-fold (Figure 3).

As shown in Table 2, in the absence of cytokines or in the presence of SF and IL-6, CFC numbers decreased significantly on days 10 and 20. In the presence of ECM, erythroid CFC levels showed a transient increase (threefold), whereas their myeloid counterparts were increased only 1.7-fold. In MCM-supplemented cultures, there was selective expansion of myeloid progenitors (nearly 7-fold and 3.5-fold on days 10 and 20, respectively) with no increase in erythroid progenitors. Finally, in the presence of E/MCM both myeloid and erythroid CFC were significantly increased, although only on day 10 (Table 2).

**Cell differentiation.** Cell differentiation was defined as the generation of morphologically recognizable precursor and mature cells of specific hematopoietic lineages (Figure 1). In this study, three lineages were assessed: granulocytic; monocytic, and erythroid. In control cultures (no cytokines), there was an increase in monocytic cells compared to day 0 and a decrease in granulocytic cells; however, one half of the cells observed on day 10 remained as blasts (Table 3), indicating that there was no differentiation.

In the presence of SF and IL-6, levels of granulocytic cells remained constant (at approximately 30%) and a marked generation of monocytic cells was observed (65% of the cells on day 20). Blasts cells, on the other hand, were





**Figure 2.** Proliferation of the UCB-derived, CD34<sup>+</sup>-enriched cell population in liquid cultures supplemented with the following: no cytokines (control); SF + IL-6; SF + IL-6 + IL-3 + EPO (ECM); SF + IL-6 + GM-CSF + G-CSF (MCM), or SF + IL-6 + IL-3 + EPO + GM-CSF + G-CSF (E/MCM). Results represent median values from 8 to 12 experiments and correspond to the fold-increase as compared to input numbers. During days 5 and 15, levels observed with ECM and E/MCM showed no statistical difference. On days 5 and 10, levels with MCM were significantly lower ( $p < 0.05$ ) than with ECM and E/MCM. During days 15 and 30, levels with MCM and E/MCM showed no statistical difference.

reduced to undetectable levels by day 20 (Table 3). In cultures supplemented with ECM, there was significant generation of erythroid cells (erythroblasts at different stages, nearly 80% of total cells on day 10); nevertheless, this was solely transient despite continuous administrations of IL-3 and EPO, the levels of which dropped to 20% by day 30. Blast cells reached undetectable levels by day 20.

In MCM-supplemented cultures, there was preferential generation of granulocytic and monocytic cells. Together, they comprised 90–100% of total cells between days 10 and 30 of culture (Table 3). Under these conditions, no erythroid cells were observed and blasts were detected solely on day 10. When cultures were supplemented with all six cytokines (E/MCM), a transient predominance of erythroblasts was observed (nearly 60% of total cells on day 10); nonetheless, on days 20 and 30 the vast majority of the cells (70–90%) corresponded to granulocytic and monocytic cells (Table 3).

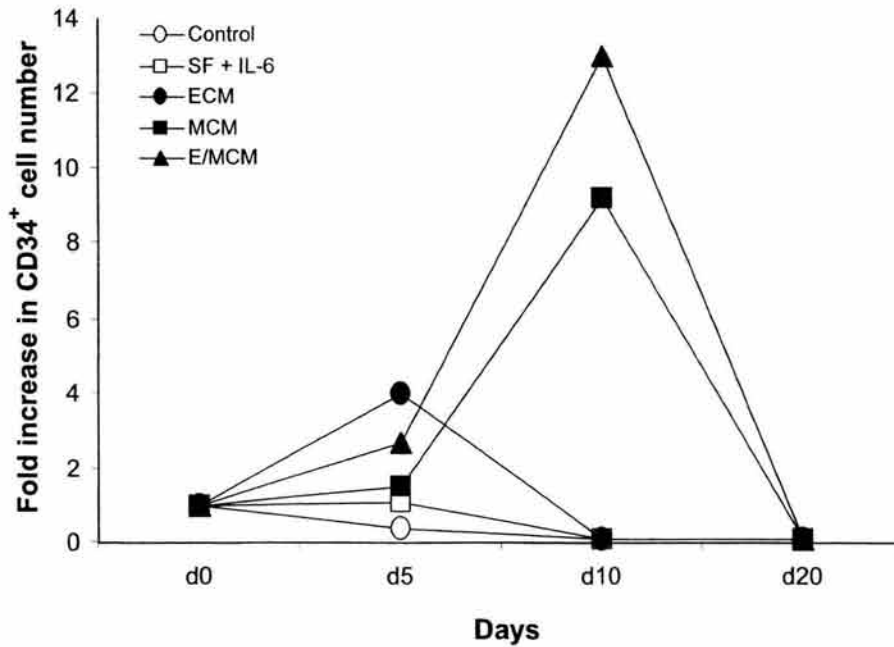
## Discussion

Proliferation, expansion, and differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells depend on both intrinsic and extrinsic aspects. The former include the specific hematopoietic lineage to which the cell belongs and its stage of maturation. The latter, on the other hand, include the different cell types and cytokines that form part of the microenvironment in which the cell develops (20). *In vitro*, hematopoietic cell growth also depends on variables such as type of culture me-

dium, medium change schedule, temperature, presence or absence of serum, number of cells plated, etc. (21).

To date, most studies on the *in vitro* growth of stem/progenitor cells from UCB have focused on their expansion and certainly impressive increments in their numbers have been reported (18). However, the conditions and mechanisms that control their proliferation, expansion, and differentiation are not yet completely understood. In the present study we have enriched for a population of primitive UCB cells and analyzed their *in vitro* growth. The major goal of our study was to determine their patterns of proliferation, expansion, and differentiation in the presence of different cytokine combinations.

In most studies reported to date, CD34<sup>+</sup> cells have been purified by flow cytometry (FACS) or by a positive selection using immunomagnetic beads. In the present study, we used a negative selection system (StemSep™, StemCell Technologies, Inc.). The cell population obtained consisted of cells with immature features (63% blasts, 55% CD34<sup>+</sup> cells, and 14% CFC). This demonstrated significant enrichment for primitive cells compared to the MNC fraction (0.8% CD34<sup>+</sup> cells and 0.4% CFC). It is noteworthy that although the percentage of CD34<sup>+</sup> cells in our study was lower than that reported previously by others, using FACS or positive selection (55% in our study vs. 85–99% in previous works) cloning efficiency was within the levels observed in such reports (14% in our study vs. 8–18% in previous works) (22–24).



**Figure 3.** Expansion of the UCB-derived, CD34<sup>+</sup>-enriched cell population in liquid cultures supplemented with the following: no cytokines (control); SF + IL-6; SF + IL-6 + IL-3 + EPO (ECM); SF + IL-6 + GM-CSF + G-CSF (MCM), or SF + IL-6 + IL-3 + EPO + GM-CSF + G-CSF (E/MCM). Results represent median values from 8 to 12 experiments and correspond to the fold-increase as compared to input numbers. On day 5, only increments with ECM and E/MCM were statistically significant ( $p < 0.05$ ) compared to input values. On day 10, there was no significant difference between the expansion observed with MCM and E/MCM.

In keeping with previous studies, the selected cell population was unable to grow in the absence of recombinant cytokines, which confirms their need for growth factors for proliferation and expansion. Differentiation was also minimal in the absence of such molecules. Addition of SF and IL-6 resulted in a slight increase in total cell numbers; however, this cytokine combination was unable to expand or even sustain the number of CFC. This is similar to the report by Ciuttini et al. (24), who observed proliferation of CD34<sup>+</sup> cells in the presence of SF or SF + IL-3 + IL-6, although levels of CFC showed a marked decrease.

Among the different cytokine combinations tested, ECM (SF + IL-6 + IL-3 + EPO) induced a rapid proliferation of

the CD34<sup>+</sup>-enriched cell population with a selective stimulation of erythropoiesis (as observed at both the levels of CFC and precursor/mature cells). However, this stimulation was only transient, suggesting that there was a rapid exhaustion of erythroid progenitor cells within the first 10 days. This latter notion was confirmed when assessing the levels of both CD34<sup>+</sup> cells and CFC. These results are in accordance with those reported previously by Mayani and Lansdorp (25), who also showed a transient stimulation of erythropoiesis in serum-free liquid cultures of different CD34<sup>+</sup> cell subpopulations supplemented with the same four cytokines.

