



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**ESTUDIO DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA Y SU RELACIÓN
CON LA FUNCIONALIDAD *IN VITRO* DE DISTINTAS POBLACIONES
CELULARES HEMATOPOYÉTICAS HUMANAS: EFECTO DE ELEMENTOS
INTRÍNSECOS Y EXTRÍNSECOS**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA
ROBERTO DIRCIO MALDONADO

DIRECTOR DE TESIS
DR. HÉCTOR MAYANI VIVEROS
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTORAL
DRA. DIANA ESCALANTE ALCALDE
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR
DR. ALFREDO HIDALGO MIRANDA
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MÉXICO. JUNIO DEL 2018



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.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Células Troncales y Progenitores Hematopoyéticos de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del Dr. Héctor Mayani Viveros en colaboración con el laboratorio de Genómica del Cáncer en el Instituto Nacional de Medicina Genómica liderado por el Dr. Alfredo Hidalgo Miranda y la asesoría del comité tutor conformado por la Dra. Diana Escalante Alcalde y el Dr. Alfredo Hidalgo Miranda

Durante la realización de este proyecto se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) y del Instituto Mexicano del Seguro Social (FIS/IMSS/PROT/PRI0/14/032).

Roberto Dircio recibió una beca por parte del Conacyt con número 445062 y un apoyo complementario por parte del IMSS con folio 038-2012.

Dedicatorias

Fue en Febrero del 2011 cuando mi madre me sentó en la sala y sin preámbulos me dijo: “hijo, ya estas por terminar tu carrera, ¿Qué es lo que sigue ahora?, a lo que respondí, con una mezcla de miedo y decisión: “mamá, me voy a estudiar un posgrado a la UNAM”. Ese día, el rumbo de mi vida académica tomó su dirección y mi madre, aún con un semblante triste, me apoyó. Ella es la primera persona a la que dedico este esfuerzo, por sus palabras de aliento y por su atención conmigo siempre, Estela Maldonado.

Mi padre, Ricardo López, por supuesto también es parte de este equipo de trabajo y sin pensarlo quizá, ha tenido mucho que ver en que pueda yo lograr escribir estas líneas.

Mis hermanos, Josué y Dolores, en quienes pienso día a día, pidiendo por que se encuentren bien, llenos de salud y bienestar.

A Josué Aylán y Leah Nahomi, los pequeños que nos dan aires de renovación familiar.

Mis cuñados Elda Berenice y Víctor Hugo, parte importante de este logro.

A Rosa Rojas, más que mi prima, mi hermana, mi cómplice, mi amiga, mi soporte. A ti te dedico este logro.

A Pablo Maldonado, hermano, echándome la mano y ayudando en la medida de sus posibilidades.

A mis abuelos Maco y Ángel, por s apoyo invaluable en este trayecto.

A mi abuelita María Valencia, por sus consejos y palabras de aliento siempre.

A mi familia paterna por su apoyo moral y social, compañía y atenciones.

A mi familia académica, el Dr. Héctor Mayani, por recibirme en su grupo cuando no tenía yo mucho que ofrecer, enseñarme grandes lecciones académicas, pero sobre todo, lecciones éticas y de vida. A Paty, Luis y Nachito, por su trabajo incansable en el laboratorio en el día a día, para que todo fluya de la mejor manera. Julieta e Ileana, mis cómplices académicos, con quienes compartí

momentos de enojos, tristezas, fracasos experimentales, desilusiones, alientos y horas de risas. A todos ellos, les dedico este trabajo por su compañía, asesoramiento, enseñanzas, oportunidades, pero sobre todo, por estar conmigo durante estos años.

Omar, mi amigo desde hace muchos ayeres, persona importante con palabras de aliento cada vez que flaqueaba.

Leslie Olmedo y Elenae Vázquez, amigas increíbles con enseñanzas de humildad y sencillez inigualables. Ángel, Lucio y Claudia, mis compañeros durante este viaje, dedicado a ellos por su amistad, sus críticas analíticas, sus enseñanzas, mis amigos siempre, en la academia y en lo personal.

A mi jefa Amparito, por su apoyo incondicional y sus enseñanzas invaluablees que me ayudaron a ser mejor persona pero sobre todo, un mejor profesionista.

Agradecimientos

A mis tutores, Dra. Diana Escalante Alcalde y el Dr. Alfredo Hidalgo Miranda, por sus consejos apoyo y dirección durante la realización de este proyecto.

A Fredy y Beto, por su apoyo incondicional para el avance pronto de este trabajo.

Jessy y Lulú, por su apoyo *citometrista* para que el trabajo siempre fuera constante y adecuado.

Paty Piña, Galo y Lalo por su apoyo técnico.

Juanjo y Kena, por su confianza y amistad.

A los Doctores Rosana Pelayo, Susana Castro, Iván Velasco y Ezequiel Fuentes, por sus comentarios para enriquecer este trabajo.

*Los científicos dicen que estamos hechos de átomos,
pero un pajarito me contó que en realidad estamos hechos
de historias.*

Eduardo Galeano.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	4
Resumen	6
Abstract.....	7
Introducción	8
Hematopoyesis.....	8
Microambiente hematopoyético.....	12
Fuentes de células hematopoyéticas.....	13
Diferencias funcionales de las CTPH obtenidas de diferentes fuente celulares.	15
Trasplantes de células hematopoyéticas.....	16
Uso de la SCU como fuente de CTPH.....	18
Antecedentes	20
Planteamiento del problema	22
Justificación	23
Hipótesis	24
Objetivos.....	25
Objetivo General.....	25
Objetivos particulares	25
Diseño metodológico	26
Lugar donde se realiza el estudio.....	26
Criterios de selección del modelo de estudio	26
Variables.....	27
Variables de respuesta.....	27
Variables de exposición.....	27

Variables modificadoras de efecto.	27
Consideraciones éticas y de bioseguridad.	27
Diseño experimental	28
Diagrama de trabajo	29
Materiales y métodos.....	30
Obtención de la muestra de SCU.	30
Criterios de inclusión y exclusión.	30
Procedimiento para la toma de muestra de SCU ex útero.	30
Obtención de células mononucleares a partir de SCU	31
Enriquecimiento en células CD34+.....	33
Purificación de progenitores mediante citometría de flujo FACS (Flourescent Activated Cell Sorting).	34
Ensayos de inducción.....	36
Cultivo de CTH obtenidas de la SCU para la generación de ivCTH.....	36
Cultivo de inducción de células troncales hacia progenitores linaje específico (Dircio-Maldonado et al., 2018)	36
Ensayos de proliferación	37
Ensayos de formación de colonias. Cultivo de Progenitores.	37
Cultivos para evaluar la presencia de células iniciadoras de cultivos a largo plazo.	38
Plaqueo de la línea M210B4.	38
Siembra de LTC-IC.	39
Extracción de RNA.	39
Microarreglos de expresión.	39
Microarreglos y análisis de expresión génica.	39
Análisis de enriquecimiento.....	40
Síntesis de cDNA y qPCR	40

Análisis estadístico	42
Resultados	43
Obtención de las poblaciones directamente de la SCU	43
Evaluación de la capacidad funcional de las poblaciones CMN y CD34+Lin-	46
Establecimiento de un protocolo de cultivo para generar las células progenitoras a partir de CTH obtenidas de SCU.	54
Evaluación <i>in vitro</i> de la funcionalidad de las CTH.....	63
Análisis de los perfiles globales de expresión génica de las CTHs.	71
Evaluación <i>in vitro</i> de la funcionalidad de las poblaciones de CPM.	81
Análisis de los perfiles globales de expresión génica de las CPMs.....	88
Evaluación <i>in vitro</i> de la funcionalidad de las CPE.....	98
Análisis de los perfiles globales de expresión génica de la población CPE.	105
Discusión.	115
Conclusiones	122
Perspectivas	123
Referencias.....	124
Anexo 1.....	131
Artículo publicado.	131

Abreviaturas

BFU-E	Unidad formadora de brote eritroide
CD	Grupos de diferenciación (<i>cluster of differentiation</i>)
CFC	Células formadoras de colonias
CFU-E	Unidad formadora de colonias eritroides
CFU-G	Unidad formadora de colonias de granulocitos
CFU-GM	Unidad formadora de colonias granulo-monocíticas
CFU-M	Unidad formadora de colonias mieloides
CFU-Mix	Unidad formadora de colonias mixtas
CMN	Células mononucleares
CPE	Célula progenitora eritroide
CPH	Célula progenitora hematopoyética
CPM	Célula progenitora mieloide
CTH	Célula troncal hematopoyética
EPO	Eritropoyetina
FACS	Separación de células por activación de fluorescencia (<i>Fluorescent activated cell sorting</i>)
FL	Ligando de FLT-3
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulo-monocitos
IL	Interleucina
Lin	Linaje

LTCIC	Célula iniciadora de cultivo a largo plazo (<i>long term culture initiating cell</i>)
MO	Medula ósea
PBS	Buffer salino de fosfatos (<i>phospates saline buffer</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RIN	Número de integridad del RNA (<i>RNA integrity number</i>)
SCF	Factor de células troncales (<i>Stem Cell Factor</i>)
SCU	Sangre de cordón umbilical
Sem	Seminal
SFB	Suero fetal bovino
SPM	Sangre periférica movilizada
TA	Temperatura ambiente
TPO	Trombopoyetina

Resumen

Grandes avances han sido reportados acerca del uso de células troncales y progenitoras hematopoyéticas (CTPH) expandidas *in vitro*. En los últimos años, una variedad de estrategias experimentales han sido desarrolladas para la expansión de esas células en cultivo. Hoy en día, sin embargo, permanece sin esclarecerse si las células generadas en el laboratorio mantienen las características funcionales y transcriptómicas que sus contrapartes obtenidas directamente de las fuentes de CTPH. En este trabajo, se seleccionaron y purificaron tres diferentes poblaciones: CTH (CD34⁺ CD38⁻ CD45RA⁻ CD71⁻ Lin⁻), células progenitoras mieloides (CPMs; CD34⁺ CD38⁺ CD45RA⁺ CD71⁻ Lin⁻) y células progenitoras eritroides (EPCs; CD34⁺ CD38⁺ CD45RA⁻ CD71⁺ Lin⁻), obtenidas directamente de unidades de sangre de cordón umbilical (SCU) o generadas *in vitro* bajo condiciones de cultivo particulares. Se compararon las capacidades funcionales *in vitro* y los perfiles globales de expresión génica, entre los diferentes grupos celulares. Nuestros resultados indican que aunque las poblaciones comparten inmunofenotipo, las células presentan diferencias importantes tanto a nivel funcional como génico. En general, las CTH generadas *in vitro* muestran un contenido deficiente de células iniciadoras de cultivos a largo plazo y una marcada tendencia a diferenciación mieloide. Además, las células generadas *in vitro* mostraron potenciales de expansión limitados. Esos cambios funcionales correlacionan con los cambios observados en los análisis transcriptómicos. Esas observaciones pueden tener implicaciones clínicas en el trasplante de SCU, como el agotamiento de las poblaciones transfundidas en los pacientes, debido a la diferenciación en un periodo de tiempo menor y a la reducción de la multipotencia de las CTH.

Abstract

Significant advances have been reported regarding the use of *in vitro*-expanded human hematopoietic stem (HSCs) and progenitor (HPCs) cells in transplantation settings. Indeed, over the last few years a variety of experimental strategies has been developed for the expansion of such primitive cells in culture. To this day, however, it is still unclear to what extent those stem and progenitor cells generated *in vitro* retain the functional and transcriptomic integrity of their freshly isolated counterparts. In the present study we have selected and purified three different cell populations: HSCs (CD34⁺ CD38⁻ CD45RA⁻ CD71⁻ Lin⁻ cells), myeloid progenitor cells (MPCs; CD34⁺ CD38⁺ CD45RA⁺ CD71⁻ Lin⁻ cells) and erythroid progenitor cells (EPCs; CD34⁺ CD38⁺ CD45RA⁻ CD71⁺ Lin⁻ cells), obtained directly from fresh umbilical cord blood (UCB) units or generated *in vitro* under particular culture conditions. We, then, compared their functional integrity *in vitro* and their gene expression profiles. Our results indicate that in spite of being immunophenotypically similar, fresh and *in vitro* generated cells showed significant differences, both in functional and genetic terms. In general, those HSCs generated in culture showed a deficient content of long term initiating cells (LTC-IC), and a marked tendency towards the myeloid lineage. In addition, *in vitro* generated HSCs and HPCs showed a deficient expansion potential. Such functional alterations correlated with changes in their gene expression profiles. These observations may have clinical implications in UCB transplantation such as faster differentiation capacity and reduced multipotency of HSC.

Introducción

Hematopoyesis.

La hematopoyesis es un proceso continuo y dinámico por el cual se generan las distintas células sanguíneas maduras; cada una de ellas tiene propiedades funcionales específicas dependiendo del linaje al que pertenecen. Sabemos que dentro de los linajes hematopoyéticos, hay al menos 11 tipos celulares diferentes y es posible clasificar a todos ellos en dos grandes grupos dependiendo de sus características funcionales, el linaje mieloide y el linaje linfoide. El linaje mieloide es subdividido en dos grupos más, el linaje megacariocítico eritroide, a partir del cual se dará origen a los eritrocitos y a las plaquetas; y el linaje granulo-monocítico, que como su nombre lo indica, genera a los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y a los monocitos/macrófagos. Por su parte el linaje linfoide corresponde a células linfoides de tipo B y de tipo T y los llamados linfocitos “asesinos naturales” (NK por sus siglas en inglés) (Doulatov, Notta, Laurenti, & Dick, 2012; Hamey et al., 2017; Mayani H, 2007; Orkin, 2008).

Todas las estirpes celulares sanguíneas provienen de una célula en común llamada Célula Troncal Hematopoyética (CTH). Ésta se caracteriza por ser multipotencial y es capaz de autorrenovarse, siendo esta la razón por la cual le es posible sostener la hematopoyesis a lo largo de la vida del organismo (Hamey et al., 2017; Notta et al., 2016). Si bien, esta población ha sido ampliamente manejada y descrita como una población homogénea, hoy en día sabemos que las CTH son un grupo celular heterogéneo, y que existen variaciones en el tiempo en que estas células pueden reconstituir el sistema hematopoyético o bien, porque existen subpoblaciones con tendencia a generar linajes (Biasco et al., 2016; Carrelha et al., 2018). Cuando la CTH se diferencia genera, primeramente, a las células progenitoras hematopoyéticas (CPH), también conocidas como UFC (unidades formadoras de colonias), éstas son células que pueden ir desde un estado de multipotencia hasta estados de unipotencia, dependiendo del punto en la maduración en la que se encuentren.

Es importante notar que tanto las CTH como las CPH tienen una morfología linfoide, lo cual hace imposible distinguir las utilizando tinciones como Wright-Giemsa. Ahora bien, las CPH dan lugar a las células precursoras, que son células con diferenciación clara hacia un determinado linaje, pero que aún no se encuentran funcionales en su totalidad. La tasa de proliferación de estas células normalmente va disminuyendo a medida que estas avanzan en la especificación funcional de su linaje (Rieger & Schroeder, 2012)

En los humanos, y bajo condiciones fisiológicas normales, estos tres grandes grupos de poblaciones celulares residen en la médula ósea de los huesos largos, pues ahí es donde se encuentran las características microambientales para regular la hematopoyesis y permitir a las células expresar sus potenciales de diferenciación.

Finalmente, existe un cuarto grupo, las células maduras, que son células con la capacidad de cumplir la función del linaje al que pertenecen. Las células maduras se encuentran normalmente en circulación o fuera de la médula ósea; ésta es la razón por la cual, aunque sabemos que los monocitos y los linfocitos no son células completamente maduras, se han considerado dentro de este cuarto grupo celular hematopoyético. Tanto las células precursoras como las maduras, tienen características morfológicas propias de linaje al que pertenecen, lo cual las hace identificables cuando han sido teñidas y se observan al microscopio (Figura 1). Es sabido que una CTH es capaz de originar hasta 1×10^{13} células maduras (Biasco et al., 2016; Mayani H, 2007; Rodriguez-Fraticelli et al., 2018; Sun et al., 2014).

A medida que las células van avanzando en la hematopoyesis, es decir, a medida que se diferencian, van expresando o dejando de expresar moléculas en su superficie. Estas moléculas tienen ciertos patrones de expresión en cada tipo y estadio celular, lo que nos permite utilizarlas como “etiquetas” para su identificación, aun cuando morfológicamente no sea posible. La mayoría de las moléculas han recibido un número que sucede al prefijo CD (*cluster of differentiation*, grupo de diferenciación), y al conjunto de CD presentes en cada célula se le conoce como inmunofenotipo (Doulatov et al., 2012).

Canónicamente, las CTH se caracterizan por la expresión de CD34, CD90, CD49f, CD117 y CD133, y por la ausencia de los marcadores CD38 y de los marcadores específicos de linaje (Mayani, 2003). Las células progenitoras por su parte se pueden identificar utilizando los marcadores CD34 y CD38, para los que son positivas. En función de su estadio de diferenciación podemos usar CD135 para progenitores multipotenciales (Doulatov et al., 2012), o bien, marcadores propios de linaje tales como CD71 para el caso de células progenitoras eritroides o CD45RA para progenitores mieloides y linfoides (Doulatov et al., 2012; Mayani & Lansdorp, 1995), y con base en la expresión de CD10 es posible distinguir entre ambos linajes, dado que los progenitores mieloides son CD10 negativos mientras que los progenitores linfoides son CD10 positivos (Doulatov et al., 2012).

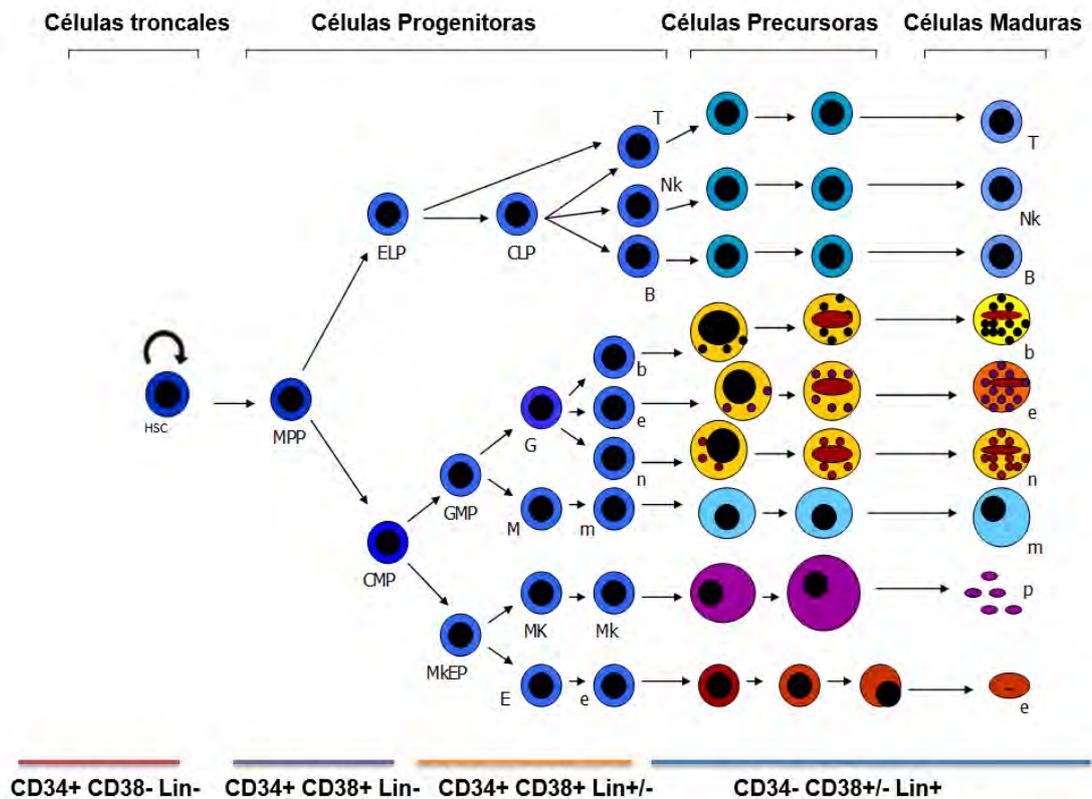


Figura 1. Organización jerárquica del sistema hematopoyético. El sistema hematopoyético ha sido dividido para su análisis, en al menos cuatro compartimentos. El primero corresponde al de las células troncales, con capacidad de autorrenovación y mutipotencia; el segundo al de las células progenitoras, que contiene células desde multipotentes hasta unipotentes, pero que en ningún caso es capaz de autorrenovarse; el tercero corresponde al de las células precursoras, cuyo destino de linaje está definido y que además pueden distinguirse por características morfológicas y el cuarto al de las células maduras, células que realizarán las funciones determinadas de cada linaje. Cada uno de los compartimentos tiene marcadores de superficie que permiten distinguirlos entre ellos, llamados CD's (*cluster of differentiation*). HSC, célula troncal hematopoyética; MPP, progenitor multipotente; ELP, progenitor linfoide temprano; CLP, progenitor linfoide común; CMP progenitor mieloide común; GMP, progenitor de granulocitos y macrófagos; MkEP, progenitor megacariocítico eritroide; T, linfocito T; NK, linfocito asesino natural; B, linfocito B; b, basófilo; e, eosinófilo; n, neutrófilo; m, monocito; p, plaquetas; e, eritrocito (Mayani, 2010).

Microambiente hematopoyético.

Para que las células hematopoyéticas expresen sus potenciales funcionales, como la autorrenovación de las CTH o la diferenciación, es indispensable que se encuentren en un microambiente que les proporcione las condiciones necesarias para ello. Estas condiciones se encuentran en la médula ósea de los huesos largos en mamíferos adultos. Aquí existen diferentes mecanismos biológicos que proporcionan a las células hematopoyéticas estímulos, tanto de manera positiva como de manera negativa, lo que resulta en una regulación fina a través de tres mecanismos principales: 1) la regulación humoral de las células hematopoyéticas moléculas solubles, citocinas y concentraciones de oxígeno, entre otros factores. 2) También existe una interacción de las células hematopoyéticas con las moléculas de la matriz extracelular, generando una regulación y proporcionando anclaje a las CTPH para que éstas sean capaces de expresar sus capacidades funcionales. Esta regulación viene acompañada por 3) se ha descrito una interacción directa entre las células hematopoyéticas y las células del microambiente (estroma) que genera una comunicación bidireccional entre los diferentes tipos celulares. En conjunto, estos tres grandes mecanismos actúan de una manera coordinada resultando en la regulación efectiva de la funcionalidad de las células hematopoyéticas (Figura 2) (Cordeiro Gomes et al., 2016; Orkin, 2008; Roch et al., 2017).

Cuando la regulación del proceso de hematopoyesis es alterada, se pueden generar variaciones en los números y tipos de células resultantes, lo que conlleva a patologías hematológicas, tales como leucemias, linfomas, mielomas o anemias (Arber et al., 2016; Swerdlow et al., 2016). Muchos de estos procesos requieren de la corrección de la funcionalidad del sistema hematopoyético mediante el uso de técnicas de la terapia celular, tales como los trasplantes de células hematopoyéticas (Hatzimichael & Tuthill, 2010), que son tomadas de diversas fuentes celulares.

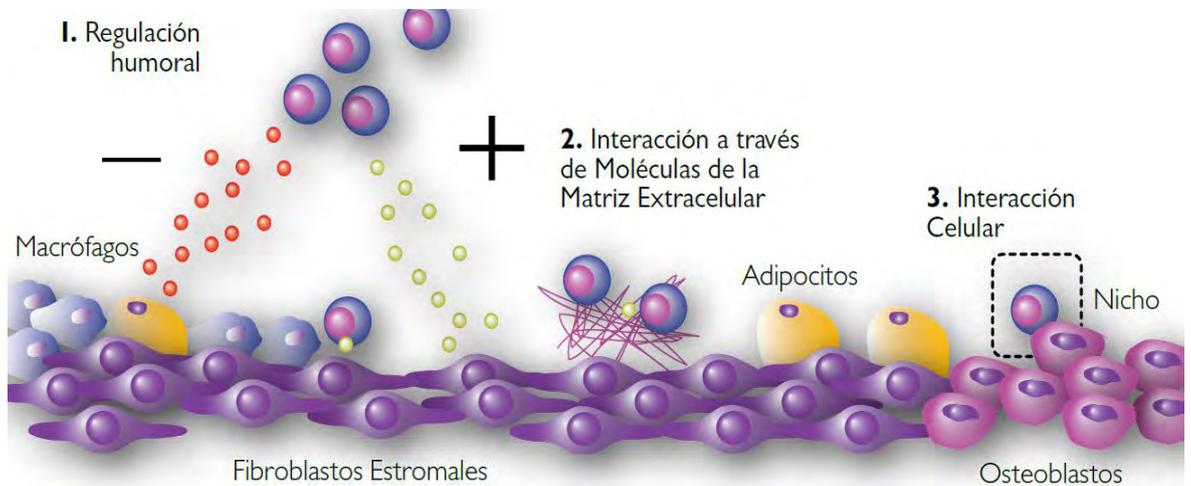


Figure 2. Microambiente hematopoyético. Existen tres grandes mecanismos descritos para la regulación efectiva de la hematopoyesis; comprenden la interacción de las células hematopoyéticas con moléculas solubles o con otras células presentes en el sitio hematopoyético (Mayani, et al, 2007)

Fuentes de células hematopoyéticas

La principal fuente de CTPH es la médula ósea (Szilvassy, 2003), sin embargo, es interesante el hecho de que es posible encontrar estas células en circulación. Si bien la proporción de CTPH en sangre periférica es muy baja, hoy en día es posible hacer salir a las CTPH de su lugar de residencia y aumentar la frecuencia de estas en circulación. Ésto se consigue mediante la disrupción de los ejes que anclan a las células hematopoyéticas a su microambiente natural; farmacológicamente, el uso de *filgrastim* (el compuesto activo es el G-CSF) favorece el rompimiento de la unión CXCL12 presente en las células del microambiente con su ligando CXCR4 presente en las células hematopoyéticas, o bien, utilizando quimioterapia o la combinación de factores de crecimiento, permitiendo la movilización de las células sanguíneas desde la médula ósea hacia circulación, una vez aquí, las células pueden ser sustraídas desde el torrente sanguíneo mediante un proceso conocido como aféresis (Duong et al., 2014). Este proceso genera una nueva fuente de CTPH, llamada Sangre

Periférica Movilizada (SPM). Es de notar que tanto las células que vienen de la médula ósea como las de la SPM representan fuentes adultas de CTPH cuyas capacidades funcionales presentan ciertas características que han de ser mencionadas más adelante.

A partir del descubrimiento en la década de los setenta de que en la Sangre de Cordón Umbilical (SCU) es posible encontrar CPH (Prindull, Prindull, & Meulen, 1978), Edward A. Boyse, Judith Bard y Hal Broxmeyer en el Sloan-Kettering Institute en Nueva York, a principios de la década de los 80, propusieron la idea de usar la SCU como una tercera fuente de CTPH (Broxmeyer et al., 1989). Sin embargo, esto no fue probado sino hasta 1989 cuando el Dr. Broxmeyer en colaboración con la Dra. Gluckman utilizaron esta fuente para trasplantar a un paciente con anemia de Fanconi, obteniendo resultados satisfactorios (Gluckman et al., 1989). Para este momento ya existían reportes acerca de la biología de las CTPH de SCU, sin embargo, fue a partir de los resultados recién mencionados, que muchos grupos de investigación comenzaron a trabajar fuertemente en describir la biología de las CTPH de esta fuente, generando grandes cantidades de conocimiento que se analizará a continuación, haciendo un comparativo con las CTPH provenientes de las fuentes adultas.

Diferencias funcionales de las CTPH obtenidas de diferentes fuente celulares.

Diversos estudios han sido realizados demostrando diferencias funcionales importantes de las células hematopoyéticas de acuerdo a la fuente de donde se obtienen. Reportes previos del laboratorio han demostrado que las CTPH provenientes de la SCU poseen una mayor capacidad de proliferación (aumento en el número total de células sin importar estadio o determinación de linaje) y una mayor capacidad de expansión (aumento en el número de células con determinadas características con respecto al inicio del análisis) (Figura 3) (Mayani, 2010).

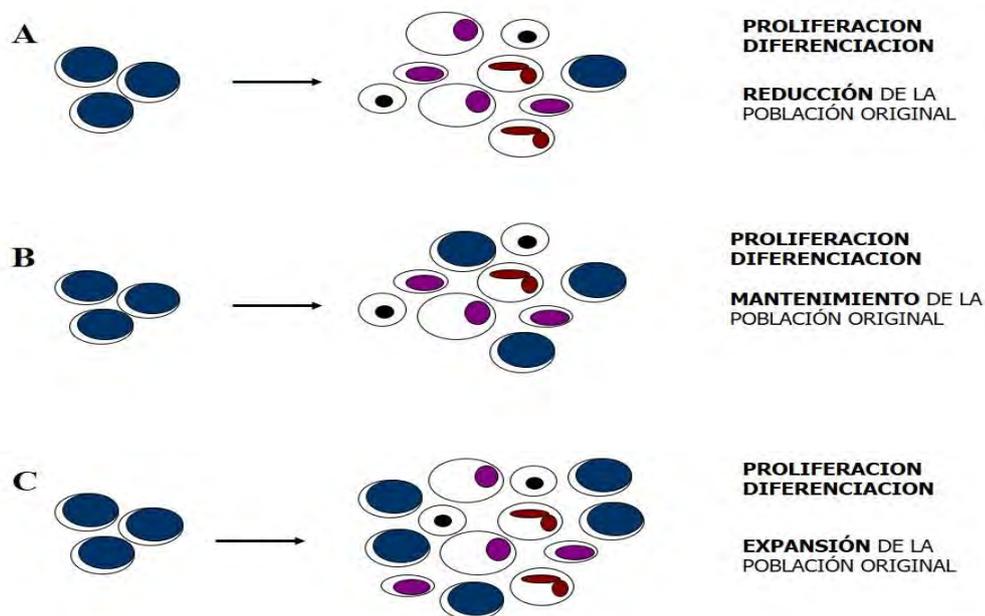


Figura 3. Representación del comportamiento *in vitro* de las CTPH. En A, la población inicial es capaz de dividirse y generar nuevas células, aumentando el número total de células, lo que se define como proliferación. Por otro lado, las células que se generan, adquieren características propias de los distintos linajes hematopoyéticos, es decir, se diferencian. Sin embargo, existe una disminución del número de células con respecto al inicio del análisis. En B, la población inicial prolifera y se diferencia; y existe un mantenimiento del número de células que conservan las características de la población inicial. En el escenario C, la población prolifera y se diferencia, además, existe un fenómeno en el que el número de células que conservan las características de la población inicial aumenta, es decir, existe una expansión de la población original (P. Flores-Guzman, Gutierrez-Rodriguez, & Mayani, 2002).

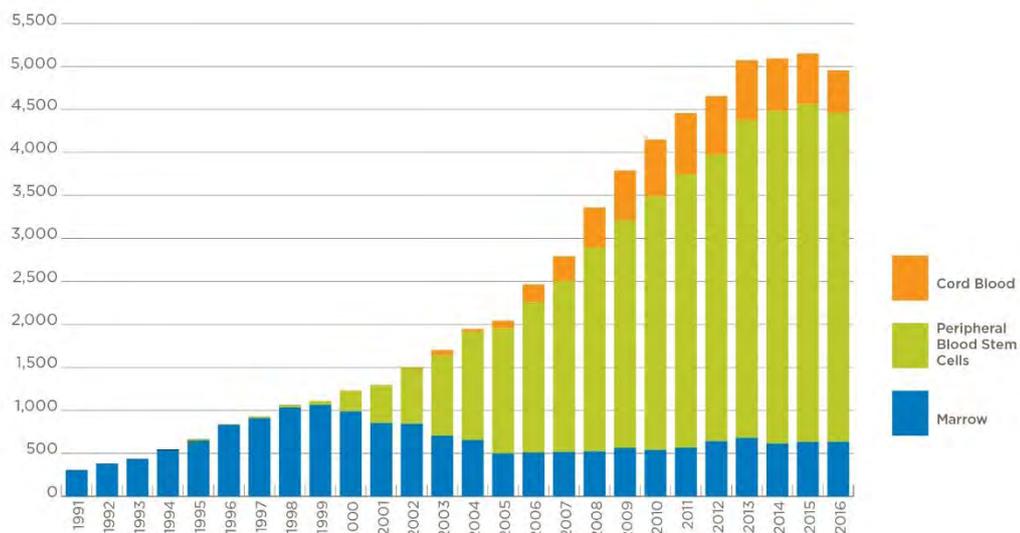
Además, en la SCU se ha encontrado un mayor número de células con la capacidad de sostener los cultivos a largo plazo (LTCIC, long term cultures initiating cells, por sus siglas en inglés), es decir, con características de célula troncal hematopoyética (Mayani, 2010). También se ha demostrado mayor frecuencia de progenitores linaje específico en un estadio de diferenciación menos avanzado en la SCU, (Mayani & Lansdorp, 1998). A diferencia de las fuentes adultas, que presentan características funcionales similares entre sí, las CTPH provenientes de SCU presentan una mayor capacidad de entrar a ciclo celular (Alvarado-Moreno, 2007) y además poseen características biológicas intrínsecas particulares, como una mayor longitud de los telómeros (Mayani, 2003; Sabharwal et al., 2018).

Trasplantes de células hematopoyéticas

El uso de células vivas introducidas en un paciente con el fin de restaurar la función normal de algún órgano o tejido, tratando una enfermedad es conocida como terapia celular (Gage, 1998). El donador de estas células puede ser el mismo que el receptor (trasplante autólogo) o en su defecto, el donador es diferente al receptor (trasplante heterólogo). Las células pueden además, ser manipuladas *in vitro* antes de ser introducidas en el paciente, funcionando como acarreadores de moléculas o genes restauradores de funciones particulares. Para enfermedades del sistema hematopoyético, como se mencionó anteriormente, desde la década de los noventa, la primera línea terapéutica es el uso de células CD34+ provenientes de médula ósea o de sangre periférica movilizada, actualmente el trasplante de CTPH es una metodología útil e incluso fundamental en el tratamiento de hematopatologías e incluso de patologías no hematológicas (Mayani, 2012). Usando el trasplante de CTPH se busca corregir afecciones del sistema hematopoyético.

Como se ha mencionado, existen al menos tres fuentes descritas muy analizadas para la obtención de CTPH, dos de ellas provenientes de adultos (SPM y médula ósea) así como una neonatal, la SCU, cada una de ellas con ventajas y desventajas para su uso en la clínica. En el caso de la médula ósea,

las células se obtienen por aspiración medular y se transfunden por vía intravenosa en el receptor; después de un régimen de acondicionamiento, que incluye quimioterapia y radioterapia. Se pueden obtener entre 800 y 1,200 mL de un adulto normal y se transfunden $1.5 - 2.5 \times 10^8$ células nucleadas/kg de peso del receptor. Se ha descrito que pasan entre 24 y 36 horas para que las células transfundidas lleguen y se instalen en la médula ósea (Laughlin et al., 2004; Migliaccio et al., 2000; Rocha et al., 2004) . Por su parte, de la SPM se pueden obtener las CTPH mediante un proceso de aféresis, hecho que hasta ahora parece no poner en riesgo al donador, por lo que se ha convertido en la principal fuente de CTPH hoy en día, teniendo como resultado que casi el 90% de los trasplantes en adultos y el 50% en pacientes pediátricos se realicen utilizando esta fuente (Figura 4).



Source: National Marrow Donor Program/Be The Match FY 2016

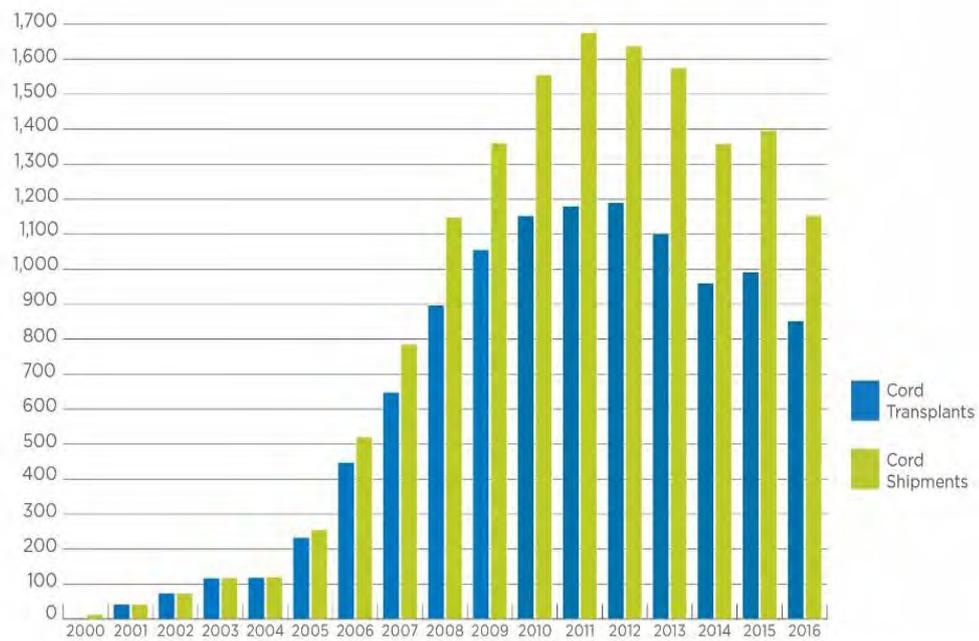
Figura 4. Uso de la sangre periférica movilizada, la médula ósea y la SCU en la terapia hematológica. En los últimos años la SPM ha sido ampliamente utilizada en lugar de la médula ósea, debido a las ventajas que para el donador representa. Sin embargo, es de notar que la SCU se ha mantenido como una fuente viable para la obtención de las CTPH. En los últimos años, se realizan aproximadamente 5,000 trasplantes hematopoyéticos, de los cuales en el 10% se usa la SCU; esto es la misma frecuencia con la que se usa la médula ósea.

A la fecha, se han almacenado más de 600,000 unidades de SCU y se han realizado más de 30,000 trasplantes con estas células alrededor del mundo (Ballen, Gluckman, & Broxmeyer, 2013; Mayani, 2011). Hoy en día, la SCU es una buena alternativa para obtener CTPH dadas las múltiples ventajas que ésta fuente ofrece, la cual será analizada en detalle a continuación.