The reason for the inability to sustain erythropoiesis in long-term liquid cultures is not yet clear. Studies by Piacibello and colleagues have shown that the presence of IL-3 in liquid cultures of CD34<sup>+</sup> cells could be negative, in that this factor may inhibit long-term generation of CFC by inducing their maturation (26). In our culture system, the presence of IL-3 correlated with a decrease in erythropoiesis and additionally a reduction in the number of myeloid CFC on day 20; thus, IL-3 may not be a factor to be included in cultures aimed at sustaining erythropoiesis, and perhaps neither in myelopoiesis, for long periods of time. Dexter-type, long-term marrow cultures in which an adherent stromal layer is present are also unable to sustain erythropoiesis for >4 weeks, whereas myelopoiesis can be sustained for up to 16 weeks (27,28). Attempts to stimulate erythropoiesis by addition of exogenous EPO have resulted in a further but also transient stimulation of CFU-E and

**Table 2.** Colony-forming cell (CFC) expansion in liquid cultures of UCB cells obtained after negative selection

	Day 0	Day 10		Day 20	
		Myeloid	Erythroid	Myeloid	Erythroid
Control	1	0.08	0.03	0.01	BD
SF + IL-6	1	0.46	0.13	0.19	BD
ECM	1	1.72	2.99	0.05	BD
MCM	1	6.95	0.46	3.47	0.03
E/MCM	1	7.31	3.14	1.94	0.08

Results represent median values from 8 to 12 experiments and correspond to the fold-increase in the number of myeloid (1 = 4,520 CFC) and erythroid (1 = 6,780 CFC) progenitors. BD = below detection.

**Table 3.** Cell morphology in liquid cultures of UCB cells obtained after negative selection

Cytokines	Cell type	Day 10	Day 20	Day 30
Control	Granulocytic	15.8	NA	NA
	Monocytic	31.8	NA	NA
	Erythroid	BD	NA	NA
	Blasts	52.3	NA	NA
SF + IL-6	Granulocytic	35.7	34.2	NA
	Monocytic	28.3	64.7	NA
	Erythroid	BD	BD	NA
	Blasts	31.4	BD	NA
ECM	Granulocytic	13.1	51.3	42.2
	Monocytic	5.2	14.7	35.4
	Erythroid	78.9	34.0	22.1
	Blasts	3.1	BD	BD
MCM	Granulocytic	66.5	62.9	52.1
	Monocytic	22.7	37.0	47.8
	Erythroid	BD	BD	BD
	Blasts	10.3	BD	BD
E/MCM	Granulocytic	27.2	40.2	37.1
	Monocytic	11.5	28.5	54.6
	Erythroid	57.8	33.1	8.6
	Blasts	3.3	BD	BD

Results represent median values from 8 to 12 experiments and correspond to the percentage of the indicated cell types. BD = below detection; NA = not assessed due to insufficient number of cells. Cell morphology on day 0 is indicated in Table 1.

erythroblasts (29). Thus, it appears that long-term, *in vitro* generation of erythroid progenitor and precursor/mature cells requires conditions not yet characterized.

Significantly higher levels of proliferation and expansion of progenitor cells were observed in the presence of SF, IL-6, GM-CSF, and G-CSF (MCM) with a preferential stimulation of myelopoiesis (selective production of myeloid CFC and precursor/mature cells of the granulocytic and monocytic lineages). Interestingly, stimulation of myelopoiesis was sustained for the entire culture period (>30 days) even in cultures that also contained IL-3 and EPO (E/MCM). These results suggest that myeloid progenitors (those responding to GM-CSF and G-CSF) possess higher expansion potentials than their erythroid counterparts; thus, there is a more prolonged generation of myeloid CFC in culture, with the subsequent production of mature granulocytes and monocytes. In this regard, it is noteworthy that previous studies have demonstrated the existence of a primitive myeloid progenitor with very high proliferation and expansion potentials (30,31). This type of progenitor cell could be that sustaining long-term myelopoiesis in our culture system.

It is noteworthy that on day 10 there was a good correlation between the expansion of myeloid progenitors (7-fold) and that of CD34<sup>+</sup> cells (9- to 13-fold) under MCM and E/MCM conditions; however, on day 20 no CD34<sup>+</sup> cells were detected despite the fact that myeloid CFC continued to show a 2- to 3.5-fold increase. At least two different possibilities exist that could explain these results: first, a down-regulation of the CD34 molecule on the cell surface of progenitor

cells, thus CFC are now CD34<sup>low/-</sup>, and second, CD34<sup>+</sup> cells remain present in culture but their frequency is now too low to be detected by immunocytochemistry. At present, our results do not allow us to distinguish between these possibilities.

Future studies will be necessary in which serum-free medium is used, because sera may contain inhibitory factors that interfere with the effect of the recombinant cytokines (32,33) and in which thrombopoietin (TPO) and FLT-3 ligand (FL) are included, in that these cytokines have been shown to exert profound stimulatory effects on stem and progenitor cell growth, particularly in terms of their long-term, self-renewal capacity (18,26,32-35). Indeed, as compared to studies in which TPO and FL were used, the levels of proliferation and expansion of progenitor cells observed in our study were lower (32-35).

Finally, from a practical point of view we have shown that significant, cytokine-dependent proliferation and expansion of CD34<sup>+</sup> cells can be achieved even when the input cell population contains a high proportion of accessory (CD34<sup>-</sup>) cells, a situation becoming common in clinically oriented protocols aimed at enrichment of primitive hematopoietic cells for further *ex vivo* expansion and transplantation. Clearly, by using FACS it is possible to obtain cell populations consisting of >95% CD34<sup>+</sup> cells; however, FACS is costly and time consuming. Thus, it may not be suitable for clinically oriented procedures. In this regard, immunomagnetic columns for positive or negative selection have become relevant. It has been suggested that *ex vivo* expansion of CD34<sup>+</sup> cells must be at least 500-fold for total cells and 10-fold for progenitor cells to be of clinical relevance (32). Clearly, these numbers can be achieved in our culture system. Furthermore, our results also demonstrate the selective generation of expanded numbers of morphologically recognizable precursor cells that may be of clinical relevance in hematopoietic cell transplant settings, because transplantation of such cells would help to reduce the periods of neutropenia commonly observed after both autologous and allogeneic transplants (36).

### Acknowledgments

This study was supported by grants 30945M from the National Council of Science and Technology (Conacyt, Mexico) and FP0038-1027 from the IMSS, Mexico.

### References

- Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993;81:2844-2853.
- Szilvassy SJ, Hoffman R. Enriched hematopoietic stem cells: basic biology and clinical utility. *Biol Blood Marrow Transpl* 1995;1:3-17.
- Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997;88:287-298.
- Sutherland DR, Keating A. The CD34 antigen: structure, biology and potential clinical applications. *J Hematother* 1992;1:115-129.
- Healy L, May G, Gale K, Greaves MF. The stem cell antigen CD34