Uso de la SCU como fuente de CTPH

El riesgo bajo de desarrollar enfermedad injerto contra hospedero, la baja posibilidad de transmisión de enfermedades infecciosas, y el riesgo nulo para el donador; además de las capacidades funcionales de las CTPH de la SCU y la frecuencia mayor de células primitivas en la SCU con respecto a sus contrapartes adultas (Mayani, 2010, 2011, 2012; Rocha et al., 2004), sugieren que ésta es una excelente fuente para llevar a cabo trasplantes de células hematopoyéticas en pacientes con patologías hematológicas.

A lo largo del tiempo, muchos han optado por almacenar las unidades de SCU y utilizarlas en la terapia de patologías hematológicas (Figura 5), sin embargo, el uso de las poblaciones celulares obtenidas de esta fuente se ha enfocado principalmente en pacientes pediátricos, debido a que el número absoluto de CTPH obtenidas en una unidad de SCU es menor con respecto a los números celulares que podemos obtener de la SPM o de la médula ósea; y las células pudieran no ser suficientes para trasplantar a pacientes adultos dada la relación del peso del paciente con respecto a la dosis de células, lo que tiene como resultado una mayor tasa de morbilidad y mortalidad cuando la SCU es usada en pacientes adultos (Ballen et al., 2013).



Source: National Marrow Donor Program/Be The Match FY 2016

Figura 5. Uso y almacenamiento de la SCU. Debido a las ventajas biológicas de las células de la SCU, su uso y almacenaje mostraron un aumento desde el año 2006 al 2012, donde se observó su máximo uso. Sin embargo, en los últimos años el uso de esta fuente ha disminuido. Es interesante notar que aunque el número de unidades que se almacenan es mayor al número de unidades utilizadas, las tendencias entre estos dos parámetros son similares.

Antecedentes

Muchos grupos han buscado mejorar los resultados obtenidos en la práctica clínica cuando la fuente de CTPH es la SCU (Bari et al., 2015). En este sentido, se han explorado diversas estrategias: por ejemplo, utilizando diferentes condiciones de cultivo, que incluyen la modificación de la tensión de oxígeno (Mantel et al., 2015), cocultivos con tipos celulares estromales (células mesenquimales) (Fajardo-Orduna et al., 2016; Flores-Guzman et al., 2009), o bien, el uso de diversas combinaciones de citocinas añadidas a los cultivos (Pineault & Abu-Khader, 2015), logrando aumentar el número de CTPH en las unidades cultivadas. Sin embargo, las CTPH no permanecen estáticas en la diferenciación (Miller, Knapp, & Eaves, 2013) y tienden a generar células maduras en cultivos (P. Flores-Guzman & Mayani, 2006), lo que resulta en la generación de poblaciones heterogéneas que incluyen tanto de CTPH como células precursoras o maduras, lo que complica el proceso de expansión de las CTPH *in vitro*.

Otra estrategia propuesta es el co-trasplante de las células hematopoyéticas de la SCU con células estromales mesénquimales (MSC) provenientes de la gelatina de Wharton de la SCU. Las MSC ayudan a favorecer el injerto, debido a sus capacidades inmunoreguladora (Lee et al., 2013), y a través de la modulación de la autorrenovación de las CTH por activación de las vías de señalización Wnt y Notch (Michalicka et al., 2017).

Por otro lado, la búsqueda de mejorar la capacidad de migración y residencia selectiva de las células hematopoyéticas del donador a la médula ósea del receptor, logrando modular la actividad proteasa de DPPIV, sobre su sustrato CXCL12 (Christopherson, Hangoc, & Broxmeyer, 2002; Farag et al., 2013). Otra estrategia es exponer a las CTPH a prostaglandina E2 (PGE2) por periodos cortos de tiempo (Cutler et al., 2013), dado que se ha descrito que (PGE2) es capaz de regular la homeostasis de las CTH en vertebrados, favoreciendo la autorrenovación a través de la activación de las ciclooxigenasas (North et al., 2007).

La co-infusión con una unidad no expandida de SCU con una unidad de SCU expandida bajo diversas condiciones ha sido un tercer enfoque. En cuanto a la expansión, el aumentar *in vitro* el número de CTPH obtenidos de una unidad de SCU, utilizando diversas moléculas químicas, ha sido una aproximación importante. Con nicotinamida, por ejemplo, se observó una reducción a 13 días, en el tiempo de recuperación en los niveles de neutrófilos en ocho de 13 pacientes estudiados (Horwitz et al., 2014).

Se ha utilizado también tetrapentileetamina (TEPA), que funciona como quelante de cobre, observándose una disminución de la diferenciación en el cultivo, favoreciendo la expansión de las células primitivas hematopoyéticas; con este esquema se consiguió incrementar 219 veces el número de células nucleadas totales y 6 veces el número de células CD34+, logrando una recuperación de neutrófilos en 30 días y una recuperación de plaquetas en 48 días, sin reportar casos graves de enfermedad injerto contra hospedero (de Lima et al., 2008).

La expansión con diversas combinaciones de citocinas, también se ha utilizado en la expansión clínica de las CTPH. Los pacientes recibieron una media de 0.99×10^7 células nucleadas totales y los tiempos de recuperación fueron de 28 días para neutrófilos (Shpall et al., 2002). Desde entonces, dada la factibilidad de la expansión de las CTPH con citocinas, se han buscado diversas combinaciones que favorezcan este proceso (Bari et al., 2015; Delaney et al., 2010; Fernandez-Sanchez et al., 2011; P. Flores-Guzman et al., 2013).

Si bien es cierto el hecho de que existen avances importantes que llevan a pensar que se puede expandir de forma segura a las CTPH *in vitro*, se desconocen los efectos *in vivo* a largo plazo de los protocolos de expansión. Es de notar entonces, que a pesar de los grandes avances descritos en este sentido, es importante realizar una evaluación exhaustiva de las células que se generan en el cultivo.

Planteamiento del problema

Hasta ahora, se han realizado grandes esfuerzos por lograr expandir el número de CTPH que se encuentran en una unidad de SCU; principalmente modificando las condiciones de cultivo, mediante el uso de citocinas y factores de crecimiento en los medios, controlando las condiciones de temperatura y concentración de oxígeno, o incluso mediante el uso de moléculas pequeñas que favorezcan a la autorrenovación de la población troncal. En este sentido, los análisis reportados actualmente se han realizado a nivel de poblaciones de células que expresan CD34 o bien, a nivel de células mononucleares (CMN). Si bien esto genera información importante, las poblaciones analizadas son muy heterogéneas.

Existen reportes de que el proceso de expansión *in vitro* ha sido exitoso, sin embargo, es importante saber si las células de poblaciones específicas que son sometidas a estos procesos, tales como las CTH o las células progenitoras linaje específico, conservan sus capacidades funcionales. De igual importancia es saber si a nivel molecular, existe alguna variación.

La información con estos enfoques es limitada, en gran medida, dada la dificultad de obtener poblaciones puras de cada estadio celular. Por lo tanto, para contribuir al conocimiento acerca de la biología de distintas poblaciones de células hematopoyéticas generadas *in vitro*, el presente trabajo planteó analizar en las CTH y dos tipos de progenitores comprometidos a linajes específicos -las células progenitoras eritroides (CPE) y las células progenitoras mieloides (CPM)- sus capacidades funcionales y además, los patrones de expresión génica que estas poblaciones poseen.

Las preguntas a responder son: ¿Cambiarán la funcionalidad y los perfiles de expresión de poblaciones generadas *in vitro* respecto a las poblaciones que se diferenciaron *in vivo*? y ¿Cómo se correlacionan los perfiles globales de expresión génica con los potenciales de proliferación y expansión de cada población?

Justificación

Adquirir un mayor conocimiento acerca de la biología de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas humanas, provenientes de sistemas de expansión *in vitro*, tendrá un impacto positivo en la manipulación de las CPTH de SCU con fines terapéuticos. Para esto, es importante purificar poblaciones que hayan sido expandidas en el laboratorio utilizando esquemas de cultivo, así como sus contrapartes obtenidas directamente de la SCU y que no hayan sido cultivadas, para realizar el análisis comparativo entre las diferentes poblaciones y poder obtener información acerca de sus características funcionales y moleculares.

Hipótesis

La expansión *in vitro* mediante el uso de citocinas en medios libres de suero, es un proceso que permite aumentar el número de células hematopoyéticas en cultivo, conservando las características funcionales de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas, como diferenciación, proliferación y expansión, lo que sugiere que estas células puedan ser utilizadas en la clínica de forma segura.

Por otro lado, evaluando los perfiles globales de expresión génica de las células manipuladas, las variaciones observadas con respecto a las contrapartes obtenidas en fresco, serán mínimas. Presentándose expresión diferencial de genes implicados en la supervivencia de las células con respecto a su microambiente, pero no habrá variaciones en los genes que le dan la identidad de ser una célula troncal hematopoyética y de progenitores linaje específicos (progenitores eritroides o progenitores mieloides).

Objetivos

Objetivo General

1. Analizar y comparar los perfiles globales de expresión génica, así como la funcionalidad *in vitro* de CTH, CPE y CPM obtenidos directamente de la SCU o bien generadas durante la expansión *in vitro*, para evaluar los cambios ocurridos durante su cultivo.

Objetivos particulares

1. **Inducir la diferenciación *in vitro*** de las CTH hacia CPE o CPM, mediante la modificación de las condiciones de cultivo, utilizando únicamente citocinas recombinantes humanas.
2. **Expandir CTH *in vitro*** utilizando la línea celular estromal OP9 a partir de CTH obtenidas de la SCU.
3. **Analizar las capacidades funcionales de las CTH, CPE y CPM obtenidas** de SCU y de las poblaciones de CTH, CPE y CPM generadas *in vitro*, evaluando su potencial de proliferación y de expansión; para hacer el análisis comparativo.
4. **Caracterizar los perfiles globales de expresión génica de las diferentes poblaciones celulares y hacer el análisis comparativo** entre las poblaciones obtenidas directamente de la SCU y las generadas *in vitro*.
5. **Cuantificar la expresión de genes diferencialmente expresados** entre las poblaciones obtenidas directamente de la SCU y sus contrapartes generadas *in vitro*, para validar los datos obtenidos de los análisis globales de expresión génica.

Diseño metodológico

El estudio realizado fue de tipo experimental. Se usaron cultivos primarios de células obtenidas de la SCU, adicionados con diferentes combinaciones de citocinas y utilizando estromas de líneas celulares de médula ósea de ratón. Se hicieron las evaluaciones y los comparativos funcionales y moleculares de distintas poblaciones celulares hematopoyéticas humanas tanto obtenidas como generadas en el laboratorio.

Lugar donde se realiza el estudio

El proyecto se realizó en el laboratorio de Células Troncales y Progenitoras Hematopoyéticas, que pertenece a la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas ubicada en el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS bajo la dirección del Dr. Héctor Mayani y la asesoría de la Dra. Patricia Flores Guzmán.

El proyecto recibió financiamiento del CONACyT y de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS.

Criterios de selección del modelo de estudio

Se utilizaron células hematopoyéticas de SCU proveniente de mujeres sanas, con gesta en término, de parto o cesárea, que no reportaron problemas infecciosos o complicaciones propias del embarazo, durante y al término de éste. Como controles se usaron las mismas células, adicionando modificaciones en las condiciones de cultivo.

Variables

Variables de respuesta.

- Comportamiento funcional de las poblaciones.
- Modificación de los perfiles globales de expresión génica.

Variables de exposición.

- El estímulo con citocinas y estroma en los cultivos.

Variables modificadoras de efecto.

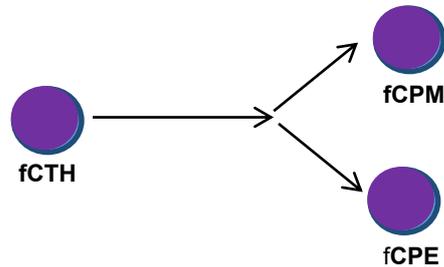
- Concentraciones de citocinas.
- Combinaciones de citocinas.
- Presencia o ausencia de estroma.

Consideraciones éticas y de bioseguridad.

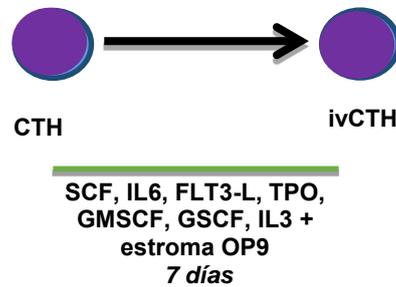
- Las muestras fueron colectadas en el servicio de Tococirugía del Hospital General de Zona 2A Troncoso y del Banco de Células Progenitoras del Centro Médico Nacional La Raza, ambos pertenecientes al Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Todas las muestras fueron procesadas en condiciones de esterilidad en gabinetes de seguridad tipo dos, utilizando bata y guantes como medidas básicas de protección.
- El material de desecho generado durante los experimentos, así como el material biológico, fueron tratados con base en la NOM-087-ECOL-2002.

Diseño experimental

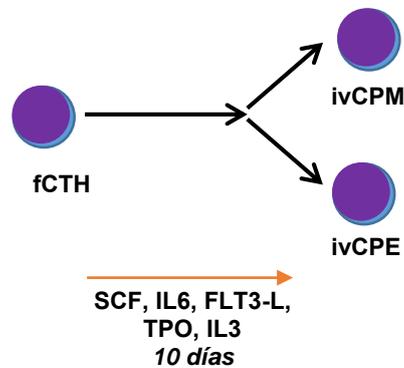
Obtención de las poblaciones directo de la SCU.



Generación de las ivCTH a partir de fCTH de SCU.



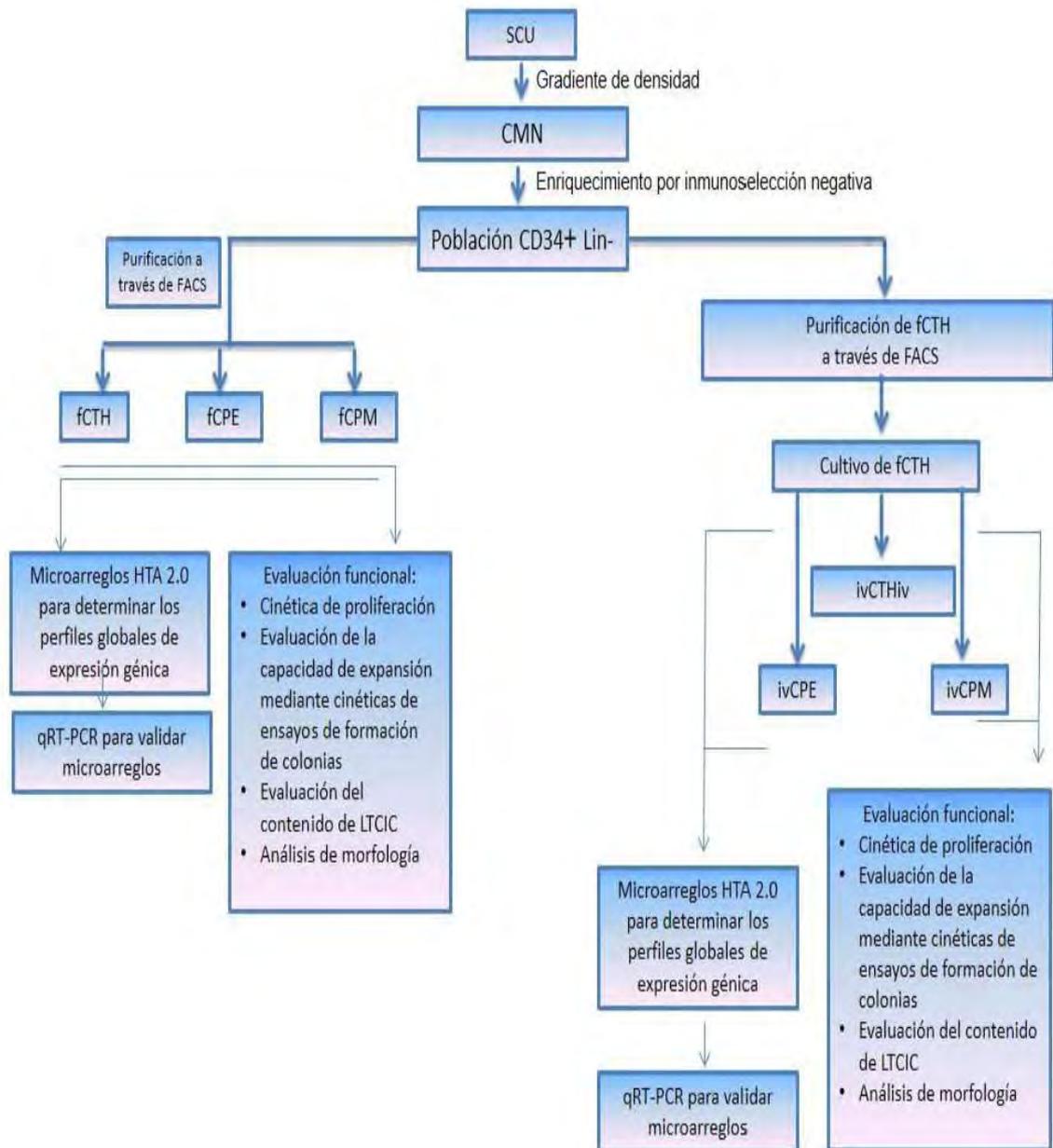
Generación de las ivCPE e ivCPM a partir de fCTH de SCU.



Para diferenciar entre el origen de las poblaciones, se han utilizado la letra “f” para las poblaciones frescas (obtenidas directamente de la SCU) y el prefijo “iv” para las poblaciones generadas *in vitro*

fCTH & ivCTH: CD34+ CD38- CD45RA- CD71-Lin-; **fCPE & ivCPE:** CD34+ CD38+ CD45RA- CD71+Lin-; **fCPM & ivCPM:** CD34+ CD38+ CD45RA+ CD71-Lin- (Doulatov et al., 2012; Mayani & Lansdorp, 1995)

Diagrama de trabajo



Materiales y métodos

Obtención de la muestra de SCU.

Las muestras fueron tomadas de acuerdo con las normas institucionales, en bolsas especiales para SCU, con 35 mL de anticoagulante CPD (citrato 3.27 g/L, dextrosa 25.5 g/L, fosfato sodio monobásico 2.22 g/L) en un volumen entre los 30 y 100 mL.

Criterios de inclusión y exclusión.

Se tomaron las muestras de la SCU de madres primerizas o secundarias (no multíparas) de entre 19 y 35 años, cuyo embarazo llegó a término y el parto o cesárea fue normal y sin complicaciones.

Fueron descartadas las muestras donde hubo muerte fetal, gestación menor a 34 semanas, amniocesis, cuadros infecciosos, fiebres, alguna enfermedad inmunológica y/o hematológica, sufrimiento fetal, preclamsia, eclamsia.

Procedimiento para la toma de muestra de SCU ex útero.

- Trabajar en esterilidad.
- Preparar el material de recolección y etiquetarlo correctamente.
- Recibir la placenta en un recipiente estéril.
- Verificar que la placenta y cordón umbilical se encuentren en buen estado, si es así, continuar. De lo contrario, dar por terminado el protocolo.
- Realizar asepsia con una gasa estéril impregnada con alcohol al 70% u algún otro antiséptico, limpiando el cordón umbilical en general.
- Localizar la vena y el sitio en que será puncionada.
- Puncionar la vena con la aguja utilizando el bisel hacia abajo y permitir el libre flujo de sangre hacia la bolsa colectora. La sangre baja hacia la bolsa por gravedad. Es importante ir mezclando el anticoagulante contenido en la bolsa con la sangre, para esto es suficiente ir moviendo la bolsa a manera de sube y baja en forma suave.

- Una vez que terminó de fluir la sangre, retirar la aguja y asegurarla con su respectivo tapón de hule. Es recomendable realizar un nudo en la manguera en su parte cercana a la aguja.
- Colocar la bolsa colectora en otra bolsa que pueda cerrar herméticamente.
- Transferir la muestra de SCU al contenedor que la trasladará al laboratorio para su procesamiento. En este punto es importante evitar cambios bruscos de temperatura, y esto se logra conservando la muestra a temperatura ambiente o manteniéndola en fresco con ayuda de un gel refrigerante.
- Desechar en el lugar correspondiente la placenta y el cordón umbilical.

Obtención de células mononucleares a partir de SCU

Verificar la calidad de la muestra, es decir, que no haya coagulado de manera importante, y que sea de volumen considerable (considerar que cada bolsa contiene 35 mL de anticoagulante), muestras menores a 30 mL de SCU (volumen final < 45 mL) no fueron utilizadas para este protocolo.

Verificar que en la etiqueta se reflejen los criterios de inclusión descritos previamente y que estos aseguren la buena calidad de la muestra.

Realizar todo el procedimiento en campana de flujo laminar nivel dos de bioseguridad, perfectamente limpia y estéril. Siempre utilizando guantes y bata.

- Antes de comenzar a trabajar con la muestra, preparar tubos falcón de 50 mL estériles colocándoles Ficoll (Lymphoprep Invitrogen ®) en una relación ficol – SCU 3:4.
- Retirar la bolsa colectora del contenedor de transporte y de la bolsa hermética. Limpiar la bolsa utilizando una gasa impregnada con alcohol al 70%.
- Introducir la bolsa al gabinete y localizar la parte posterior de la bolsa, es decir, el lado contrario a adonde se encuentra la etiqueta de fábrica.

- Realizar un corte en diagonal en la esquina superior derecha con unas tijeras perfectamente limpias y estériles.
- Obtener la SCU con una pipeta y transferirla cuidadosamente en los volúmenes necesarios para cada tubo de 50 mL previamente preparado, procurando no superar la capacidad máxima del tubo.

En este paso es imprescindible que se formen dos fases en el tubo, una inferior que contiene el Ficoll y una superior, la SCU. Ambas fases NO deben mezclarse o romperse, si eso sucediera, es necesario tratar la mezcla como muestra y transferirlo a un nuevo tubo con Ficoll.

- Cerrar perfectamente los tubos y centrifugar por 30 minutos a 1,500 rpm con aceleración y desaceleración baja.
- Pasada la centrifugación se formaran tres fases, una inferior de color rojo; una superior que contiene el plasma y una intermedia que es donde se encuentran las CMN. Recuperar esta fase cuidando de no tomar parte de las otras dos.
- Una vez recuperadas las CMN, lavarlas con PBS + una mezcla de 4 antibióticos (eritromicina 1 mg/mL, vancomicina 1 mg/mL, gentamicina 5 mg/mL, ciprofloxacino 1 mg/mL) en una proporción 1:1 y centrifugando a 1,100 rpm durante 9 minutos.
- Tomar los tubos de la centrifuga y observar la formación de un botón de células al fondo del tubo. Decantar el sobrenadante.
- Resuspender el botón en 5 mL de medio RPMI + 4 antibióticos y contar con cámara de Neubauer.
- Sembrar en una densidad de 1×10^7 por cada mililitro de medio RPMI + 8% suero fetal bovino (SFB) + 4 antibióticos, por 18 - 24 horas.
- Pasado el tiempo, recuperar las CMN, contar con cámara de Neubauer con líquido de Turk 3%, verificar viabilidad con Azul de tripano (0.4%) y si la muestra es satisfactoria, proceder a trabajar en lo respectivo.

Enriquecimiento en células CD34+.

Para favorecer a la obtención de las poblaciones enriquecidas, aumentando la eficiencia del sistema, se realizó un fraccionamiento de la fracción de CMN en células enriquecidas en células que expresan la molécula CD34. Para esto, se siguió el siguiente protocolo:

- Colocar las células en un tubo de citómetro en una densidad de 20- 120 millones en un mililitro de PBS al 2% SFB y 1 mM EDTA.
- Añadir 100 μ L del coctel de anticuerpos Easysep (Stem cell technologies®).
- Agitar suavemente e incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 50 μ L del coloide contenido en el empaque del kit de anticuerpos.
- Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (TA).
- Llevar a 3 mL e introducir en el magneto EasySep.
- Incubar por 10 minutos a TA.
- Pasado el tiempo decantar en un tubo nuevo cuidando que no se toquen las bocas de ambos tubos.
- Retirar el primer tubo del magneto e incubar el segundo tubo por 10 minutos a temperatura ambiente, pasado el tiempo decantar nuevamente. Repetir una tercera vez.
- Centrifugar 7 minutos a 900 rpm por cinco minutos para formar un botón de células y permitir que las plaquetas queden suspendidas.
- Retirar el sobrenadante con pipeta.
- Resuspender en 200 μ L de PBS al 2% SFB y 1 mM EDTA,
- Contar con cámara de NeuBauer con líquido de Turk 3% y verificar viabilidad con Azul de tripano 0.4%.

Purificación de progenitores mediante citometría de flujo FACS (Flourescent Activated Cell Sorting).

A partir de la población enriquecida en células CD34+Lin-, proceder a realizar una tinción para citometría de flujo como se indica a continuación:

Muestra problema.

- Añadir los anticuerpos a las células enriquecidas en CD34+ como se indica a continuación:

Anticuerpo	Volumen /1x10⁶ células
CD34	3 µL
CD38	2.5 µL
CD71	20 µL
CD45RA	10 µL

- Mezclar por vórtex suavemente e incubar por 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- Durante este tiempo preparar los tubos para la recolección de los progenitores añadiendo 500 µL de medio de cultivo StemSpan o de PBS + 1 mM EDTA + 2% SFB.
- Pasado el tiempo de incubación, añadir 1 mL de PBS + 1 mM EDTA.
- Centrifugar por 5 minutos a 2500 rpm a temperatura ambiente.
- Decantar el sobrenadante y añadir 700 µL de PBS + 1 mM EDTA + 2% SFB.
- Llevar al FACS y separar a las CTH o a los progenitores con base en el inmunofenotipo indicado para cada población celular (CTH: CD34+CD38-CD45RA-CD71-; CPM: CD34+CD38+CD45RA+CD71- CPE: CD34+CD38+CD45RA-CD71+).

Controles

- En tubos de citómetro, añadir 100,000 CMN y agregar 1 μ L de anticuerpo antiCD45 acoplado a FITC, PE, APC o PE-Cy7 respectivamente.
- Incluir un tubo de citómetro con el mismo número de células, pero sin agregarle anticuerpo alguno, este tubo servirá como control de autofluorescencia.
- Mezclar por vórtex suavemente e incubar por 20 minutos a TA y en oscuridad.
- Pasado el tiempo de incubación, añadir 1 mL de PBS + 1 mM EDTA.
- Centrifugar por 5 minutos a 2500 rpm a TA.
- Decantar el sobrenadante y añadir 700 μ L de PBS + 1 mM EDTA + 2% SFB.
- Llevar al FACS y hacer los ajustes de compensación correspondientes al equipo con estos controles para el experimento.

Ensayos de inducción

Cultivo de CTH obtenidas de la SCU para la generación de ivCTH.

Este esquema de cultivo fue realizado con anterioridad en el laboratorio por la Dra. Verónica Fernández (Fernandez-Sanchez et al., 2011).

- Mediante FACS, obtener la población de CTH (CD34+CD38-CD71-CD45RA-).
- Cultivarla por siete días en una placa de 24 pozos previamente preparada con estroma de la línea celular OP-9, a una densidad de 5,000 a 20,000 células/mL. El cultivo se realizó con medio α -MEM con 10% *serum replacement* y con IL3, IL6, FLT3-L, SCF, GM-CSF, G-CSF y TPO a 10 ng/mL
- Al día siete, resusperder a la población celular y transferirla a un tubo de citómetro. Lavar con PBS a 1,100 rpm por 9 minutos.
- Se resuspendieron en 500 μ L de PBS + 1 mM EDTA + 2% SFB, para realizar el conteo y verificar viabilidad celular.
- Se les realizó tinción de citometría de flujo para obtener a la población de ivCTH (CD34+ CD38- CD71- CD45RA-) a través de FACS.

Cultivo de inducción de células troncales hacia progenitores linaje específico

(Dircio-Maldonado et al., 2018)

- A partir de la población enriquecida en células CD34+Lin- y mediante FACS, obtener la población CD34+CD38-CD71-CD45RA-, que corresponde a una población de CTH (Doulatov et al., 2012; Mayani & Lansdorp, 1995).
- Cultivarla por 10 días en medio StemSpan adicionado con IL3, IL6, FLT3-L, SCF y TPO a 10 ng/mL; a una densidad de 100,000 células por mililitro.
- Pasado el tiempo, recuperar las células, contar y hacer tinción para purificar por FACS los progenitores eritroides y mieloides, siguiendo el protocolo de purificación de progenitores

Ensayos de proliferación

Cultivos líquidos.

1. Cultivar las CTH en condición seminal (SCF, IL-6, FLT3-L y TPO 10 ng/mL cada citocina) a una densidad de 100,000 células/mL.
2. Cultivar las CPE en condición eritroide (SCF, TPO, IL-6, IL-3 y FLT3-L 10 ng/mL cada citocina y EPO 3 U/mL) a una densidad de 100,000 células/mL.
3. Cultivar las CPM en condición mieloide (SCF, IL-6, FLT3-L, GM-SCF y G-SCF 10 ng/mL cada citocina) a una densidad de 100,000 células/mL.

Ensayos de formación de colonias. Cultivo de Progenitores.

- Colocar el número de células de la población de interés, según la tabla 1, en el vial de metilcelulosa a TA, contenida en un tubo Eppendorff. Cuidando de depositar las células en la superficie del medio.
- Mezclar por vórtex 10 segundos y reposar por 15 minutos a TA para permitir que salgan las burbujas del medio de cultivo.
- Transferir el contenido a una placa de 24 pozos, cuidando de no formar burbujas, utilizando una jeringa y una aguja de punta roma,
- Incubar por 15 días a 37°C con 5% de CO₂.
- Pasado el tiempo, observar en el microscopio invertido a 10x e identificar por morfología, las colonias de progenitores eritroides (UFC-C, UFC-B), mieloides (UFC GM, G y M) y mixtas (UCF Mix).

Población	Número de células				
	Día 0	Día 5	Día 10	Día 15	Día 20
CTH	300	500	700	1000	1200
CPM	300	500	700	1000	1200
CPE	300	500	700	1000	1200

Tabla 1. Número de células utilizadas en la siembra de los ensayos de formación de colonias. Los números de células corresponden tanto para las poblaciones obtenidas de la SCU como las poblaciones generadas *in vitro*.

Cultivos para evaluar la presencia de células iniciadoras de cultivos a largo plazo.

Preparar las placas donde se hará el cocultivo. Para esto es necesario colocar la línea celular M210B4 en placas de 24 pozos a una confluencia no mayor a 80% que se debe tratar con mitomicina C a una concentración de 0.2 µg/mL a TA, para inhibir la proliferación.

Plaqueo de la línea M210B4.

- Colocar 1000 células por pozo en los pozos centrales (ver figura 6) de la placa de 24 y añadir 500 µL de medio RPMI Advance con 5% de SFB y L-Glutamina.
- Incubar hasta confluencia de 60 - 70 % y añadir mitomicina C (0.02 µg/mL) durante 18 - 24 horas.
- Pasado el tiempo, lavar 3 veces con PBS + 4 antibióticos (eritromicina 1 mg/mL, vancomicina 1 mg/mL, gentamicina 5 mg/mL, ciprofloxacino 1 mg/mL), cuidadosamente para no despegar la capa formada.
- Añadir 500 µL de medio RPMI Advance con 5% de SFB + 2 antibióticos (penicilina 10,000 U/mL y estreptomicina 1mg/mL) y reservar hasta su uso.

Siembra de LTC-IC.

- Verificar el aspecto del estroma previamente plaqueado.
- Sembrar 1000 células de la población de interés, en el pozo previamente preparado con la línea celular M210B4.
- Añadir 500 μ L de medio LTCM para conseguir un volumen final de 1 mL.
- Realizar cambios de medio durante cinco semanas, una vez cada 7 días.
NOTA: Los cambios de medio se realizan reemplazando la mitad del volumen del cultivo celular con medio LTCM fresco.
- Al cabo de cinco semanas, cosechar todas las células que se encuentren en el pozo, incluyendo la fracción adherente. Contar y sembrar ensayos de formación de colonias por duplicado como se indica en el apartado de ensayo de formación de colonias.

Extracción de RNA.

Las poblaciones fueron obtenidas por FACS y recuperadas en PBS + 2% SFB + 0.5 mM de EDTA e inmediatamente se realizó la extracción de RNA, utilizando el kit de extracción de Norgen biotek® de acuerdo con las instrucciones que indica el proveedor. Las muestras fueron sometidas al bioanalizador de Agilent Technologies™ con el programa de análisis Eukaryote Total RNA Pico v2.6. Se consideró un RIN (RNA Integrity Number) mayor a 6.

Microarreglos de expresión.

Microarreglos y análisis de expresión génica.

La calidad del RNA fue evaluada por electroforesis capilar (Agilent Bioanalyzer, Agilent Technologies), solo las muestras con un RIN (RNA Integrity Number) mayor a 6 fueron aprobadas para los microarreglos. 100 pg de RNA de cada condición experimental fue evaluada en Gene Chip Human Transcriptome Array (HTA) 2.0. Este arreglo permite evaluar 18,000 genes con un promedio de 20 sondas por gen. La síntesis de cDNA y amplificación se hicieron con WT Pico Reagent Kit (Affymetrix, Santa Clara, EUA). Los lavados y el proceso de hibridación se hicieron con GeneChip Hybridization Wash and Stain Kit in the

GeneChip Fluid Station 450 (Affymetrix, Santa Clara, USA). El arreglo fue escaneado usando The GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara, USA). La señal de los arreglos fue analizada con la consola de expresión Affymetrix. Los datos se normalizaron usando Signal Space Transformation-Robust Multichip Analysis (SST-RMA) para la corrección de ruido de fondo y el algoritmo de *quantiles*. Para definir el perfil de expresión diferencial dentro de las diferentes poblaciones celulares se usó el software Affymetrix Transcriptome Analysis Console (TAC). Los genes con una tasa de cambio ((Livak & Schmittgen, 2001) Log_2) >2 o <-2 y con un p-value Anova <0.05 fueron considerados significativamente alterados entre las condiciones analizadas. Todos los datos fueron subidos al GEO (ID: GSE107497)

Análisis de enriquecimiento.

El Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) y Over-Representation Analysis (ORA) se hicieron usando el GeneTrail2 (Stockel et al., 2016). Los genes del análisis TAC con una tasa de cambio <2 y <-2 y con un p-value Anova <0.05 fueron usados para el ORA con los siguientes parámetros: False Discovery Rate (FDR) de 0.05 y dos genes por categoría como el número mínimo de todos los análisis.

Síntesis de cDNA y qPCR

La validación de los microarreglos se hizo usando tres muestras diferentes a las usadas para el análisis de expresión génica. La síntesis de cDNA se hizo con WT Pico Reagent Kit usando 30 ng/uL de RNA en cada reacción, de acuerdo al protocolo indicado por el proveedor. GAPDH fue utilizado como gen constitutivo y un grupo de cuatro genes por población. Todos los oligonucleótidos se realizaron *in silico* en el Universal Probe Library System Assay Design for qPCR (Roche) considerando las uniones de exones y las reacciones se hicieron en Light Cycler 480 de Roche. Los oligonucleótidos para cada gen fueron sintetizados en la compañía T4 Oligo con la secuencia indicada en la tabla 2.

Gen	Secuencia 5'	Secuencia 3'	Número de sonda
GAPDH	agccacatcgctcagacac	gcccaatacgaccaaatcc	60
CCNB1	catggtgcactttcctctt	tgtttagagttggtgtccattc	18
CDC6	tgctcttgatcaggcagttg	tgcgacagactttactgtaggc	60
GBP4	gagcaccatcaaccaccag	ttagccctgattagctctgc	1
KCNE3	ttaagggaggctcgtcactgg	atgcacaaggcttcggtcta	7
KCNQ5	gtacaacgtgctggagagacc	accaaagacaaggagaaaaacg	28
PIEZO2	caaagttacatctgtgccctca	agcagcacgaaggctcagc	1
RUNX3	catggcatcgaacagcat	ggggagggagggtgtgaag	12
VCAN	ttgatggtttaacacattcaggt	gccatagtcacatgtctcggtta	8
SELP	actgtaagcagctctgggttg	caagatggctatttggcagtt	8

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para las qPCR.

La tasa de cambio de cada gen fue determinado usando el método de 2- $\Delta\Delta$ CT (Livak & Schmittgen, 2001).

Las reacciones en cadena de la polimerasa se realizaron en un volumen de 10 μ L en una placa de 96 pozos. Los volúmenes de los reactivos fueron distribuidos como se indica en la tabla 3.

Reactivo	Concentración final	Volumen
Agua Grado Biología Molecular		1.8 μ L
Oligo Secuencia 5' (5 mM Stock)	0.5 mM	1 μ L
Oligo Secuencia 3' (5 mM Stock)	0.5 mM	1 μ L
Sonda 10 mM (Stock)	0.2 mM	0.2 μ L
LightCycler® 480 Probe Master	1x	5 μ L
Total		9 μ L
Añadir 1 μL de cDNA		

Tabla 3. Cantidades de los reactivos para las qPCRs.

Las reacciones se realizaron en el LightCycler 480 de Roche utilizando los ciclos como se describen en la tabla 4.

Nombre del Programa	Ciclos	Modo de análisis
Preincubación	1	Ninguno
<i>Temperatura (°C)</i>		<i>Tiempo (hh:mm:ss)</i>
95		00:10:00
Nombre del Programa	Ciclos	Modo de análisis
Amplificación	45	Cuantificación
<i>Temperatura (°C)</i>		<i>Tiempo (hh:mm:ss)</i>
95		00:00:10
60		00:00:30
72		00:00:01
Nombre del Programa	Ciclos	Modo de análisis
Enfriamiento	1	Ninguno
<i>Temperatura (°C)</i>		<i>Tiempo (hh:mm:ss)</i>
4		00:00:30

Tabla 4. Condiciones de reacción para las qPCRs.

Análisis estadístico

Los resultados corresponden al promedio y la desviación estándar de los números de muestras indicados. El análisis estadístico fue realizado usando la prueba de Anova y la prueba t-Student. La significancia estadística fue con un p-value <0.05.

Resultados

Se procesaron más de 80 muestras de SCU, las cuales fueron distribuidas para los diferentes análisis que se realizaron y serán descritas a continuación, en las diferentes secciones.

Obtención de las poblaciones directamente de la SCU.