- functions as a regulator of hematopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:12240–12244.
6. Civin CI, Gore SD. Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J Hematother* 1993;2:137–144.
  7. Metcalf D. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? *Blood* 1993;82:3515–3523.
  8. Moore MAS. Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. *Blood* 1991;78:1–19.
  9. Cairo MS, Wagner JE. Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation. *Blood* 1997;90:4665–4678.
  10. Mayani H, Lansdorp PM. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells* 1998;16:153–165.
  11. Lansdorp PM, Dragowska W, Mayani H. Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J Exp Med* 1993;178:787–791.
  12. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM. Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells. *Blood* 1993;81:3252–3258.
  13. Migliaccio AR, Migliaccio G, Adamson J. Expansion of human neonatal progenitor cells *in vitro* under serum-deprived conditions. *Blood Cells* 1994;20:424–429.
  14. Moore MAS, Hoskins I. *Ex vivo* expansion of cord blood-derived stem cells and progenitors. *Blood Cells* 1994;20:468–481.
  15. Abboud MR, Xu F, Payne A, Laver J. Effects of recombinant human steel factor (c-kit ligand) on early cord blood hematopoietic precursors. *Exp Hematol* 1994;22:388–392.
  16. Cardoso A, Li M-L, Batard P, Hatzfeld A, Brown EL, Levesque JP, Sookdeo H, Panterne B, Sansilvestri P, Clark SC, Hatzfeld J. Release from quiescence of CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> human umbilical cord blood cells reveals their potential to engraft adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8707–8711.
  17. Rawlings DJ, Quan SG, Kato RM, Witte ON. Long-term culture system for selective growth of human B-cell progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1570–1574.
  18. Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Severino A, Bergandi D, Ferrario J, Fagioli F, Berger M, Aglietta M. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood* 1997;89:2644–2653.
  19. Mayani H, Gutiérrez-Rodríguez M, Espinoza L, López-Chalini E, Huerta-Zepeda A, Flores E, Sánchez-Valle E, Luna-Bautista F, Valencia I, Ramírez OT. Kinetics of hematopoiesis in Dexter-type long-term cultures established from human umbilical cord blood cells. *Stem Cells* 1998;16:127–135.
  20. Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haematol* 1992;49:225–233.
  21. Metcalf D. Hemopoietic colonies. *In vitro* cloning of normal and leukemic cells. Berlin, Germany: SpringerVerlag;1977. pp. 1–227.
  22. Baines P, Mayani H, Bains M, Fisher J, Hoy T, Jacobs A. Enrichment of CD34 (My10)-positive myeloid and erythroid progenitors from human marrow and their growth in cultures supplemented with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Exp Hematol* 1988;16:785–789.
  23. Durand B, Eddleman K, Migliaccio AR, Migliaccio G, Adamson JW. Long-term generation of colony-forming cells (CFC) from CD34<sup>+</sup> human umbilical cord blood cells. *Leuk Lymphoma* 1993;11:263–273.
  24. Cicuttini FM, Welch KL, Boyd AW. The effect of cytokines on CD34<sup>+</sup> Rh-123<sup>high</sup> and <sup>low</sup> progenitor cells from human umbilical cord blood. *Exp Hematol* 1994;22:1244–1251.
  25. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM. Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34<sup>+</sup> cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood* 1993;82:2664–2672.
  26. Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Severino A, Dané A, Gammaitoni L, Aglietta M. Differential growth factor requirement of primitive cord blood hematopoietic stem cell for self renewal and amplification vs. proliferation and differentiation. *Leukemia* 1998;12:718–727.
  27. Gartner S, Kaplan HS. Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:4756–4759.
  28. Coulombel L, Eaves AC, Eaves CJ. Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive hemopoietic progenitors in the adherent layer. *Blood* 1983;62:291–297.
  29. Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A. Modulation of erythropoiesis and myelopoiesis by exogenous erythropoietin in human long-term marrow cultures. *Exp Hematol* 1990;18:174–179.
  30. McNiece IK, Stewart FM, Deacon DM, Temeles DS, Zsebo KM, Clark SC, Quesenberry PJ. Detection of a human CFC with a high proliferative potential. *Blood* 1989;74:609–614.
  31. Mayani H, Lansdorp PM. Proliferation of individual hematopoietic progenitors purified from umbilical cord blood. *Exp Hematol* 1995;23:1453–1462.
  32. Douay L. Experimental culture conditions are critical for *ex vivo* expansion of hematopoietic cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2001;10:341–346.
  33. Gilmore GL, DePasquale DK, Lister J, Shadduk RK. *Ex vivo* expansion of human umbilical cord blood and peripheral blood CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2000;28:1297–1305.
  34. Piacibello W, Sanavio F, Severino A, Dane A, Gammaitoni L, Fagioli F, Perissinotto E, Cavalloni G, Kollet O, Lapidot T, Aglietta M. Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34<sup>+</sup> cord blood cells after *ex vivo* expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood* 1999;93:3736–3749.
  35. Lewis ID, Almeida-Porada G, Du J, Lemischka I, Moore KA, Zanjan ED, Verfaillie CM. Umbilical cord blood cells capable of engrafting in primary, secondary, and tertiary xenogeneic hosts are preserved after *ex vivo* culture in a noncontact system. *Blood* 2001;97:3441–3449.
  36. McNiece IK. *Ex vivo* expansion of hematopoietic cells: what is the clinical need? *J Hematother Stem Cell Res* 2001;10:431–433.

# *In vitro* characterization of two lineage-negative CD34<sup>+</sup> cell-enriched hematopoietic cell populations from human UC blood

P Flores-Guzmán, E Flores-Figueroa, G Martínez-Jaramillo and H Mayani

*Oncology Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center, IMSS, Mexico City, Mexico*

## Background

During the last few years there has been increasing interest, from both biologic and clinical points of view, in the *ex vivo* expansion of umbilical cord blood (UCB)-derived hematopoietic cells. This has brought about the need to characterize different cell populations present in UCB, and to explore different *ex vivo* approaches for the culture, expansion and biologic manipulation of these cells.

## Methods

By using a negative-selection method, two UCB cell populations were obtained that were enriched for primitive lineage-negative (Lin<sup>-</sup>) cells, including those expressing the CD34 Ag (35–93% of the total cells in each fraction). Population I was enriched for CD34<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> cells, whereas population II was enriched for CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup> cells. Both populations were cultured in serum-free liquid cultures supplemented with different combinations of early and late-acting recombinant cytokines (all of them added at 10 ng/mL). Every 5–7 days proliferation, expansion and differentiation capacities of each population were determined, for a total period of 25–42 days.

## Results

Both cell populations showed extensive proliferation and expansion capacities; however, population II [2300- and 232-fold increase in

nucleated and colony-forming cell (CFC) numbers, respectively] was clearly superior in both parameters compared with population I (1120- and 20-fold increase in nucleated and CFC numbers, respectively). Depending on the cytokine combination used, granulocytes, macrophages and erythroblasts were preferentially produced. We also observed that both populations were highly sensitive to the inhibitory effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ , even in the presence of stimulatory cytokines.

## Discussion

This study demonstrates that the two progenitor cell-enriched populations obtained by negative selection possess extensive proliferation and expansion potentials *in vitro*, generating significant numbers of both primitive and mature cells. These cells may be a good alternative to purified CD34<sup>+</sup> cells, obtained by positive selection, for pre-clinical and clinical protocols aimed at the *ex vivo* expansion of UCB cells.

## Keywords

*cytokines, ex vivo expansion, progenitor cells, proliferation, UC blood.*

## Introduction

Umbilical cord blood (UCB) has been recognized as a major source of primitive hematopoietic cells, including stem cells (HSC), as well as multipotent and lineage-committed progenitors (HPC) [1–3]. The importance of UCB-derived cells is twofold: from a biologic point of view, they represent a good model to study cellular and molecular changes that occur in the hematopoietic system during development (e.g. it has been demonstrated that,

compared with their adult BM or peripheral blood (PB) counterparts, UCB cells show higher proliferation and expansion potentials, both *in vivo* and *in vitro* [4,5]). From a clinical point of view, UCB cells have proved to be a good alternative to BM or mobilized PB (mPB) for hematopoietic cell transplantation (HCT); indeed, the results obtained to date in clinical trials are encouraging and indicate that UCB is becoming a first-line HCT modality for certain groups of patients [6–8]. However, a common

finding in UCB transplants is the delay in the kinetics of neutrophil and platelet engraftment [9]. Such a delay seems to be due, at least in part, to the low number of nucleated and CD34<sup>+</sup> cells that are infused into patients receiving UCB, compared with those receiving BM or mPB [10].

During the last few years, there has been increasing interest in the *ex vivo* expansion of UCB-derived HSC and HPC as a mean of increasing the numbers of primitive and mature cells to be infused into patients. Several experimental designs have been reported in which purified CD34<sup>+</sup> cells are cultured under different conditions (e.g. with or without serum; in the presence or absence of stroma cells; in the presence of different combinations of recombinant cytokines), resulting in the generation of significant numbers of progenitor and mature cells [11–13]. Interestingly, some clinical trials have already been performed in which *ex vivo*-expanded UCB cells were infused into patients with hematologic disorders, breast cancer and some metabolic diseases [14,15]. Although infusion of expanded cells did not significantly improve myeloid, erythroid or platelet engraftment, such studies have demonstrated that this procedure is feasible and safe.

It is noteworthy, however, that there are still debatable points of view as to which are the best culture conditions for the optimal *ex vivo* growth of UCB-derived stem and progenitor cells, especially when these cells are going to be taken to the clinic [16,17]. Moreover, there is controversy regarding which cells should be used as the input population for such an expansion (i.e. whole mononuclear cells, total CD34<sup>+</sup> cells, particular CD34<sup>+</sup> cell subpopulations, CD133<sup>+</sup> cells, etc.).

The vast majority of studies reported so far have used purified CD34<sup>+</sup> cells, obtained by positive selection (i.e. FACS or immunomagnetic columns), as the starting cell population. In fact, most of what we know about the proliferation, expansion and differentiation potentials of primitive UCB cells has been derived from studies in which CD34<sup>+</sup> cells are obtained by these methods. In contrast, less is known about the *in vitro* growth capacity of hematopoietic cells obtained by negative selection, that is to say by removal of cells that express lineage-specific surface markers, thus allowing for the enrichment of lineage-negative cells, including stem and progenitor cells [18].

We have previously reported on the characterization of a UCB cell population that was enriched for CD34<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup>

cells after negative selection. In such a study cells were cultured in the presence of FBS and with different combinations of hematopoietic stimulators; this resulted in a 750-fold increase in total cell number and a seven- and fourfold increase in myeloid and erythroid progenitors, respectively [19]. In trying to gain more information regarding the biology of UCB-derived primitive cells, and to contribute to the development of experimental methods for the *ex vivo* generation of progenitor and mature cells, in the present report we have expanded our studies by characterizing two different subpopulations, obtained by negative selection, that were enriched for primitive hematopoietic cells. These cells were cultured in serum-free liquid medium in the presence of different cytokine cocktails, including the cytokines Flt-3-ligand and thrombopoietin, which were not considered in our previous study. We also assessed the effect of the hematopoietic inhibitor tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) on these cells.

## Methods

### Cell collection

UCB cells, collected according to institutional guidelines, were obtained from 11 normal full-term deliveries at the Troncoso Hospital (IMSS, Mexico City, Mexico). These procedures have been approved by the ethical committee of the National Medical Center, IMSS.

### Cell processing

Buffy-coated cells were obtained by centrifugation (400 g for 7 min) and low-density mononuclear cells (MNC; <1.077 g/mL) were isolated using Ficoll–Paque Plus (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Cells were then resuspended in IMDM supplemented with 2% FBS (StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canada). Total numbers of nucleated and viable cells were determined with a hemocytometer, using Turck's solution and trypan blue stain, respectively.

### CD34<sup>+</sup> cell enrichment

Cells expressing the CD34 Ag (CD34<sup>+</sup> cells) were enriched from MNC by negative selection [18] using the StemSep™ system according to the manufacturer's instructions (StemCell Technologies Inc.). Briefly, MNC (50 × 10<sup>6</sup>/mL) were labeled with an Ab cocktail (20 min at room temperature; see below for cocktail description) followed by an incubation with a magnetic colloid (20 min

at room temperature). Cells were then passed through a plastic column in the presence of a magnet. Unwanted (labeled) cells were retained in the column and the desired cells were collected in a plastic tube containing IMDM supplemented with 2% FBS. The whole procedure was performed inside a laminar flow hood. Cells were then centrifuged, resuspended in culture medium and counted.

Two different cell populations were obtained by this procedure. The first one of them was obtained by using an Ab cocktail that included MAb to the following cell-surface Ag: CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b and glycophorin A (Gly A). Thus, this cell population, referred to as population I, was enriched for CD34<sup>+</sup> lineage-negative (Lin<sup>-</sup>) cells. The second population was obtained by using Ab to the following cell-surface Ag: CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD36, CD38, CD45RA, CD56, CD66b and Gly A. Thus, this latter population was also enriched for CD34<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> cells; however, the presence of Ab against CD36, CD38 and CD45RA resulted in the recovery of a cell population (referred to as population II) with a more primitive immunophenotype: CD34<sup>+</sup> CD36<sup>-</sup> CD38<sup>-</sup> CD45RA<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup> cells.

### CD34<sup>+</sup> cell quantification and immunophenotype analysis

On day 0 (before and after negative selection) CD34<sup>+</sup> cells were identified and quantified by immunocytochemistry. This was performed using a commercially available kit (DAKO EnVision<sup>+</sup> System, Peroxidase-Diaminobenzidine; DAKO, Glostrup, Denmark) that uses a specific MAb directed to the CD34 Ag. Slides containing  $40 \times 10^3$  cells were prepared and the whole procedure was carried out according to the manufacturer's instructions. Once the slides were ready, 300–500 cells/slide were scored. In a separate set of experiments, the expression of the Ag CD3, CD14, CD19, CD34, CD38 and Gly A was determined by flow cytometry on a Coulter Epics Altra Flow Cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) by collecting a minimum of 10000 events. Ab against CD3, CD34, CD38 and Gly A were purchased from Caltag Laboratories (Burlingame, CA, USA). Ab against CD14 and CD19 were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA).

### Liquid cultures

Cells obtained after negative selection were resuspended in serum-free expansion medium (StemSpan<sup>TM</sup>; StemCell Technologies Inc.). The culture medium composition was as follows: IMDM supplemented with 1% BSA, 10 µg/mL bovine pancreatic insulin, 200 µg/mL human transferrin,  $10^{-4}$  M 2-mercaptoethanol and 2 mM L-glutamine. The culture medium was supplemented with combinations of the following recombinant hematopoietic cytokines: thrombopoietin (TPO; StemCell Technologies Inc.; added at 10 ng/mL); Flt-3-ligand (FL; StemCell Technologies Inc.; added at 10 ng/mL); Steel Factor (SF; StemCell Technologies Inc.; added at 10 ng/mL); IL-3 (StemCell Technologies Inc.; added at 10 ng/mL); IL-6 (StemCell Technologies Inc.; added at 10 ng/mL); GM-CSF (Molgramostim; Novartis/Schering-Plough, Basel, Switzerland; added at 10 ng/mL); G-CSF (StemCell Technologies Inc.; added at 10 ng/mL) and erythropoietin (EPO; Eprex; Johnson & Johnson, USA; added at 3 U/mL). In some experiments, TNF-α (StemCell Technologies Inc.) was also added at 10 ng/mL. Control cultures contained no recombinant cytokines. Cells were cultured in 24-well tissue culture plates at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air, at a concentration of  $0.8-1 \times 10^5$  cells/mL/well. After 5 days of culture, cells were harvested from the wells, counted and analyzed for progenitor cell content. Secondary cultures were initiated with  $5-10 \times 10^4$  nucleated cells. Cultures were processed in this manner every 5 (population I) or 7 (population II) days.

### Hematopoietic colony assays

HPC capable of forming colonies *in vitro* (colony-forming cells; CFC) were assayed in methylcellulose-based semi-solid cultures (MethoCult<sup>TM</sup>; StemCell Technologies Inc.). The culture medium consisted of 0.9% methylcellulose, 30% FBS, 1% BSA,  $10^{-4}$  M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 50 ng/mL rhSF, 10 ng/mL rhIL-3, 10 ng/mL rhGM-CSF and 3 U/mL rhEPO. Cells obtained after negative selection were plated at a final concentration of  $1-5 \times 10^3$  cells/mL and the cultures were incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. Cells obtained from the liquid cultures on days 5, 10 and 20 were also cultured in this manner; however, the plating cell concentration varied from  $5 \times 10^4$  to  $1 \times 10^4$ , depending on the cell number recovered from the cultures. After 14–17 days of culture, colonies were scored in the same dish



using an inverted microscope. Hematopoietic colonies were classified as follows: CFU-MIX, colonies containing both erythroid and myeloid cells; CFU-E, erythroid clusters of 20–50 hemoglobinized cells; BFU-E, erythroid colonies of more than 50 hemoglobinized cells grouped in one or several clusters. Myeloid colonies comprised the identifiable subpopulations of pure granulocytic colonies (CFU-G), pure macrophagic colonies (CFU-M) and colonies containing both granulocytes and macrophages (CFU-GM).

### Morphologic studies

Cells obtained after negative selection, as well as cells obtained from liquid cultures, were examined on slide preparations stained with Wright-Giemsa stain. Approximately 300 cells/slide were scored.

### Statistics

Results shown correspond to the median (range) or mean  $\pm$  SE of the indicated number of samples. Statistical analysis was performed by using the Student's *t*-test.

## Results

### Progenitor cell enrichment

Among the total number of MNC obtained from UCB samples, CD34<sup>+</sup> cells corresponded to 1.2% (Table 1). After the negative selection procedure for obtaining population I, 1.65% of the initial MNC number was recovered and 49% of these cells expressed the CD34 Ag, representing a 29.7-fold enrichment. This fraction of CD34<sup>+</sup> cells corresponded to 0.82% of the initial MNC, which was slightly lower than the percentage observed by direct immunocytochemistry of MNC (Table 1). After the negative selection procedure for obtaining population II, 0.18% of the MNC was recovered; 72.5% of them expressed the CD34 Ag, which corresponded to 0.13%

of the total number of MNC and 15.8% of the CD34<sup>+</sup> cells present in population I (Table 1).

From the total number of MNC, 0.26% of them were able to produce hematopoietic colonies in semisolid cultures (CFC; Table 1), which was similar to the proportion of CFC observed in previous studies [3]. The proportion of CFC in population I was 11.8%, representing a 45.3-fold enrichment ( $P < 0.05$ ) compared with MNC (Table 1). CFC content in population II (4.8%) was also significantly higher than in the MNC fraction ( $P < 0.05$ ); however, such a proportion was lower than the one observed in population I (Table 1). It is important to point out that in all fractions analyzed (i.e. MNC, population I and population II) the majority of CFC corresponded to erythroid progenitors (52–67% of total CFC). Myeloid CFC corresponded to 26–42% of total CFC, whereas multipotent progenitors corresponded to 1–8%.