Las muestras de SCU fueron procesadas para obtener la fracción de CMN. En promedio en cada unidad de SCU, las CMN mostraron un contenido de células formadoras de colonias (CFC) del 0.33%, de las cuales el 69% fueron CFC eritroides y el 31% de CFC mieloides. Esta fracción fue enriquecida en células CD34+Lin- mediante inmunoselección negativa, obteniendo un enriquecimiento del 55 – 80%. El porcentaje de recuperación en este punto fue del 0.6% utilizando el sistema EasySep, es decir de aproximadamente 1.2×10^6 células; esta población mostró un 22% de CFC totales, de las cuales el 48% fue de CFC eritroides, el 51% de CFC mieloides y el 1% de CFC mixtas. A partir de esta fracción celular, fueron obtenidas las tres poblaciones de interés, CTH, CPE y CPM, utilizando el inmunofenotipo descrito anteriormente (Figura 6). Se obtuvieron en promedio 22,000 CTH con un 25 % de CFC totales, de las cuales el 46% fueron CFC eritroides, el 52% CFC mieloides y el 2% CFC mixtas. Para las CPE se obtuvieron 55,000 células con una formación de colonias del 35% y con más del 95% de CFC eritroides. De las CPM por su parte, se recuperaron 36,000 células con una formación de CFC de más del 93% mieloides. Para las poblaciones obtenidas por FACS, las purezas se mantuvieron por arriba del 97% y la viabilidad por arriba del 90% (Tabla 5).

Población	Número de células (x10⁶)	% CFC Totales	% CFC Eritroides	% CFC Mieloides	% CFC Mixtas
CMN	249 ±101.1	0.33 ± 0.32	69 ±1.4	30 ±0.5	0
CD34+ Lin-	1.26 ±0.34	22 ± 15	48 ± 5	51 ± 10	1 ±0.1
CTH	0.022 ±0.018	25 ± 10	46 ±6	52 ±5	2 ± 0.3
CPE	0.055 ±0.018	35 ± 10	95 ± 10.4	5 ±2.2	0
CPM	0.036 ±0.017	23 ± 7.4	7 ±5.8	93 ±11.2	0

Tabla 5. Números de células recuperadas de la SCU. Las unidades de SCU fueron procesadas para obtener las diferentes fracciones celulares. A media que se obtienen poblaciones con mayor pureza el porcentaje de células formadoras de colonias (CFC) aumenta. Además, cuando se purificaron progenitores linaje específico, las CFC obtenidas en esas poblaciones fueron principalmente mieloides o eritroides, según el tipo de progenitor. n=20.

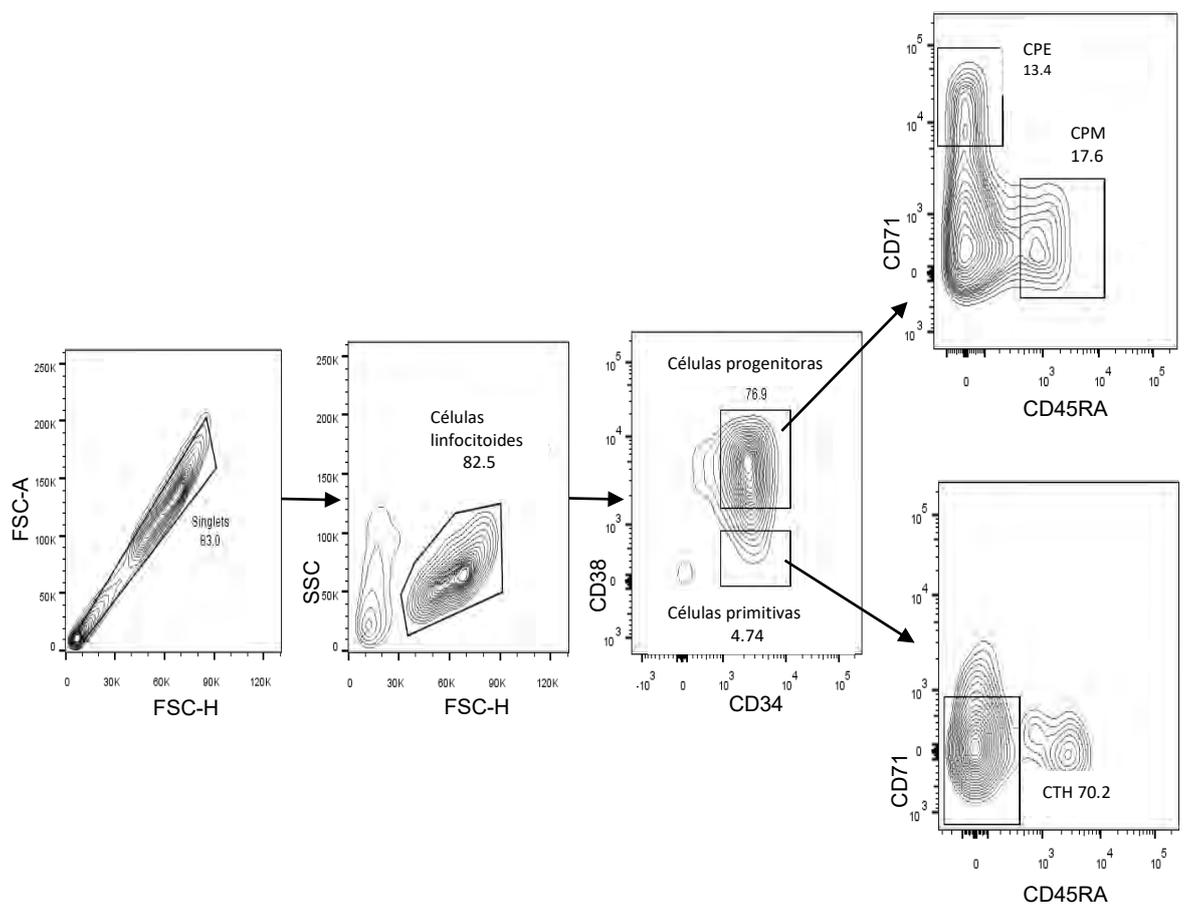


Figura 6. Estrategia para obtener por FACS las CTHs, CPEs y CPMs a partir de una población enriquecida en CD34+Lin- obtenida por inmunoselección negativa. La estrategia comienza con la identificación de las células que se encontraban de forma individual en la suspensión. Posteriormente a través de las características de tamaño y complejidad, se seleccionó la población con características linfocitoides. Utilizando a los marcadores CD34 y CD38, se seleccionaron a las poblaciones enriquecidas en CTH y a las CPH. En seguida, con los marcadores CD71 y CD45RA se purificó a la población de CTH y a los CPE y CPM.

Evaluación de la capacidad funcional de las poblaciones CMN y CD34+Lin-

La proliferación fue definida como la capacidad de una célula de dividirse, sin importar el estado de maduración o el linaje de las células que se generan. En este sentido, se evaluó la capacidad de proliferación de las CMN cultivándolas en las condiciones eritroide y mieloide, descritas en materiales y métodos. Se observó un incremento máximo de 13 veces al día 15, en la condición eritroide y un incremento de 8 veces al día 20, para la condición mieloide. En ambos casos, las cinéticas de proliferación disminuyeron a partir de los días mencionados en cada condición de cultivo (Figura 7). Cabe mencionar que como control se cultivaron las células sin añadir citocinas al medio.

Por otro lado, se analizó la capacidad de expansión de las células, es decir, la capacidad para que al dividirse, las células generadas conserven características de la población original. Este potencial fue evaluado por la capacidad de las CMN para formar colonias en cultivos semisólidos. Se observó un incremento de 8 veces para la condición eritroide al día 10 y de 7 veces para la condición mieloide al día 10; en ambos casos este día fue el de mayor incremento y a partir de este punto, para la condición eritroide, fue evidente la rápida pérdida de la capacidad de expansión de las CMN, mientras que en la condición mieloide, la pérdida se observó de forma gradual (Figura 8).

Por otro lado, para evaluar el tipo de células que se estaban generando en el cultivo, se realizó un análisis de la cinética de morfología para cada una de las condiciones de cultivo. Para este análisis las células fueron clasificadas en blastos linfocitoides, si no se observaron características propias de linaje y células mieloides o células eritroides, cuando se identificaron características morfológicas pertenecientes a estos linajes. Se observó que en el control, prevaleció la presencia de blastos indiferenciados en los días cero y cinco, puntos hasta donde fue posible realizar la evaluación dado que las células

murieron al no tener citocinas que favorecieran su crecimiento en el cultivo. Por su parte, la condición mieloide favoreció a la generación de células linaje granulomonocítico a lo largo de la cinética, sin embargo, para el día 20 no fue posible realizar la determinación dado el agotamiento de las células en el cultivo. Por otro lado, si bien, en la condición eritroide se observó mayoritariamente que las células generadas fueron de linaje eritroide, sin embargo se observó también un 10% de células mieloides.

Estos datos sugieren que la especificación de linaje hematopoyético que se genera *in vitro*, depende de las condiciones del (Figura 9).

Cuando se analizó el potencial de proliferación de la población enriquecida en células CD34+Lin-, utilizando las condiciones de cultivo eritroide y mieloide, se observó que a diferencia del incremento en veces máximo observado para la población CMN (13 veces al día 15), en esta población el incremento máximo fue de 204 veces para la condición eritroide al día 10, y de 115 para la condición mieloide al día 15. En ambos casos la cinética disminuyó de manera paulatina hacia el final de la medición. Al igual que en la población CMN, se utilizó un control cultivando las células sin añadir citocinas al medio y el resultado de este cultivo fue la pérdida de la población celular al día 10 (Figura 10).

Interesantemente, al evaluar la capacidad de expansión de la población enriquecida en células CD34+Lin-, se encontró un incremento de 7 veces al día cinco para la condición eritroide y un incremento de 4 veces al día cinco para la condición mieloide (Figura 11). Es de notar que estos incrementos en veces observados en la población enriquecida en CD34+Lin-, son menores que los observados en la población CMN, por lo que con esta información, se hipotetizó que las células estaban diferenciándose en periodo de tiempo más corto, por lo que se realizó la evaluación por morfología de la cinética de diferenciación, observándose una generación de células linaje específico a partir del día cinco (96% para la condición mieloide y 70% para la condición eritroide); es decir, en menor tiempo con respecto a las CMN. Es de notar que al igual que lo observado

previamente, las condiciones de cultivo fueron determinantes en la generación de las células del linaje eritroide, en la condición eritroide, y de linaje mieloide, en la condición mieloide (Figura 12).

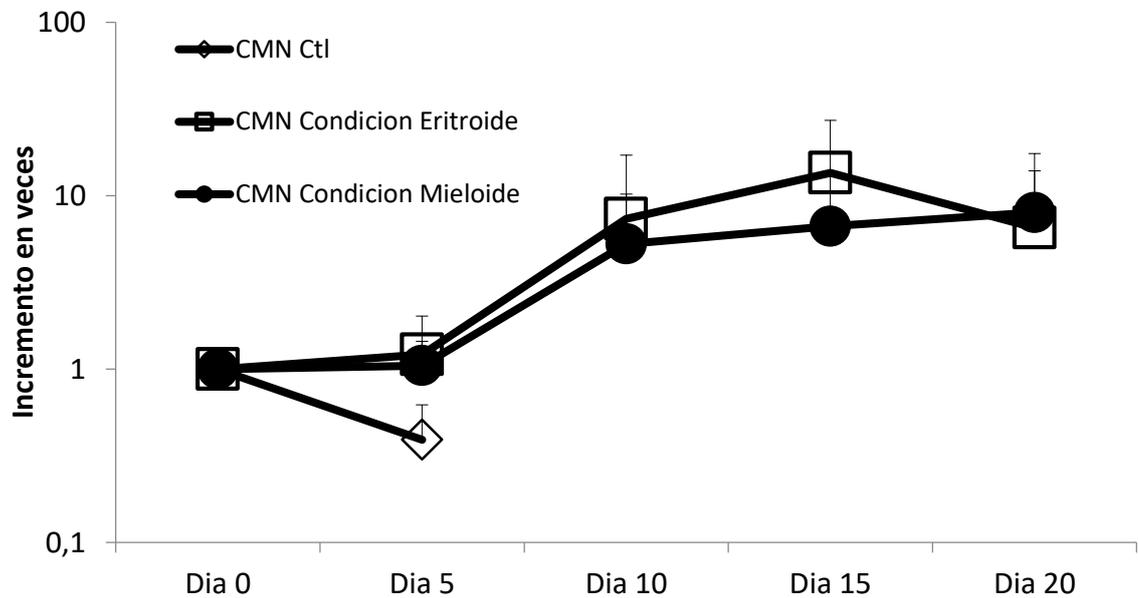


Figura 7. La capacidad de proliferación *in vitro* de la capacidad de la población CMN cultivadas en la condición eritroide o condición mieloide muestran cinéticas similares entre sí. Los datos representan el incremento en veces del número total de células nucleadas comparadas contra el día cero. Se presentan los promedios y las desviaciones estándar de 7 experimentos independientes. Prueba t-Student $p > 0.05$.

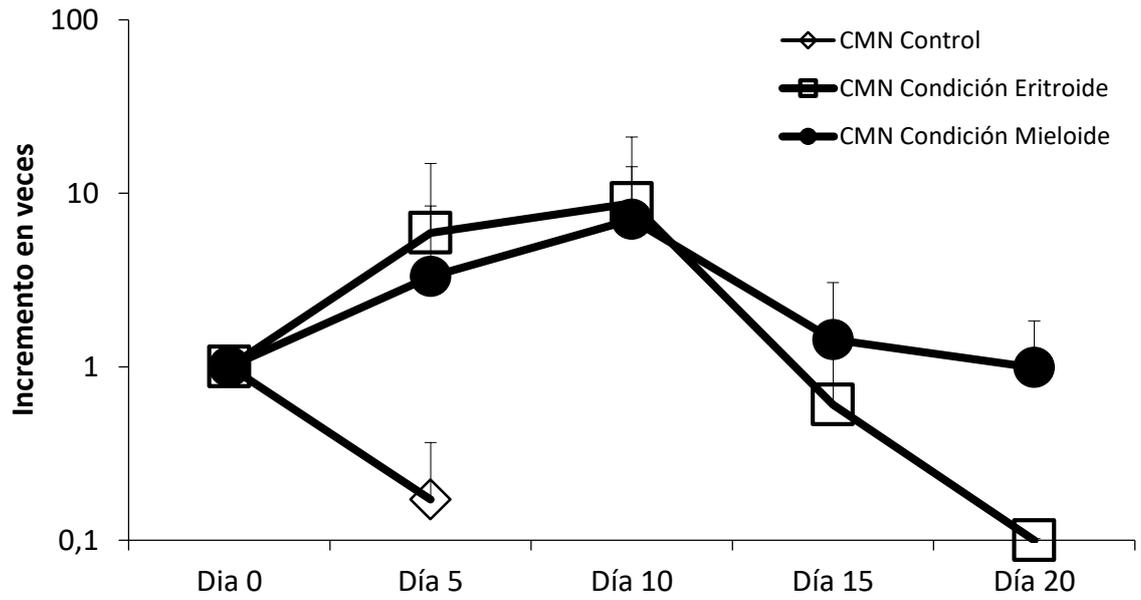


Figura 8. La capacidad de expansión de las CFC *in vitro* de las CMN, se redujo rápidamente cuando la población fue cultivada en la condición eritroide. Los datos representan el incremento en veces del número total de CFC comparadas con el día cero. Se presentan los promedios y las desviaciones estándar de 7 experimentos independientes. Prueba t-Student $p > 0.05$.

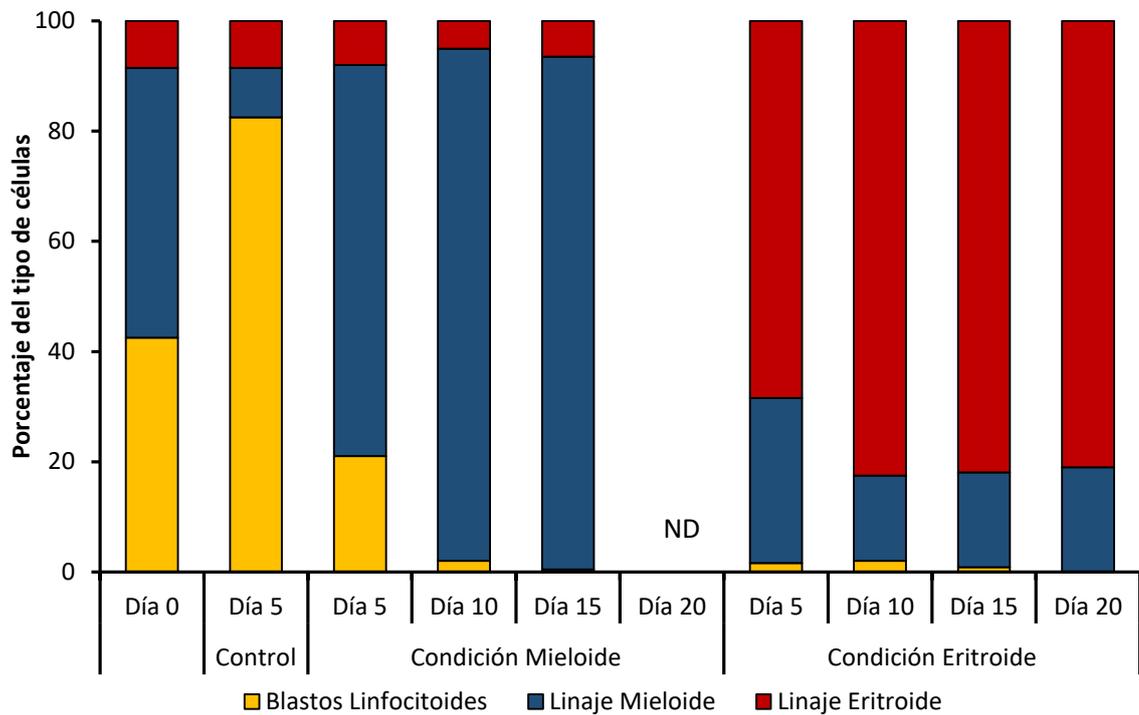


Figura 9. La cinética de diferenciación *in vitro* de la población CMN, mostró que las condiciones de cultivo son determinantes para la generación de células comprometidas a linaje. Los datos representan el porcentaje al que corresponden las células generadas *in vitro*, dentro del número total de la población. Se presentan los promedios de 3 experimentos independientes. ND: no determinado.

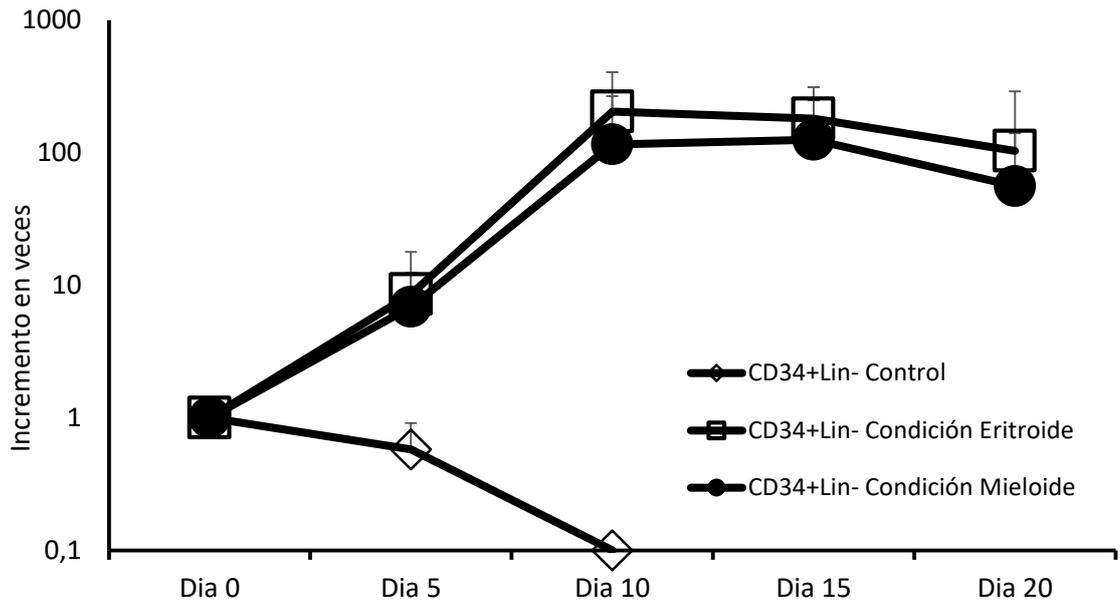


Figura 10. La capacidad de proliferación *in vitro* de la capacidad de la población CD34+Lin- cultivada en la condición eritroide o condición mieloide muestran cinéticas similares entre sí. Los datos representan el incremento en veces del número total de células nucleadas comparadas contra el día cero. Se presentan los promedios y las desviaciones estándar de 7 experimentos independientes. Prueba t-Student $p > 0.05$.

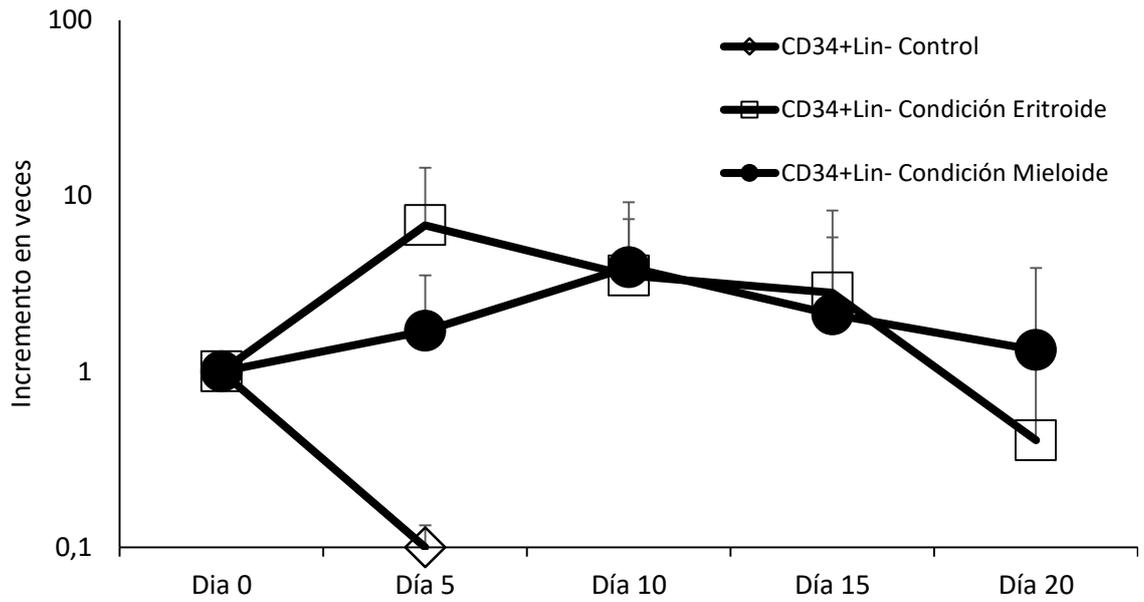


Figura 11. Expansión de CFC de la población CD34+Lin-. La capacidad de expansión de CFC en la población CD34+Lin- es mantenida por periodo de tiempo mayor cuando se cultivan en condición mieloide, mientras que en la condición eritroide, esta capacidad parece disminuir en un menor lapso de tiempo. Los datos representan el incremento en veces del número total de CFC comparadas con el día cero. n=7. Se presentan los promedios y las desviaciones estándar. Prueba t-Student $p > 0.05$.

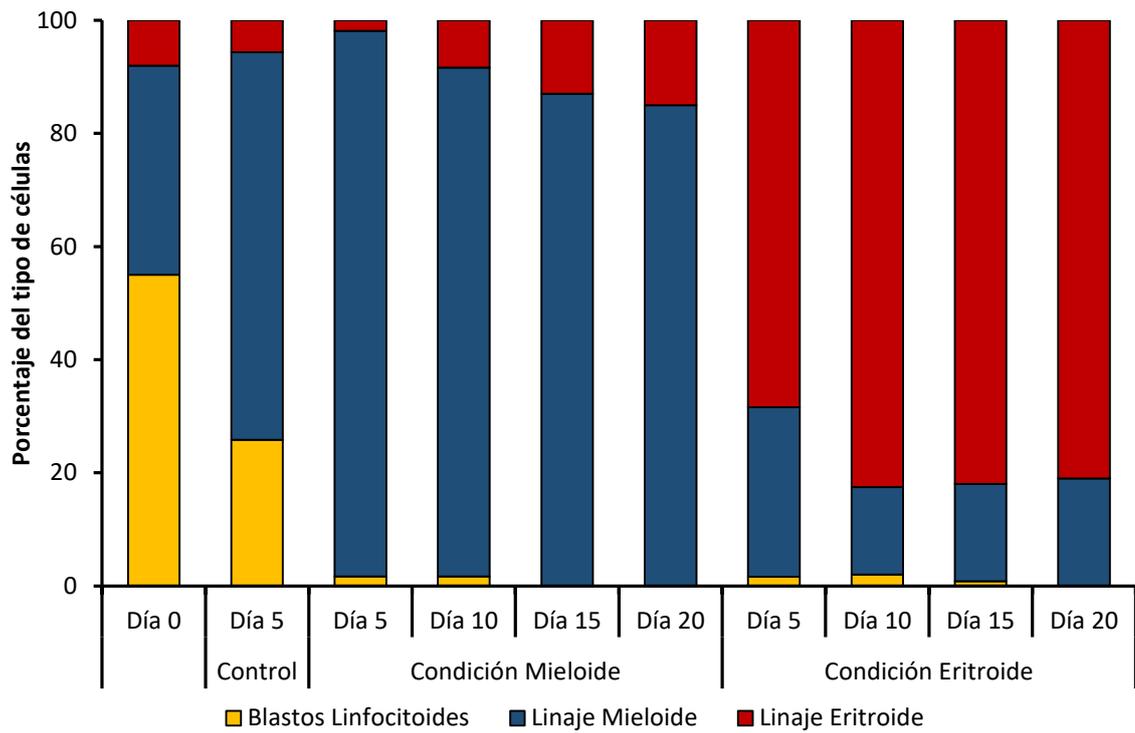


Figura 12. Evaluación *in vitro* de la cinética de diferenciación de la población CD34+Lin-. Se observa la generación de células linaje específico a partir del día cinco para las condiciones mieloide y eritroide. Los datos representan el porcentaje al que corresponden las células generadas *in vitro*, dentro del número total de la población. Se presentan los promedios de 3 experimentos independientes.

Establecimiento de un protocolo de cultivo para generar las células progenitoras a partir de CTH obtenidas de SCU.

Una vez que se determinó que las combinaciones de citocinas regulaban de forma efectiva el comportamiento de las poblaciones celulares y con el objetivo de establecer un sistema eficiente para generar los progenitores mieloides y eritroides, las CTH obtenidas de la SCU (fCTH) fueron puestas en cuatro condiciones de cultivo utilizando diferentes combinaciones de citocinas. Se utilizó la combinación de SCF, FL, TPO e IL6 (Seminal) como primera condición de cultivo; a la condición Sem se le adicionó IL3 (Sem + IL3), y esta fue la segunda condición de cultivo. Al día cinco, las células cultivadas en Sem + IL3 se dividieron en tres combinaciones diferentes: una parte continuó cultivada en la condición inicial, una segunda parte de la suspensión celular fue trasladada a la condición SCF, IL3, TPO, EPO, IL6 y FL (condición eritroide); la tercera porción de las células se cultivaron en SCF, IL6, FL, GMSCF y GMSCF (condición mieloide) (Figura 13). Con estas condiciones, se observó que hubo una mayor proliferación en las células cultivadas en Sem + IL3 (4000 veces), en contraste con la condición seminal (1800 veces), al día cinco. Cuando las células que inicialmente estuvieron en la condición Sem + IL3, se cambiaron de condiciones de cultivo al día cinco, se observaron números celulares de alrededor de 900,000 veces al día 10 en las condiciones analizadas (Sem + IL3, eritroide y mieloide). Sin embargo, de manera interesante, los números celulares aumentaron considerablemente al día 15, alcanzando los 3.5 millones de células en la condición Sem + IL3, 129 millones de células en la condición eritroide y 60 millones de células en la condición mieloide; estos datos reflejan un gran aumento en el número celular en comparación con las 907 mil células obtenidas en la condición seminal (Figura 14).

En seguida se analizó la cinética de expansión de progenitores, en busca del día óptimo para generar los CPE y CPM (ivCPE e ivCPM) en el sistema de cultivo. Los resultados mostraron que las condiciones Sem + IL3, eritroide y mieloide incrementaron los números celulares 5 veces con respecto a la condición seminal al día 10 (10,000 células en condición seminal, 54,000 células

en Sem + IL3, 51,000 células en condición eritroide y 52,000 células en condición mieloide). Para el día 15 el incremento con respecto a la condición seminal fue de 3.46 veces para Sem + IL3, 2.76 veces para la condición eritroide y 3.72 veces para la condición mieloide. Es decir, en números absolutos, al día 10, se obtuvieron 54×10^5 CPH en la condición Sem + IL3, 51×10^5 CPH en la condición eritroide y 51×10^5 CPH en la condición mieloide. Para el día 15, los números absolutos de progenitores que se obtuvieron fueron 471×10^5 CPH en la condición Sem + IL3, 375×10^5 en el cultivo con citocinas eritroides y 507×10^5 CPH en el cultivo con condición Sem mieloide; siendo este día el que se obtuvieron mayores números celulares (Figura 15).

Con el fin de identificar el día óptimo para obtener a los progenitores de interés, fue importante determinar las cinéticas de diferenciación para buscar el tipo de células que estaban generándose en el cultivo. Para estos experimentos, las células fueron divididas en células con morfología linfocitoide, precursores mieloides tempranos, precursores mieloides tardíos, precursores eritroides tempranos y precursores eritroides tardíos. Las cinéticas de morfología mostraron que la condición seminal al día 10 genera más del 85% de células mieloides y apenas un 10% de células eritroides (Figura 16a); por otro lado, la condición Sem + IL3 generó un 58% de células eritroides y 48% de células mieloides al día 10; sin embargo para el día 15 en el cultivo Sem + IL3 prevalecieron las células eritroides (78%) (Figura 16b). Por otro lado, la condición eritroide generó más del 72% de progenitores eritroides al día 10 y 94% de células de este linaje al día 15, incluyendo células en estados de diferenciación avanzados (Figura 16c). Éste fenómeno fue similar, cuando se analizó la condición mieloide, pero se favoreció la generación de células de linaje mieloide, llegando a hasta el 98% de precursores tardíos (Figura 16d). Ésto demuestra que el utilizar las citocinas que especifican linaje, se favorece la pronta diferenciación de las fCTH. Todos estos datos juntos demuestran que la condición Sem + IL3, en el día 10, es la que favorece la obtención de los progenitores mieloides y eritroides.

Para validar el sistema, se evaluó por citometría de flujo, el contenido de CPE y CPM dentro de la población CD34+ generada en el cultivo Sem + IL3. Se observó que los porcentajes de las poblaciones fueron similares para ambos tipos de progenitores: fCPE 24,2% \pm 6,3% e ivCPE 24,2% \pm 3,9%; por otro lado, se obtuvo 3,32% \pm 0,4% en fCPM y 6,2% \pm 2,89% para ivCPM (Figura 17). Es importante mencionar que no fue posible evaluar el incremento en veces de las CPH generadas *in vitro*, dado que los cultivos iniciaron con una población CD34+ CD38+ CD45RA- CD71- Lin-, y los CPE son CD34+ CD38+CD45RA-CD71+ Lin- y los CPM son CD34+ CD38+CD45RA+CD71 Lin-, es decir, no se contó con un punto de referencia al día cero para poder realizar la evaluación. Estos datos concluyen que utilizar la condición Sem + IL3 al día 10 para genera ivCPE e ivCPM sin llegar a estadios avanzados de diferenciación. Esto es importante para obtener la mayor cantidad de progenitores posible y además, los datos demuestran que las frecuencias obtenidas de las CPE y CPM, son similares dentro de la población CD34+ generada *in vitro*, respecto a la población CD34+ obtenida en fresco.

Para obtener a las ivCTH, se tomó como referencia el trabajo en el que establecieron un sistema de cocultivo de las CTH con la línea estromal OP-9, y medio libre de suero fetal bovino suplementado con una combinación de siete citocinas (FL, IL6, IL3, GM-SCF, G-SCF, TPO y SCF) (Fernandez-Sanchez et al., 2011). Los cultivos iniciaron con 2.3×10^4 fCTH. Después de siete días de cultivo se recuperaron 7.76×10^5 en promedio, lo que significó un incremento de 33 veces. De esas células, 8% corresponden a células CD34+ y el 6.6% a células CD34+CD38-, indicando un incremento de 2.6 y de 2.2 veces, respectivamente. Interesantemente, 26,400 células corresponden al inmunofenotipo troncal (ivCTH), esto significó un incremento de 1.13 veces comparado con el día cero (Figura 18).

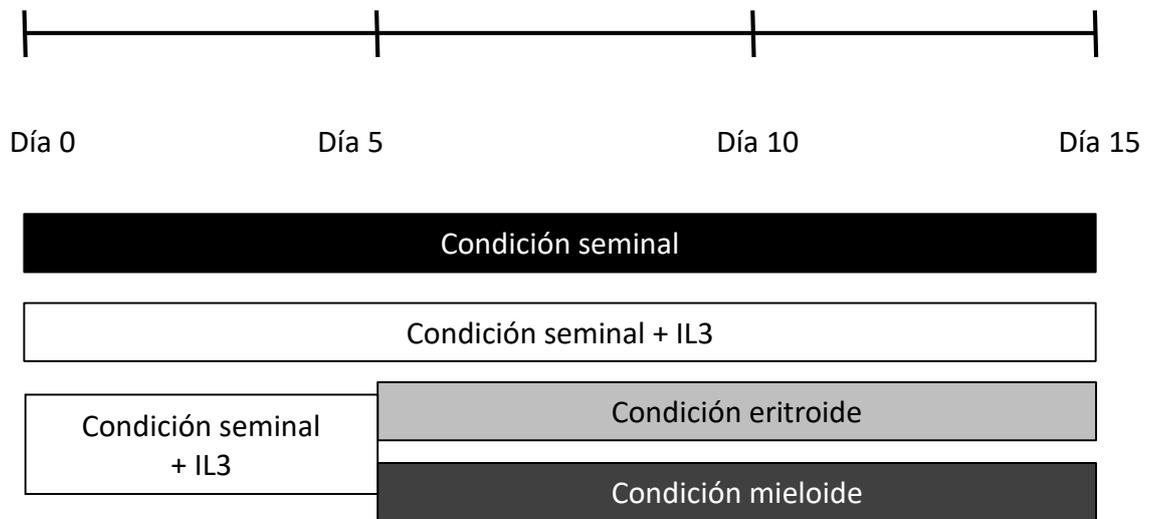


Figura 13. Esquema de cultivo de las CTH para la generación de CPH. Las fCTH obtenidas por FACS se cultivaron en un medio libre de suero fetal bovino y estroma, utilizando cuatro combinaciones de citocinas: seminal (IL6, TPO, FL y SCF), seminal + IL3 (Sem + IL3), condición eritroide (IL6, IL3, FL, TPO y EPO) y condición mieloide (IL6, FL, GM-SCF y G-SCF). Las mediciones se hicieron en intervalos de cinco días.

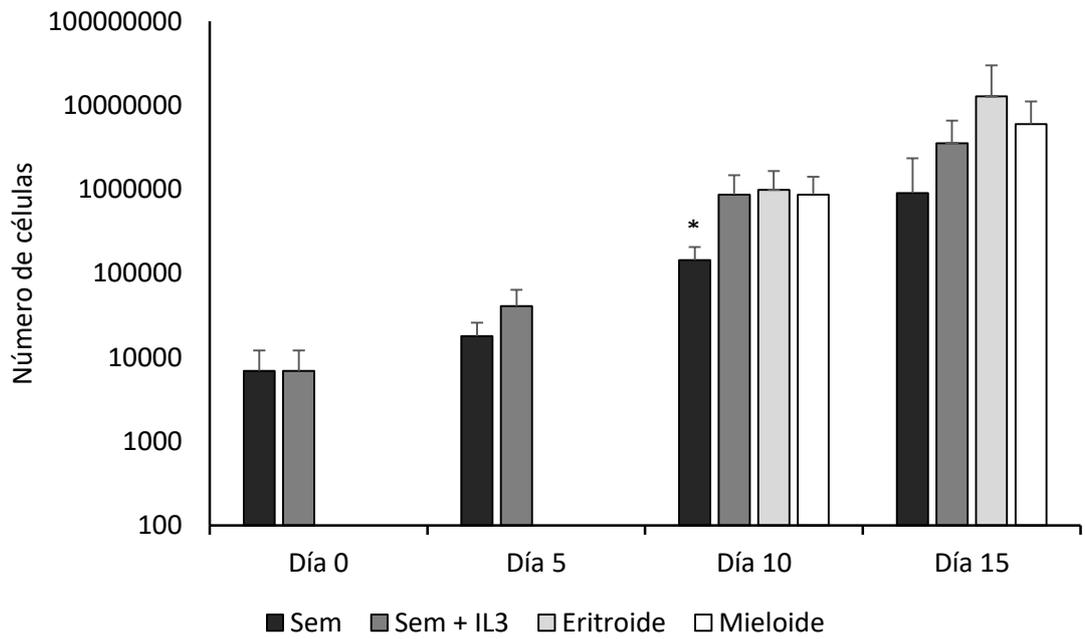


Figura 14. Evaluación *in vitro* de la capacidad de proliferación de la población fCTH (CD34+ CD38- CD45RA- CD71- Lin-). Los datos representan el número total de células nucleadas obtenidas en el cultivo. Se presentan los promedios y las desviaciones estándar de 3 experimentos independientes. Prueba t-Student $p > 0.05$.