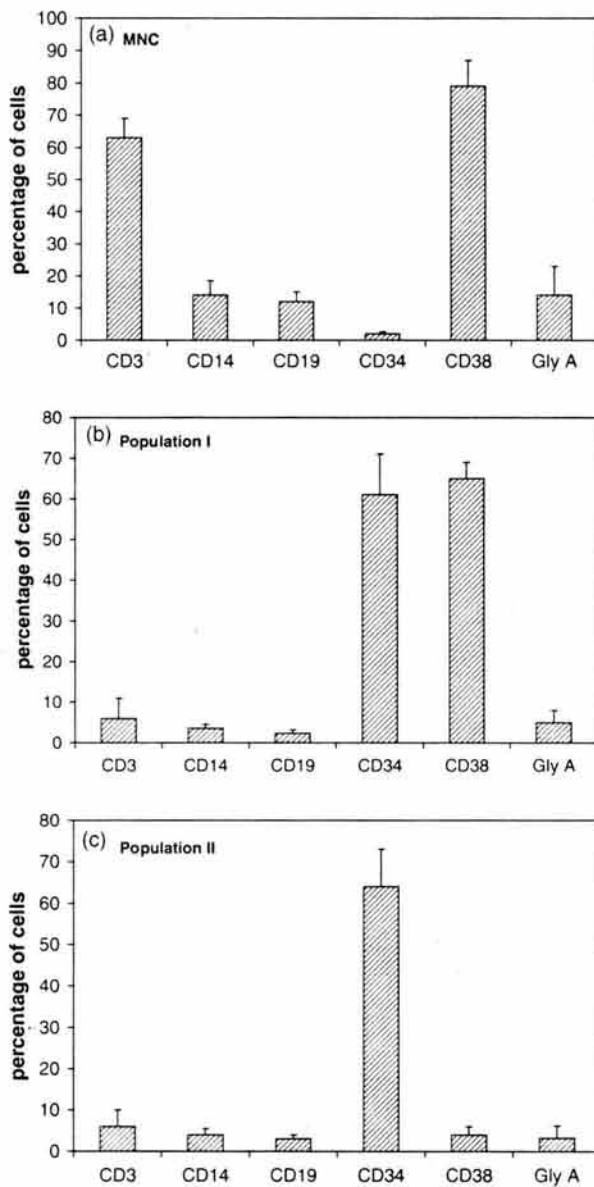
### Immunophenotype and morphology of the cell populations obtained

In order to confirm that the selection system used here was efficient in eliminating mature cells, with a concomitant enrichment for CD34<sup>+</sup> cells, in a separate set of experiments ( $n = 4$ ) the expression of CD3, CD14, CD19, CD34, CD38 and Gly A was determined by flow cytometry, both before and after the selection procedure. As shown in Figure 1a, 63% of MNC expressed CD3, whereas the frequencies of CD14<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> and Gly A<sup>+</sup> cells in this cell fraction were 14%, 12% and 14%, respectively. Almost 80% of MNC expressed CD38; in contrast, only 2% of them were positive for CD34. Among cells present in population I, the frequencies of CD3<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> and Gly A<sup>+</sup> cells were significantly reduced, whereas the frequency of CD38<sup>+</sup> cells remained high. In terms of the proportion CD34<sup>+</sup> cells, a significant increase

**Table 1.** UCB-derived progenitor cell enrichment by negative selection

	Cell recovery	CD34 <sup>+</sup> cells	CFC
Pre-selection (MNC)	100	1.2 (0.5–2.0)	0.26 (0.1–0.6)
Post-selection (population I)	1.65 (0.22–6.51)	49.1 (35.5–62.0)	11.8 (1.3–23.2)
Post-selection (population II)	0.18 (0.03–1.55)	72.5 (43.0–93.0)	4.8 (0–11.5)

Results represent the median (range) from 11 UCB samples and correspond to the percentage of cells before and after enrichment by negative selection. The selection procedure was initiated with  $100–180 \times 10^6$  MNC. Population I, CD34<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> cells; population II, CD34<sup>+</sup> CD36<sup>-</sup> CD38<sup>-</sup> CD45RA<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup> cells.



**Figure 1.** Immunophenotype analysis of UCB cells before (MNC; a) and after negative selection to obtain populations I (b) and II (c). Expression of CD3, CD14, CD19, CD34, CD38 and Gly A was determined by flow cytometry on a Coulter Epics Altra Flow Cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) by collecting a minimum of 10 000 events. Results shown correspond to percentage of cells expressing the specific Ag, and represent mean  $\pm$  SD from four different experiments.

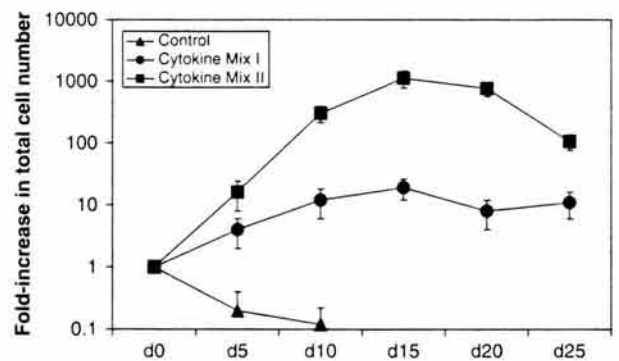
was observed, now corresponding to around 60% of the total cells present in this population (Figure 1b). Population II also contained low levels of cells positive for lineage-specific Ag. It is noteworthy that the proportion of cells positive for CD38 was also significantly decreased. As expected, a high frequency (more than 60%) of CD34<sup>+</sup> cells was observed (Figure 1c). The above results indicated

that the negative selection system used here to obtain populations I and II was efficient in eliminating the majority of lineage-positive cells and in enriching for CD34<sup>+</sup> cells. Also important is the fact that, based on the expression of CD38, populations I and II seemed to correspond to truly different cell fractions.

Among the total nucleated cells included in populations I and II, the majority (59–77%) corresponded to immature forms (lymphoblastoid cells), as determined by Wright-Giemsa staining. The rest consisted mostly of immature granulocytic cells (i.e. myeloblasts, promyelocytes, myelocytes and metamyelocytes) that corresponded to 16–29% of the total cells; monocytic cells (0–7%) and early erythroid cells (0–4%) were also present. No mature granulocytes, monocytes or erythrocytes were observed. These results confirm that the negative selection procedure used here was efficient in eliminating the vast majority of mature lineage-positive cells.

### Proliferation of population I cells

In the present study we have defined cell proliferation as the production of new cells from a particular cell population, regardless of the cell types being produced. Thus, the *in vitro* proliferation of a cell population was determined simply by the total number of cells generated in culture. As shown in Figure 2, these cells depended on the presence of recombinant cytokines for their *in vitro*



**Figure 2.** Proliferation capacity of population I cells (enriched for CD34<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> cells) from UCB. Cells were cultured in the absence (control) or presence of combinations of recombinant cytokines, including SF, FL, TPO and IL-6 (cytokine mix I) or SF, FL, TPO, IL-6, IL-3, G-M-CSF, G-CSF and EPO (cytokine mix II). Results correspond to the fold-increase in total cell number and represent mean  $\pm$  SD from 11 UCB samples. On days 10–25, values in cytokine mix II cultures were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in cytokine mix I.



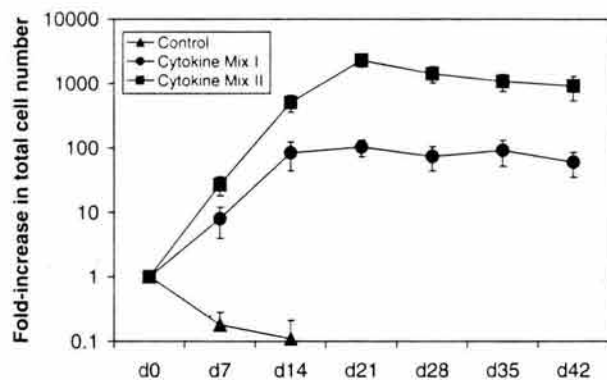
growth. In cultures supplemented with the early-acting cytokines TPO, FL, SF and IL-6, the total number of nucleated cells increased up to 20-fold by day 15. On the other hand, when the cultures were supplemented with the four cytokines mentioned above plus intermediate- and late-acting cytokines (i.e. IL-3, GM-CSF, G-CSF and EPO), the total number of nucleated cells reached a 1120-fold increase by day 15 (Figure 2). In both conditions proliferation was sustained for at least 25 days.

### Proliferation of population II cells

As expected based on their more primitive immunophenotype, cells present in population II showed a higher proliferation potential compared with population I cells (Figure 3). Indeed, in cultures supplemented with TPO, FL, SF and IL-6, the total number of nucleated cells increased 103-fold by day 21, whereas in the presence of all eight cytokines their numbers increased 2300-fold, also by day 21. Interestingly, these levels were sustained for more than 40 days (Figure 3). In keeping with previous observations, population II cells were unable to grow in the absence of recombinant cytokines.