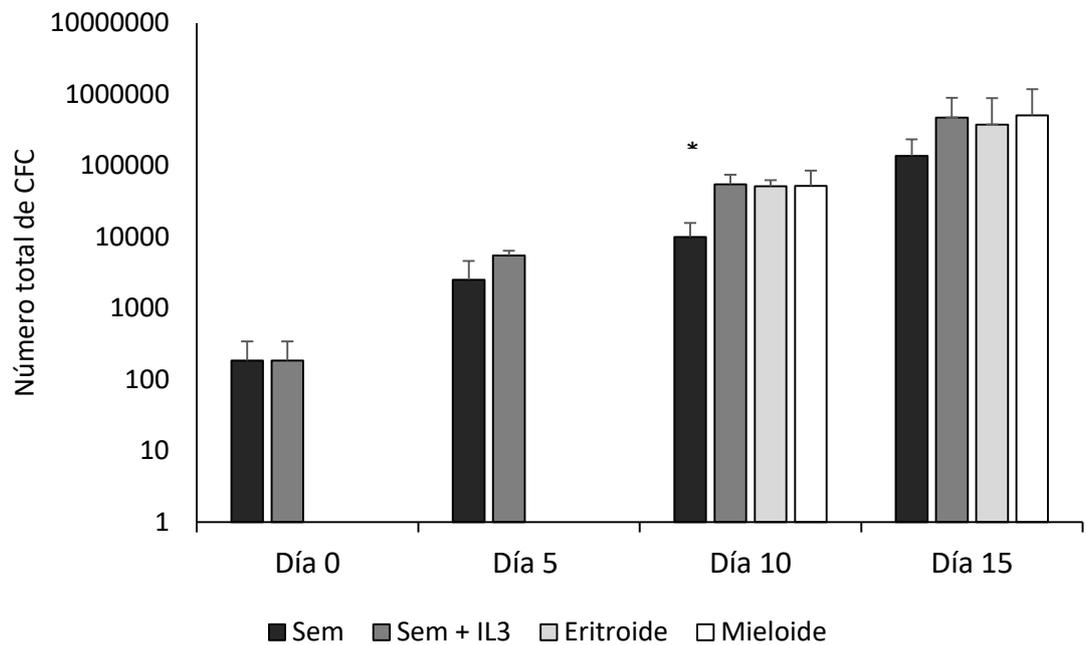


Figura 15. Evaluación *in vitro* de la capacidad de generación de CFC a partir de la población fCTH en un medio libre de suero y estroma. Los datos representan número total de CFC obtenidos en cada día en las diferentes condiciones de cultivo. Se presentan los promedios y las desviaciones estándar de 3 experimentos independientes. Prueba t-Student $p > 0.05$

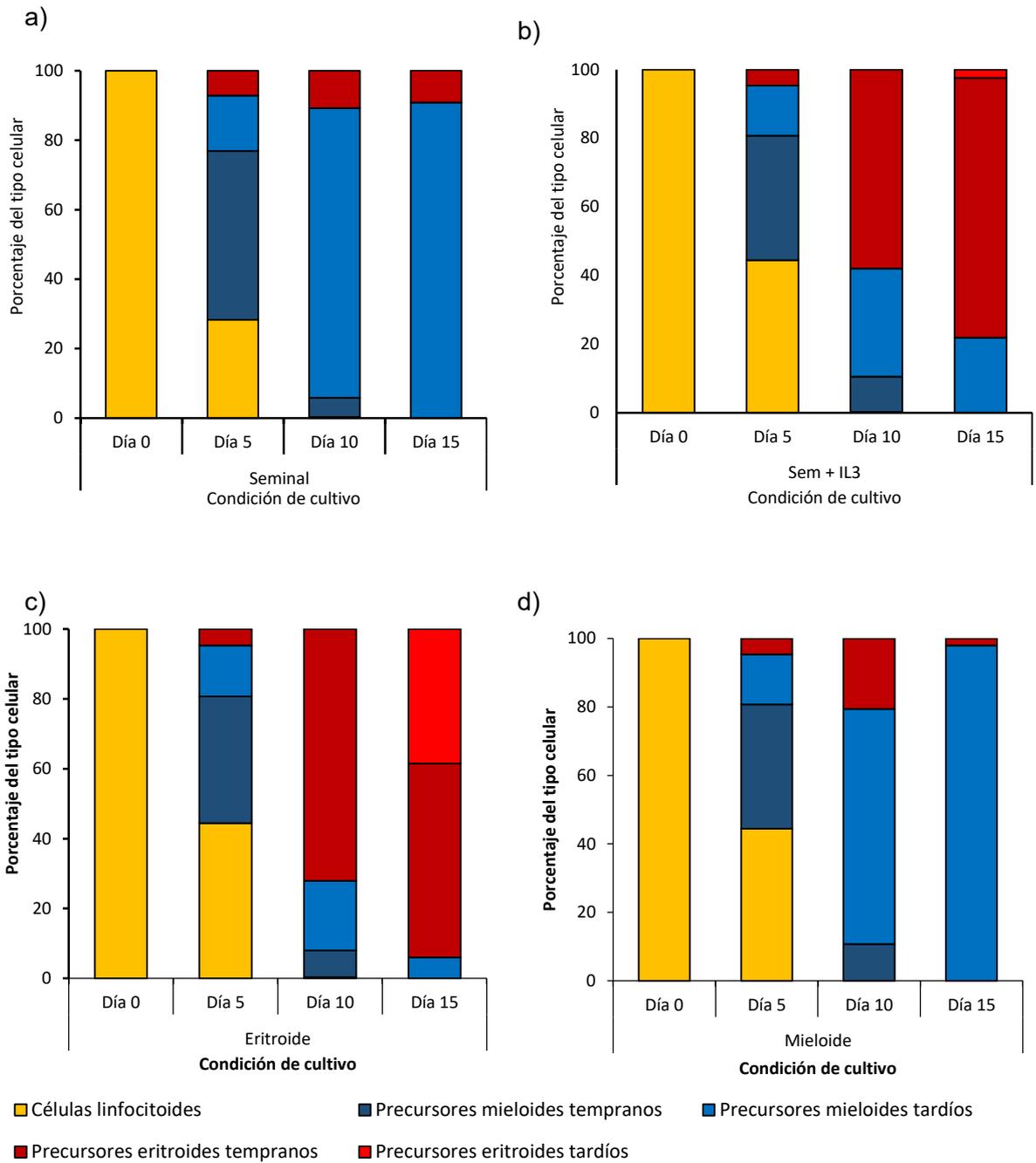


Figura 16. Evaluación *in vitro* de la cinética de diferenciación de la población fCTH evaluada por morfología. a) Condición seminal, b) condición Sem + IL3, c) condición eritroide y d) condición mioide. Los datos corresponden al porcentaje del contenido celular linaje específico dentro cada cultivo. Se presentan los promedios de 3 experimentos independientes.

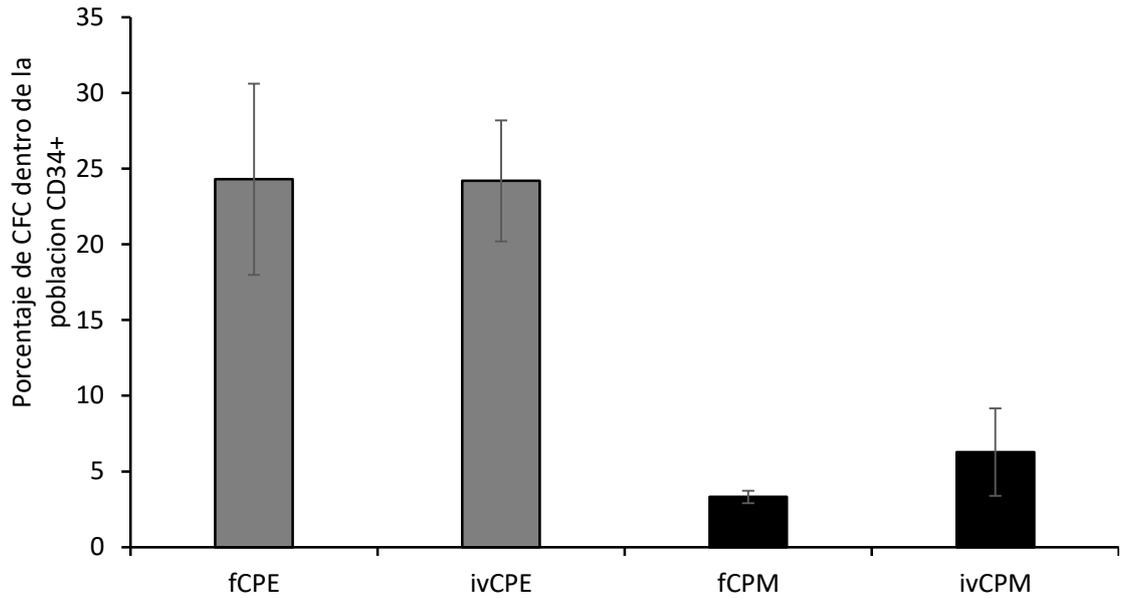


Figura 17. Evaluación del contenido de progenitores por citometría dentro de la población CD34+. CPE se evaluó utilizando el inmunofenotipo CD34+CD38+CD45RA-CD71+Lin- y los CPM se evaluaron utilizando el inmunofenotipo CD34+CD38+CD45RA+CD71-Lin-. Los datos corresponden al porcentaje del contenido celular linaje específico dentro cada cultivo. Se presentan los promedios y desviaciones estándar de 3 experimentos independientes. Prueba t-Student $p > 0.05$.

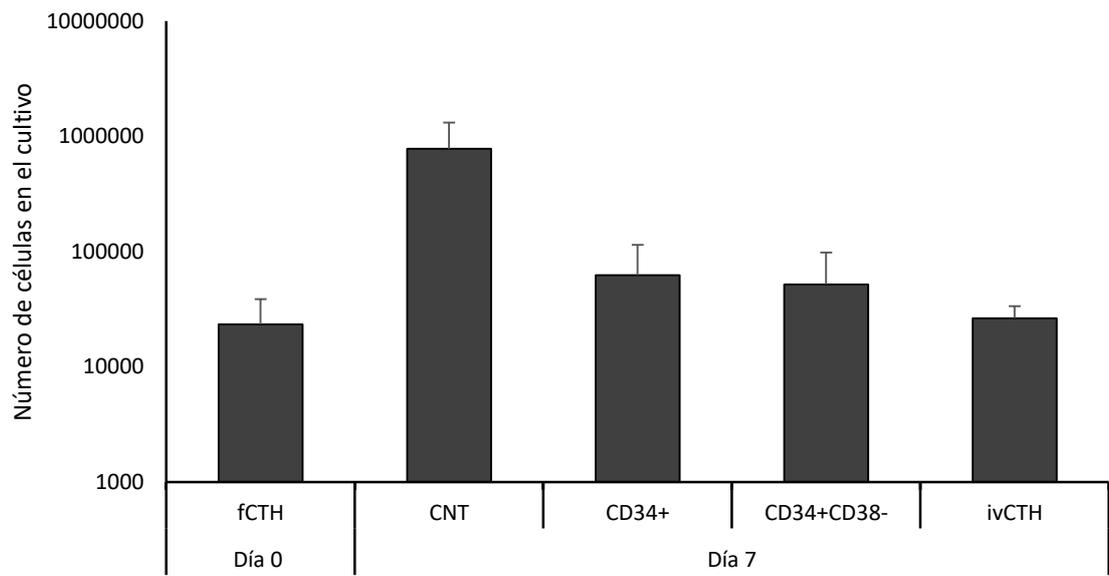


Figura 18. Generación *in vitro* de las ivCTH después de siete días de cocultivo de las fCTH con la línea estromal OP-9. Se presentan los promedios y desviaciones estándar de 3 experimentos independientes. CNT: células nucleadas totales.

Evaluación *in vitro* de la funcionalidad de las CTH.

Se hizo un análisis de las capacidades funcionales de las CTH, tanto fCTH como ivCTH. Parte de la caracterización realizada fue la determinación del contenido de células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC, por sus siglas en inglés) y de CFC.

En la población fCTH la frecuencia de las LTC-IC fue de 1 LTC-IC por cada 54 células (Figura 19). Esto es un enriquecimiento considerable comparado con la frecuencia de las CMN en donde se observó 1 por cada 9506 células, y con la frecuencia de LTC-IC en la población CD34+Lin- (1 por 670 células). Cuando analizamos las ivCTH, encontramos que el contenido de LTC-IC fue de 1 LTC-IC por cada 825 células, lo que significa una reducción importante en el contenido de estas células comparado con las fCTH. Además, a lo largo del cultivo, no se encontraron LTC-IC en esta población, a diferencia de las fCTH, donde el contenido se mantuvo constante a lo largo del experimento (Figura 19). Este dato resulta fundamental, pues sugiere que la población ivCTH podría no estarse autorrenovando.

Respecto al contenido de CFC, se observó que el 26.6% de las fCTH fueron capaces de formar colonias en cultivos semisólidos; de ese porcentaje, el 52% correspondió a CFC de linaje mieloide y el 46% a CFC de linaje eritroide y el 2% correspondió a CFC de tipo mixto (Figura 20). En cuanto al contenido de CFC en las ivCTH, se determinó que el 24.6% fue capaz de generar colonias, un dato similar al obtenido para las fCTH, sin embargo, cuando se analizó el linaje de las CFC que se formaron, el 91% de CFC fueron de linaje mieloide y apenas el 8% de linaje eritroide y el 1% de CFC de linaje mixto (Figura 20). Estos datos sugieren que las ivCTH tienen una tendencia a generar linaje mieloide, mientras que las fCTH muestran un potencial balanceado en la generación de linajes hematopoyéticos.

Cuando se analizó el potencial de proliferación, se determinó que ambas poblaciones mostraron cinéticas similares durante los 20 días en que se realizó el cultivo. Las fCTH alcanzaron un incremento de 99 veces, mientras que las ivCTH mostraron un incremento de 71 veces al día 20 del cultivo. Durante el experimento, las fCTH siempre mantuvieron un mayor número de células nucleadas totales en el cultivo con respecto a las ivCTH, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 21).

Por otro lado, el potencial de expansión fue mayor en las fCTH con respecto a las ivCTH. Las fCTH alcanzaron un incremento de 212 veces al día cinco, mientras que las ivCTH apenas lograron alcanzar un incremento de 21 veces al día 20, ambos datos representan el punto máximo de expansión (Figura 22). Interesantemente, a lo largo del cultivo se observó que existió una marcada tendencia a generar CFC de linaje mielóide y no CFC de linaje eritroide. En este sentido, para el día 20 las fCTH mostraron una generación del 87% de CFC mieloides y 12% de CFC eritroides, por su parte, las ivCTH generaron 98% de CFC de linaje mielóide y 2% de CFC linaje eritroide. Además, es importante mencionar que el contenido de CFC de linaje mixto se mantuvo durante el periodo de evaluación para las fCTH, mientras que para el día 15 en las ivCTH, este tipo de CFC no fue detectado. Estos datos concuerdan con que las ivCTH presentan mayor diferenciación con tendencia a linaje mielóide (Figura 23).

Para verificar lo anterior, se realizó el análisis de las cinéticas de diferenciación evaluando la morfología de las células generadas en el cultivo para ambas poblaciones. En este análisis se observó que para el día cinco, el 77% de las células del cultivo de las fCTH fueron indiferenciadas, el 16% de las células fueron de linaje mielóide y el 7% de linaje eritroide. Por su parte, para las ivCTH, el 45% fue de células indiferenciadas, el 53% de linaje mielóide y el 2% de linaje eritroide. En este punto, fuimos capaces de identificar precursores mieloides tardíos, que aumentaron del 5% al día cinco, al 21% para el día 10, 64% para el día 15 y al 83% para el día 20. Por su parte, la población fCTH apenas generó un 30% de precursores mieloides tardíos al día 20. En ningún caso se observó una generación mayor de células precursoras eritroides tempranas, y las células precursoras tardías no se observaron (Figura 24).

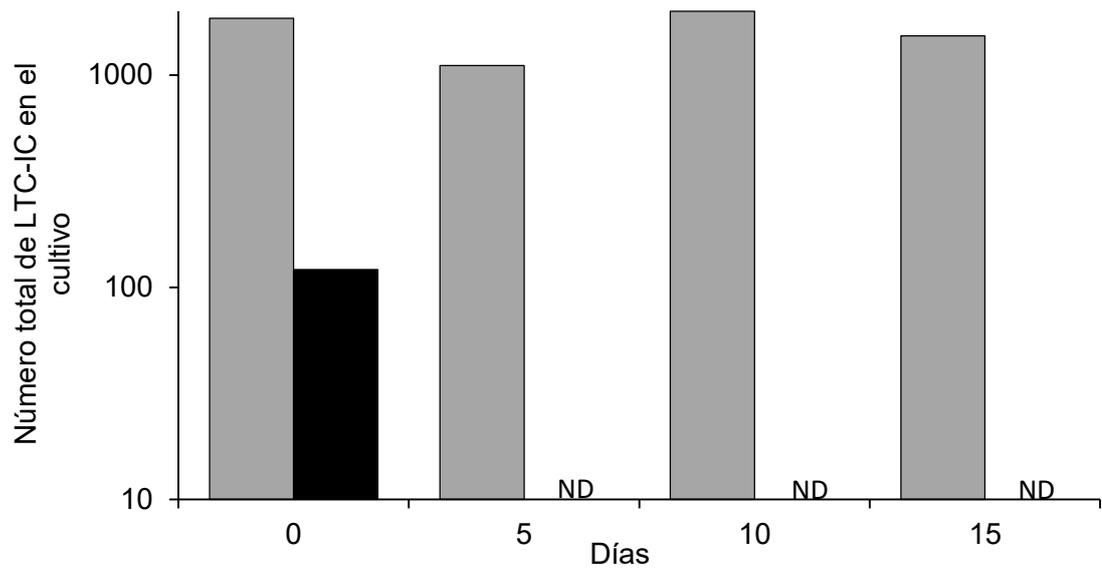


Figura 19. Evaluación del contenido de Células Inicadoras de Cultivos a Largo Plazo (LTC-IC). Se evaluó la cinética del contenido de LTC-IC a lo largo del cultivo. Para las fCTH (barras grises) no se observó disminución de esta fracción celular, mientras que para las ivCTH (barras negras) las LTC-IC no se detectaron a partir del día cinco, lo que sugiere que la capacidad de autorrenovación podría estar disminuida. Se presentan los valores absolutos de 5 experimentos diferentes. ND: no detectado.

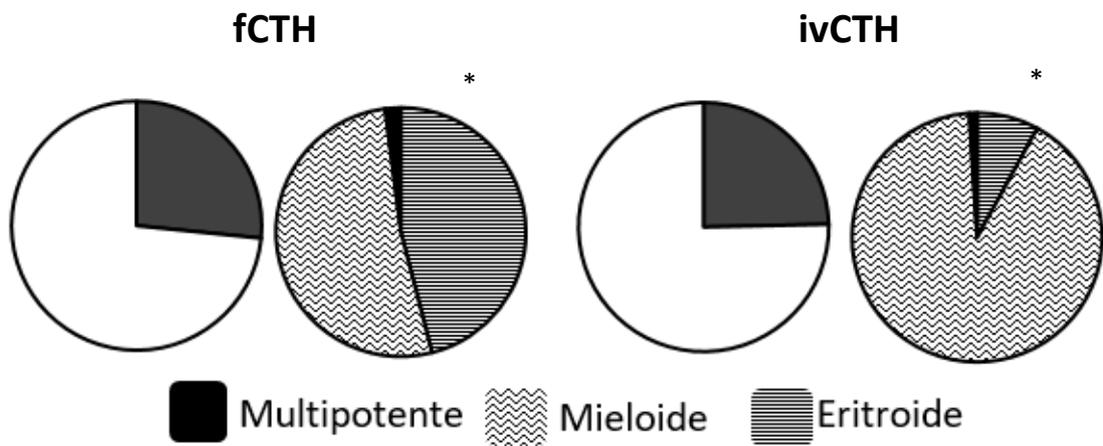


Figura 20. Evaluación del contenido de Células Formadoras de Colonias (CFC). Se evaluó el contenido de CFC al día cero, se observó un 25% de CFC al día cero, de las cuales para las fCTH están repartidas entre los linajes mieloides y eritroides, por su parte, las ivCTH muestran un 91% de CFC mieloides. Se presentan los promedios de nueve experimentos independientes. * $p < 0.05$.