### Expansion of population I cells

The expansion potential of a particular cell population has been defined as its capacity to generate new cells that



**Figure 3.** Proliferation capacity of population II cells (enriched for CD34<sup>+</sup> CD36<sup>-</sup> CD38<sup>-</sup> CD45RA<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup> cells) from UCB. Cells were cultured in the absence (control) or presence of combinations of recombinant cytokines, including SF, FL, TPO and IL-6 (cytokine mix I) or SF, FL, TPO, IL-6, IL-3, GM-CSF, G-CSF and EPO (cytokine mix II). Results correspond to the fold-increase in total cell number and represent mean  $\pm$  SD from 11 UCB samples. On days 14–42, values in cytokine mix II cultures were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in cytokine mix I.

**Table 2.** *In vitro* expansion of hematopoietic progenitor cells from UCB population I

	Myeloid		Erythroid	
	Day 10	Day 15	Day 10	Day 15
Control	0.01	ND	0.01	ND
Cytokine mix I	4.0 <sup>a</sup>	1.1	0.4 <sup>a</sup>	0.17
Cytokine mix II	10.5 <sup>a,b</sup>	20.1 <sup>b</sup>	2.2 <sup>a,b</sup>	3.2 <sup>b</sup>

Results represent fold increase (day 0 = 1) in the numbers of myeloid and erythroid CFC on the indicated days of culture, and correspond to mean values from 11 samples. ND, not determined due to insufficient number of cells; <sup>a</sup>significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in control cultures, <sup>b</sup>significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in cytokine mix I cultures. Cytokine mix I, TPO, FL, SF, IL-6; cytokine mix II, TPO, FL, SF, IL-6, IL-3, GM-CSF, G-CSF, EPO.

possess immunophenotypic and/or functional characteristics similar to the original population. Accordingly, in the present study we determined the expansion potential of populations I and II by assessing their capacity to generate new progenitor cells (CFC). As shown in Table 2, myeloid progenitors contained in population I increased their numbers fourfold (on day 10) when cultured in the presence of the four early-acting cytokines; erythroid cells, on the other hand, showed no increase under such conditions. In the presence of all eight cytokines, myeloid CFC levels increased 20-fold (on day 15) whereas the numbers of erythroid CFC increased threefold (Table 2).

### Expansion of population II cells

Cells contained within population II showed significantly higher expansion potentials compared with population I cells. When cultures were supplemented with TPO, FL, SF and IL-6, myeloid CFC levels increased 77-fold (on day 21) and their erythroid counterparts increased 16-fold (on day 14) (Table 3). In the presence of TPO, FL, SF, IL-6, IL-3, GM-CSF, G-CSF and EPO, myeloid and erythroid progenitor levels increased 232- and 23-fold, respectively. Interestingly, the numbers of these progenitors were sustained at high levels for more than 3 weeks.

### Differentiation of population I cells

In the presence of TPO, FL, SF and IL-6, the majority of the cells generated in culture after 10 or 20 days corresponded to the myeloid lineage (granulocytic and monocytic cells; Table 4). Immature erythroid cells (mostly proerythroblasts) comprised less than 5% of total cells. In contrast, when all eight cytokines were added to

**Table 3.** *In vitro* expansion of hematopoietic progenitor cells from UCB population II

	Myeloid			Erythroid		
	Day 7	Day 14	Day 21	Day 7	Day 14	Day 21
Control	0.5	ND	ND	0.8	ND	ND
Cytokine mix I	22.6 <sup>a</sup>	68.1	77.1	8.6 <sup>a</sup>	16.5	4.4
Cytokine mix II	41.7 <sup>a,b</sup>	232.7 <sup>b</sup>	123.2 <sup>b</sup>	23.3 <sup>a,b</sup>	20.3	18.3 <sup>b</sup>

Results represent fold increase (day 0 = 1) in the numbers of myeloid and erythroid CFC on the indicated days of culture, and correspond to mean values from 11 samples. ND, not determined due to insufficient number of cells; <sup>a</sup>significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in control cultures; <sup>b</sup>significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in cytokine mix I cultures. Cytokine mix I, TPO, FL, SF, IL-6; cytokine mix II, TPO, FL, SF, IL-6, IL-3, GM-CSF, G-CSF, EPO.

the cultures, a significant proportion of the cells corresponded to those of the erythroid lineage (erythroblasts at different stages of maturation). This was more evident at day 10 of culture, and it was very probably because of the presence of IL-3 and EPO. Lymphoblastoid cells were still detected, although at very low levels (<4%; Table 4).

### Differentiation of population II cells

In cultures of population II cells, addition of TPO, FL, SF and IL-6 resulted in the selective development of myeloid precursors and mature cells, which together comprised the vast majority of the nucleated cells (>90%) on days 14 and 21 (Table 5). Erythroid cells corresponded with less than 9%, whereas lymphoblastoid cells reached less than 1% by day 21. When cultures were supplemented with TPO, FL, SF, IL-6, IL-3, GM-CSF, G-CSF and EPO, erythroblasts corresponded to 50% and 40% of the total cells on days 14 and 21, respectively. The rest of the cells consisted of granulocytes and monocytes/macrophages; lymphoblastoid cells, on the other hand, represented less than 1%.

### TNF- $\alpha$ effect on populations I and II

TNF- $\alpha$  has been recognized as one of the major inhibitory molecules that participate in hematopoiesis. It is produced by different cell types of the hematopoietic microenviron-

ment and is capable of inducing apoptosis in both primitive and mature hematopoietic cells [20,21]. Accordingly, we wanted to assess the response of both cell populations to this hematopoietic inhibitor. Such a cytokine showed a strong inhibitory effect as proliferation of population I cells was significantly reduced, even in cultures supplemented with early-, intermediate- and late-acting stimulators (Figure 4). This effect was more evident after 15 and 20 days of culture, and it was more pronounced in cultures that contained early-acting cytokines only. Similar effects of TNF- $\alpha$  were observed in cultures of population II cells (Figure 5).

### Discussion

During the last decade, UCB has emerged as an important alternative to BM or mPB for HCT. The results reported to date are encouraging and demonstrate that UCB can be used not only for children but also for adult patients. However, a common finding in UCB transplants is the delay in the kinetics of neutrophil and platelet engraftment [9]. Such a delay seems to be due, at least in part, to the low number of nucleated and CD34<sup>+</sup> cells that are infused into patients receiving UCB, compared with those receiving BM or mPB [10].

One approach to improve the speed of engraftment, especially in adult transplants, has been the *ex vivo*

**Table 4.** *In vitro* differentiation patterns of population I cells in response to different hematopoietic cytokines

	Day 10				Day 20			
	LB	G	M	E	LB	G	M	E
Cytokine mix I	3.7	52.7	38.8	4.4	1.1	49.4	45.8	2.6
Cytokine mix II	1.9	32.1	14.6	51.2	ND	48.8	32.5	18.0

Results represent percentage of cells of each particular lineage and correspond to mean values from 11 separate experiments. LB, lymphoblastoid cells; G, granulocytic cells; M, monocytic cells; E, erythroid cells. ND, not detected. Mean values on day 0 were as follows: LB, 69.7%; G, 23.8%; M, 3.6%; E, 1.7%. Cytokine mix I, TPO, FL, SF, IL-6; cytokine mix II, TPO, FL, SF, IL-6, IL-3, GM-CSF, G-CSF, EPO.

**Table 5.** *In vitro* differentiation patterns of population II cells in response to different hematopoietic cytokines

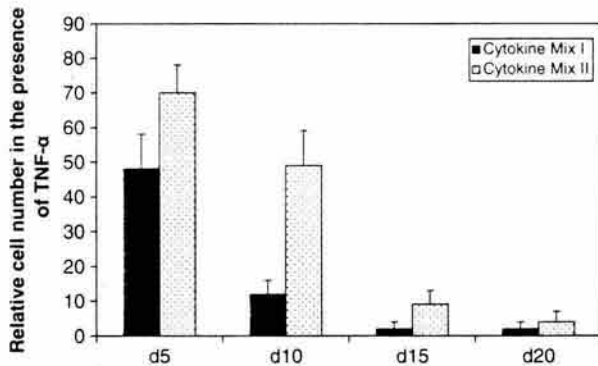
	Day 14				Day 21			
	LB	G	M	E	LB	G	M	E
Cytokine mix I	4.0	43.1	46.2	5.6	0.5	54.9	34.6	8.2
Cytokine mix II	0.4	28.1	21.3	49.6	0.9	31.9	27.5	39.3

Results represent percentage of cells of each particular lineage and correspond to mean values from 11 separate experiments. LB, linfoblastoid cells; G, granulocytic cells; M, monocytic cells; E, erythroid cells. Mean values on day 0 were as follows: LB, 71.3%; G, 22.3%; M, 4.6%; E, 0.2%. Cytokine mix I, TPO, FL, SF, IL-6; cytokine mix II, TPO, FL, SF, IL-6, IL-3, GM-CSF, G-CSF, EPO.

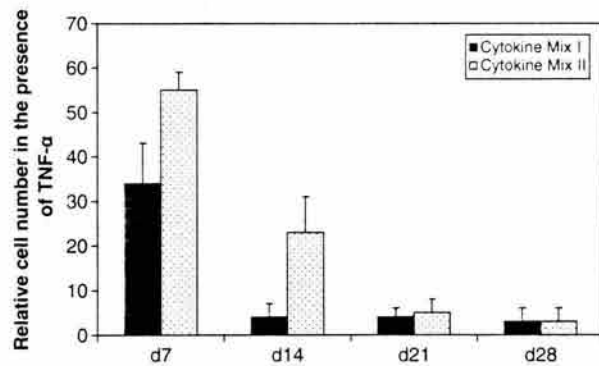
generation of primitive and mature hematopoietic cells by using particular culture systems, so increased number of such cells can be infused into patients. To date, however, there is still controversy regarding the cells that should be used as the input population and the optimal experimental conditions for their *ex vivo* expansion. These issues have brought about the need to characterize different cell populations present in UCB, and to explore different *ex vivo* approaches for the culture, expansion and biologic manipulation of these cells. In trying to contribute to our understanding of the biology of primitive hematopoietic cells present in UCB, and to the development of culture systems for their expansion and manipulation, in the present study we have obtained, by means of negative

selection, two different UCB-derived cell populations, and assessed their proliferation, expansion and differentiation potentials in response to different cytokine combinations.

The two populations obtained (population I and population II) contained reduced levels of mature cells expressing lineage-specific markers; on the other hand, 35–93% of the total cells in each fraction corresponded to cells expressing CD34; thus both populations were enriched for CD34<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> cells. CD34<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> cells present in population II further showed reduced levels of CD38 (and very probably of CD36 and CD45RA as well), thus representing a more primitive cell subpopulation. This notion was supported by the fact that population II corresponded with only 0.18% of total MNC (compared



**Figure 4.** Inhibitory effects of TNF- $\alpha$  on population I cells. Cells were cultured in the presence of combinations of recombinant cytokines, including SF, FL, TPO and IL-6 (cytokine mix I) or SF, FL, TPO, IL-6, IL-3, GM-CSF, G-CSF and EPO (cytokine mix II) with or without TNF- $\alpha$ . Results (mean  $\pm$  SD) correspond to the relative cell number (percentage) of nucleated cells in cultures supplemented with TNF- $\alpha$  compared with cultures without TNF- $\alpha$  (which correspond to 100%). At all time points analyzed, values in TNF- $\alpha$ -supplemented cultures were significantly lower ( $P < 0.05$ ) than in cultures without TNF- $\alpha$ . On days 5 and 10, values in cultures containing cytokine mix I and TNF- $\alpha$  were significantly lower than in cultures supplemented with cytokine mix II and TNF- $\alpha$ .



**Figure 5.** Inhibitory effects of TNF- $\alpha$  on population II cells. Cells were cultured in the presence of combinations of recombinant cytokines, including SF, FL, TPO and IL-6 (cytokine mix I) or SF, FL, TPO, IL-6, IL-3, GM-CSF, G-CSF and EPO (cytokine mix II) with or without TNF- $\alpha$ . Results (mean  $\pm$  SD) correspond to the relative cell number (percentage) of nucleated cells in cultures supplemented with TNF- $\alpha$  compared with cultures without TNF- $\alpha$  (which correspond to 100%). At all time points analyzed, values in TNF- $\alpha$ -supplemented cultures were significantly lower ( $P < 0.05$ ) than in cultures without TNF- $\alpha$ . On days 7 and 14, values in cultures containing cytokine mix I and TNF- $\alpha$  were significantly lower than in cultures supplemented with cytokine mix II and TNF- $\alpha$ .

with population I, which corresponded with 1.65%) and contained a lower percentage of CFC (4.8% of total cells in the fraction vs. 11.8% in population I). It is clear, then, that both cell fractions represented distinct, although probably overlapping, populations.

The total number of CD34<sup>+</sup> cells present in population I corresponded to 69% of the initial CD34<sup>+</sup> cell number contained in the MNC fraction, which indicates that the majority of these cells were recovered by this method of selection. This observation is important if we consider that previous studies have shown that CD34<sup>+</sup> cell selection by FACS, prior to expansion, may result in significant losses (up to 60%) of the progenitor cell content in the MNC fraction, besides being time-consuming and costly [17,22].

Under the culture conditions described here (i.e. in the presence of the eight-cytokine combination), population I cells showed proliferation and expansion potentials that resulted in a 1120-fold increase in total cell number, a 20-fold increase in myeloid progenitors and a 3.2-fold increase in erythroid progenitors. These results were clearly superior to those observed in our previous study (750-fold increase in total cells, 7.3-fold in myeloid CFC and 1.9-fold in erythroid CFC). In the presence of the four early-acting cytokines, a 19-fold increase in total cell number was observed, together with a fourfold increase in myeloid CFC; this was also significantly higher than the increase observed in our previous study in the presence of SF and IL-6 (3.7-fold increase in total cells and no increase in myeloid or erythroid CFC). Such differences are probably the result of the presence of TPO and FL, two potent early-acting stimulators that were not included in our previous report and that have been shown to be key players in the *in vitro* growth of hematopoietic cells [11,13,23]. The fact that there was no addition of human or bovine sera, which have been shown to contain some inhibitory molecules, is also important.

In keeping with the fact that it contained a more primitive subset of CD34<sup>+</sup> cells, population II showed significantly higher proliferation and expansion potentials than population I. With the eight-cytokine cocktail, a 2300-fold increase in total cells was achieved, whereas myeloid and erythroid CFC increased their numbers 232- and 23-fold, respectively. On the other hand, in the presence of the four early acting cytokines, a 103-fold increase in total cells was observed and myeloid and erythroid progenitors were increased 77- and 16-fold, respectively. Furthermore, cultures of population II cells

were sustained for longer periods of time than cultures of population I cells. It is noteworthy, however, that the actual number of CD34<sup>+</sup> cells in population II corresponded with only 12% of the initial number of these cells in the MNC fraction, an issue that has to be kept in mind when considering possible clinical applications of this system.

In terms of cell differentiation, our study indicated that mature cell production depended on the cytokine cocktail used. Granulocytes and monocytes were preferentially generated in the absence of IL-3 and EPO, whereas erythroblast production was favored when the latter cytokines were added to the cultures. These results are in keeping with our previous study [19]. It is also noteworthy that in this experimental system all cytokines used were added at a relatively low concentration (10 ng/mL) whereas in most studies reported cytokines, such as TPO, FL and SF, are usually added at 50–100 ng/mL [3,11,13,16]. This observation may have important cost implications when considering this type of procedure for clinical settings.

Interestingly, both cell populations studied here were highly sensitive to the inhibitory effects of TNF- $\alpha$ , even in the presence of the eight-cytokine cocktail. This is in keeping with previous studies in which the proliferation and expansion capacities of purified CD34<sup>+</sup> cell subsets from UCB were significantly decreased by this cytokine [24].

Recently, Forraz *et al.* [25] reported on the identification of a Lin<sup>-</sup> cell population from UCB that was enriched for CD34<sup>+</sup> cells (14.4%), CFC (2.5%) and contained significant numbers of LTC-IC. This population corresponded to 0.1% of UCB MNC, and showed an extensive expansion capacity when cultured in the presence of TPO, FL and SF. From such a study, it is clear that the cell population described shares some biologic properties with the cell populations reported by us; however, it is noteworthy that the former contained lower levels of CD34<sup>+</sup> cells and CFC compared with populations I and II of the present study.

As mentioned previously, there is some controversy regarding the input cell population that should be used in clinically orientated expansion protocols [17]. Studies in which UCB cells were cultured in Teflon cell culture bags in the presence of SF, G-CSF and TPO have demonstrated that purification of CD34<sup>+</sup> cells prior to expansion results in higher production of HSC and HPC compared with cultures initiated with unselected cells [26]. In contrast,



some reports suggest that culture of UCB MNC on mesenchymal stem cells results in significant expansion of mature and progenitor cells [27]. Furthermore, others have found that when a dual-chamber culture system separated by a dialysis membrane is used, culture of whole UCB gives significantly higher increments in total cells and CFC compared with cultures of MNC and purified CD34<sup>+</sup> cells [28].

The results of the present study demonstrate that progenitor cell-enriched populations, obtained by negative selection from UCB, possess extensive proliferation and expansion potentials, generating significant numbers of both primitive and mature cells *in vitro*. The increments observed in cell numbers are comparable to those reported by other groups using purified CD34<sup>+</sup> cells obtained by positive selection [3,16,17,29–31]. Thus it is clear that progenitor cell-enriched populations obtained by negative selection could be a good alternative to purified CD34<sup>+</sup> cells for pre-clinical and clinical protocols aimed at the *ex vivo* expansion of UCB cells, a procedure that has already been used in some clinical trials and is likely to become more relevant in the years to come [14,15,32–38].

### Acknowledgements

This study was partially supported by grant No. FP-2004 from the Mexican Institute of Social Security (IMSS, Mexico), and grant No. 7204 from the National Council of Science and Technology (CONACYT, Mexico).

### References

- 1 Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G *et al*. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3828–32.
- 2 Cairo MS, Wagner JE. Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation. *Blood* 1997;90:4665–78.
- 3 Mayani H, Lansdorp PM. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells* 1998;16:153–65.
- 4 Lansdorp PM, Dragowska W, Mayani H. Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J Exp Med* 1993;178:787–91.
- 5 Szilvassy SJ. The biology of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* 2003;34:446–60.
- 6 Gluckman E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2000;28:1197–205.
- 7 Laughlin MJ, Barker J, Bambach B *et al*. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med* 2001;344:1815–22.
- 8 Chao NJ, Koh LP, Long GD *et al*. Adult recipients of umbilical cord blood transplants after nonmyeloablative preparative regimens. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004;10:569–75.
- 9 Rocha V, Wagner JE, Sobocinski K *et al*. Comparison of graft-vs-host disease in children transplanted with HLA identical sibling umbilical cord blood vs HLA identical sibling bone marrow transplant. *N Engl J Med* 2000;342:1846–54.
- 10 Migliaccio A, Adamson JW, Stevens CE *et al*. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood* 2000;96:2717–22.
- 11 Piacibello W, Sanavio F, Garetto L *et al*. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood* 1997;89:2644–53.
- 12 Summers YJ, Heyworth CM, De Winter EA *et al*. Cord blood G<sub>0</sub> CD34<sup>+</sup> cells have a thousand-fold higher capacity for generating progenitors *in vitro* than G<sub>1</sub> CD34<sup>+</sup> cells. *Stem Cells* 2001;19:505–13.
- 13 Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzman P. Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation. *Arch Med Res* 2003;34:476–88.
- 14 Shpall EJ, Quinones R, Giller R *et al*. Transplantation of *ex vivo* expanded cord blood cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8:368–76.
- 15 Jaroscek J, Goltry K, Smith A *et al*. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with *ex vivo*-expanded UCB cells: results of a phase I trial using the Aastrom-Replicell System. *Blood* 2003;101:5061–7.
- 16 Douay L. Experimental culture conditions are critical for the *ex vivo* expansion of hematopoietic cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2001;10:341–6.
- 17 Butler AC, Fitzsimons EJ, Graham GJ. *Ex vivo* expansion of cord blood cells: the clinical potential. In: Cohen SBA, Gluckman E, Rubinstein P, Madrigal JA, eds. *Cord Blood Characteristics*. UK: Martin Dunitz, 2000: 169–203.
- 18 Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* 2003;34:461–75.
- 19 Flores-Guzman P, Gutierrez-Rodriguez M, Mayani H. *In vitro* proliferation, expansion and differentiation of a CD34<sup>+</sup> cell-enriched hematopoietic cell population from human umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. *Arch Med Res* 2002;33:107–14.
- 20 Dufour C, Corcione A, Svahn J *et al*. TNF-alpha and IFN-gamma are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF-alpha suppresses erythropoiesis *in vitro*. *Blood* 2003;102:2053–9.
- 21 Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edge sword. *Nat Rev Immunol* 2003;3:745–56.
- 22 Collins RH. CD34<sup>+</sup> selected cells in clinical transplantation. *Stem Cells* 1994;21:577–85.
- 23 Ueda T, Tsuji K, Yoshino H *et al*. Expansion of human NOD/SCID repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and IL-6 receptor. *J Clin Invest* 2000;105:1013–21.

- 24 Mayani H, Little M-T, Dragowska W *et al.* Differential effects of the hematopoietic inhibitors MIP-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ , and TNF- $\alpha$  on cytokine-induced proliferation of subpopulations of CD34<sup>+</sup> cells purified from cord blood and fetal liver. *Exp Hematol* 1995; 23:422–7.
- 25 Forraz N, Pettengell R, McGuckin CP. Characterization of a lineage-negative stem-progenitor cell population optimized for *ex vivo* expansion and enriched for LTC-IC. *Stem Cells* 2004; 22:100–8.
- 26 Briddell RA, Kern BP, Zilm KL *et al.* Purification of CD34<sup>+</sup> cells is essential for optimal *ex vivo* expansion of umbilical cord blood cells. *J Hematother* 1997;6:145–50.
- 27 McNiece I, Harrington J, Turney J *et al.* *Ex vivo* expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 2004;6:311–7.
- 28 Ryu K-H, Shin H-Y, Ahn H-S *et al.* Comparison of efficiency of *ex vivo* expansion of whole blood, mononuclear cells and purified CD34<sup>+</sup> cells from human umbilical cord blood. *Haematologica* 2004;89:606–7.
- 29 Denning-Kendall PA, Nicol A, Horsley H *et al.* Is *in vitro* expansion of human cord blood cells clinically relevant? *Bone Marrow Transplant* 1998;21:225–32.
- 30 Ohmizono Y, Sakabe H, Kimura T *et al.* Thrombopoietin augments *ex vivo* expansion of human cord blood-derived hematopoietic progenitors in combination with stem cell factor and flt3 ligand. *Leukemia* 1997;11:524–30.
- 31 Migliaccio G, Migliaccio AR, Druzin ML *et al.* Long-term generation of colony-forming cells in liquid culture of CD34<sup>+</sup> cord blood cells in the presence of recombinant human stem cell factor. *Blood* 1992;79:2620–7.
- 32 Stiff P, Pecora AL, Parthasarathy M. Umbilical cord blood transplants in adults using a combination of unexpanded and *ex vivo* expanded cells: preliminary clinical observations (abstract). *Blood* 1998;92(Suppl):646a.
- 33 Pecora AL, Stiff P, Jennis A *et al.* Prompt and durable engraftment in two older adult patients with high risk chronic myelogenous leukemia (CML) using *ex vivo* expanded and unmanipulated unrelated umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:797–9.
- 34 Kogler G, Nurnberger W, Fischer J *et al.* Simultaneous cord blood transplantation of *ex vivo* expanded together with non-expanded cells for high risk leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1999;24:397–403.
- 35 McNiece I. *Ex vivo* expansion of hematopoietic cells (editorial). *Exp Hematol* 2004;32:409–10.
- 36 Gluckman E. *Ex vivo* expansion of cord blood cells (editorial). *Exp Hematol* 2004;32:410–2.
- 37 Wagner JE, Verfaillie CM. *Ex vivo* expansion of umbilical cord blood hemopoietic stem and progenitor cells (editorial). *Exp Hematol* 2004;32:412–3.
- 38 Peled T, Mandel J, Goudsmid R *et al.* Pre-clinical development of cord blood-derived progenitor cell graft expanded *ex vivo* with cytokines and the polyamine copper chelator tetraethylenepentamine. *Cytotherapy* 2004;6:344–55.



## AGRADECIMIENTOS:

- Al Dr. Héctor Mayani, mi tutor, por el entusiasmo contagiado sobre la hematopoyesis y la confianza en mis capacidades intelectuales.
- Al Dr. Octavio Ramírez y la Dra. Susana Kofman, por su paciencia y atención cada semestre.
- Al jurado de examen de grado, agradeciendo el tiempo invertido en leer mi manuscrito así como sus críticas al mismo.
- A los programas que me apoyaron económicamente durante mi doctorado: DGEP-UNAM, CONACY e IMSS.
- A mis compañeros de laboratorio con cuyo apoyo conté así como para realizar una separación celular como para ir a comer todos juntos. De manera particular a Juan José Montesinos, Kená Flores, Lupita Martínez y Nacho Valencia, cómplices en las ideas tanto buenas como no tan buenas. Gracias infinitas por hacer menos eternos los largos días de trabajo.
- A mi enorme, introvertida, amorosa e inigualable familia: Gracias eternas por la vida en común.
- A los grupos de investigación pioneros en el estudio de las células de SCU, por demostrar que el bien aportado que puedan darle a un ser humano es por más de 9 meses. A todas las mamás que tuvieron a su bebé y de cuyas placentas tome las muestras de SCU.