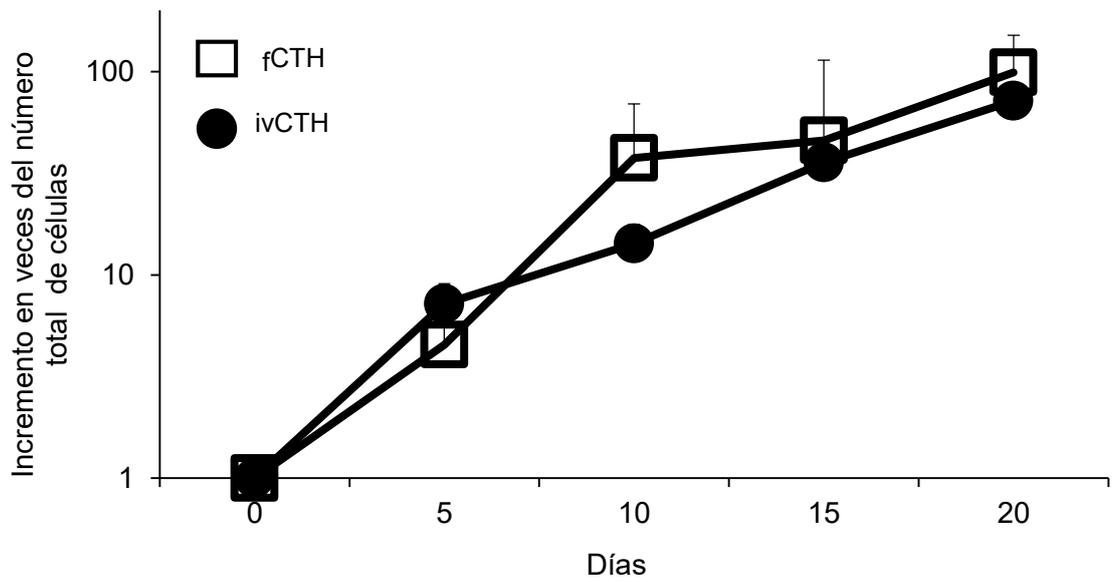


Figura 21. Cinética de proliferación de las fCTH e ivCTH a lo largo del cultivo utilizando la condición seminal. Los valores representan los promedios y las desviaciones estándar de tres experimentos independientes con respecto al día cero.

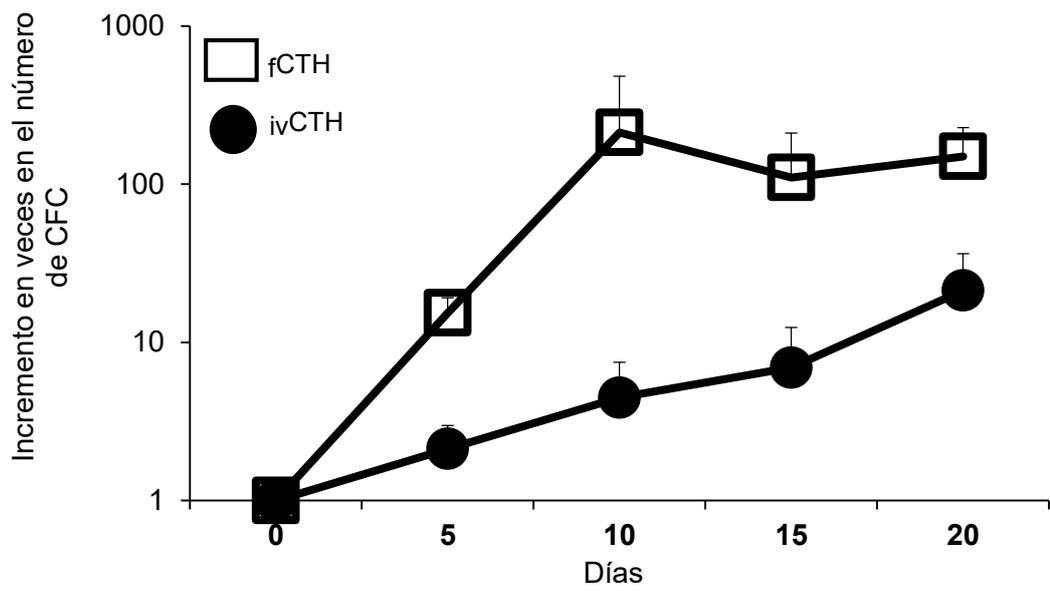


Figura 22. Cinética de expansión de CFC de las fCTH e ivCTH a lo largo del cultivo utilizando la condición seminal. Los valores representan los promedios y las desviaciones estándar de tres experimentos independientes con respecto al día cero.

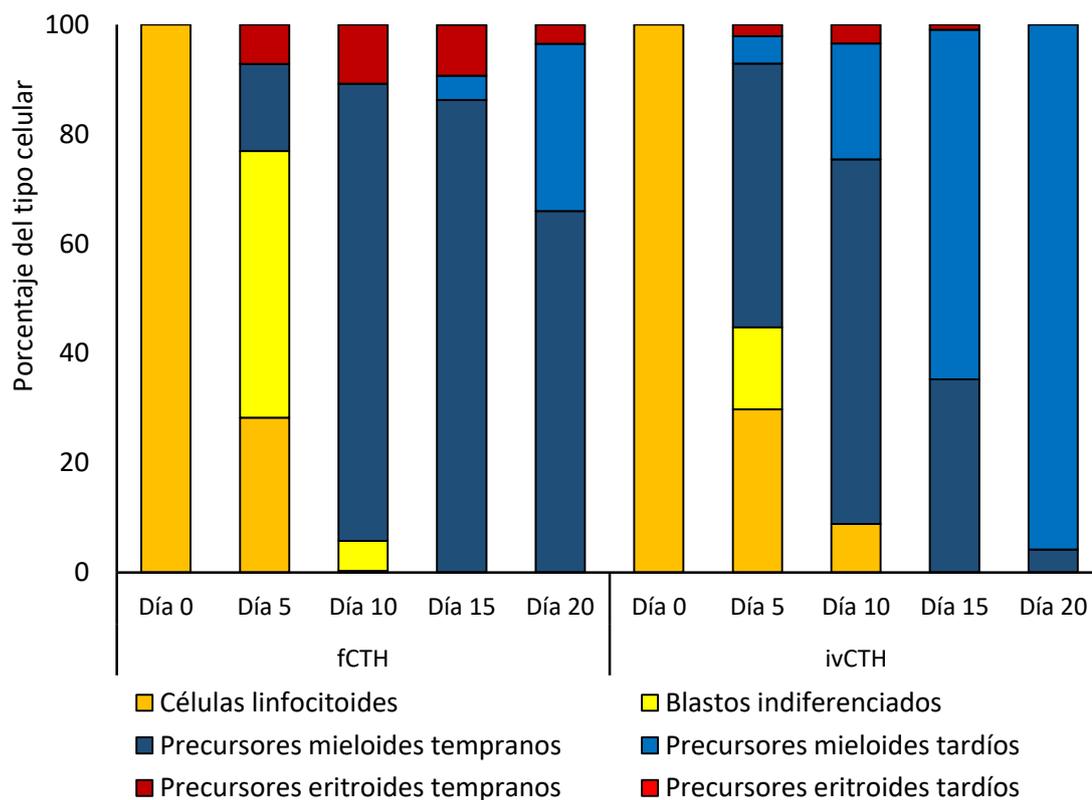


Figura 23. Evaluación *in vitro* de la cinética de diferenciación de la población CTH evaluada por morfología en condición seminal. Se observó una generación de células mieloides mayor al día cinco en la población ivCTH y una generación de células precursoras tardías al día 20, lo que sugiere que el tiempo de diferenciación para las ivCTH es menor respecto a las fCTH. n=3.

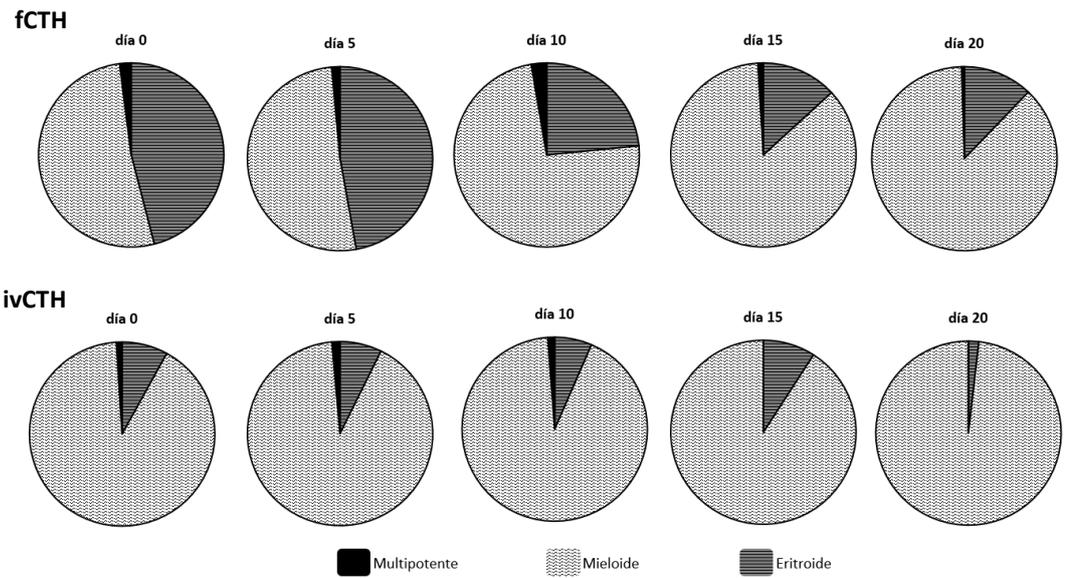


Figura 24. Frecuencia de las CFC generadas a lo largo del cultivo, presentados en porcentajes. La población fCTH mostro una generación de colonias balanceado al día cero y al día cinco. Sin embargo, a partir del día 10 se generaron CFC de linaje mieloides predominantemente. Es importante observar que en todos los puntos de la evaluación se observaron CFC mixtas. Las ivCTH por el contrario, mantuvieron una formación preferente de CFC mieloides desde el día cero y la generación de CFC mixtas se perdió al día 15. Se presentan los promedios de 9 experimentos independientes.

Análisis de los perfiles globales de expresión génica de las CTHs.

A continuación, se analizaron los perfiles globales de expresión génica para las poblaciones troncales utilizando el Affymetrix Gene Chip Human Transcriptome Array (HTA) 2.0, midiendo la expresión de 18,000 genes. Se evaluaron dos muestras de la población ivCTH y tres muestras de la población fCTH, observándose una clara relación entre los perfiles globales de expresión de cada población y mostrando patrones de expresión diferentes entre los grupos (Figura 25). Una vez que se describió que las CTH tenían capacidades funcionales diferentes, se realizó un análisis dentro de cada población, normalizando con los valores de la expresión de los genes constitutivos de cada población, se analizó la expresión de los demás genes. Se realizó un corte de los 453 genes con menor expresión, se encontró que existen 187 genes que se expresan de forma diferente en cada grupo de poblaciones, sin embargo, existen 266 genes diferencialmente expresados compartidos entre las fCTH e ivCTH. Por su parte, cuando el corte se realizó el corte de los 453 genes con mayor tasa de cambio a la alza, existen 340 genes compartidos y 113 genes expresados de forma individual (Figura 26 y tabla 6). Es interesante mencionar que el análisis del Gene Ontology de componentes celulares mostró que eventos como la remodelación de cromatina (marcado por la formación de puntos nucleares), el procesamiento de ARN y su traducción, así como la cadena respiratoria mitocondrial estaban modificadas en la población ivCTH (Figura 27). Demostrando con esto que las células no solo tienen cambios a nivel funcional, si no que estos cambios son el resultado de los elementos intrínsecos de las células.

Cuando se comparó el perfil de expresión de las ivCTH con respecto a las fCTH, se encontraron 541 genes diferencialmente expresados, de los cuales 298 estaban a la baja (1.64%) y 243 genes se encontraron a la alza (1.34%) (Figura 28), De los 243 genes a la alza en las ivCTH, se encontraron algunos como: CDC6, BRIP1, TOP2A, KCNQ5, DNMT3B y ANGPT1, dentro de las 10 genes con mayor cambio y de los 298 genes a la baja se encontraron IL1RL1, GNG4, ICAM1, SETBP1, GBP2, SMAD3 y CXCL8, dentro de los 10 con mayor cambio

(Tabla 7). Los análisis por KEGG y Gene Ontology indicaron que las vías de señalización NFkB, TNF, JAK-STAT, HIF y PI3K-AKT se encontraron significativamente encendidas en las ivCTH, y que procesos biológicos como ciclo celular, apoptosis, activación de leucocitos, diferenciación mieloide y remodelación de la cromatina estaban activados (Figura 29). Interesantemente, a pesar de encontrar genes como GBP4 y HOXB4, (implicados en autorrenovación), no se encontraron procesos ni vías a la baja en su actividad.

Para validar los microarreglos de expresión, se analizaron por qPCR los genes KCNQ5, CDC6, RUNX3 y GBP4 comparados contra GAPDH como gen constitutivo. Los genes correlacionaron con lo reportado por el arreglo. Estos genes fueron elegidos con base en su posible función biológica, independientemente de su tasa de cambio (Figura 30 y tabla 8).

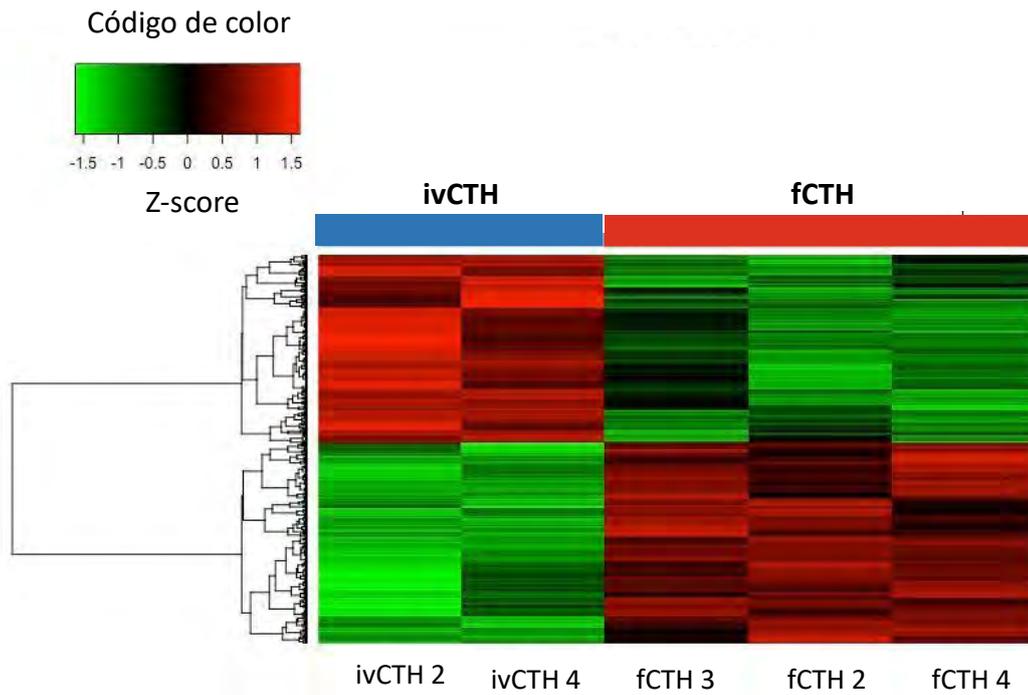


Figura 25. Heatmap de los patrones de expresión génica de las poblaciones de CTH. Las muestras están en columnas y los genes en fila. El análisis se realizó con el TAC Affymetrix software. Se muestran en rojo los genes a la alza y en verde los genes a la baja.

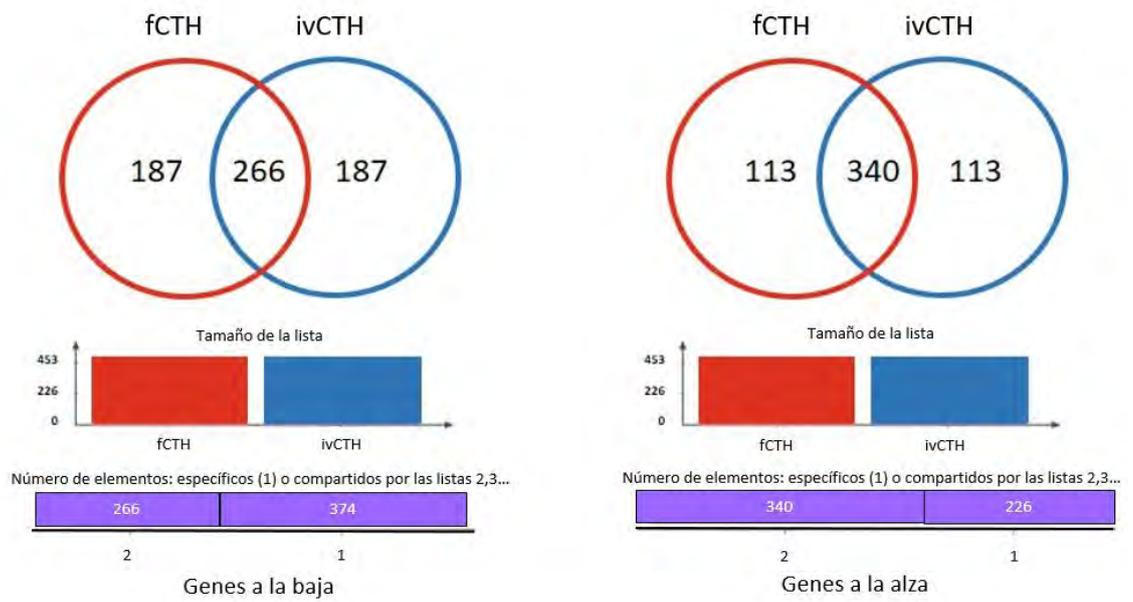


Figura 26. Diagramas de Venn mostrando el número de genes compartidos a la baja o a la alza entre las fCTH e ivCTH. El análisis se realizó con el TAC Affymetrix software.

Genes en ivCTH	Genes en fCTH	Genes en ambas poblaciones
TYMS	EEF1A1	CHRBP
LDHB	RPS3A	HIF1A
HIST1H2BM	RPS25	IL2RG
CDK4	TUBA1B	TAB2
NDUFAB1	RPL27	GBP4
TCP1	MTPN	SRGN
SCD	PABPC1	EMP3
CSE1L	ZZEF1	TNFA1P3
ZNF117	EEF1G	REL
GMPS	RPS16	HLA-DMA
PSMB3	TMSB10	SLC2A3
COX5A	SUMO2	RANBP9
HAUS1	TXN	HLA-B
FDTD1	NPM1	RGS1
SYNCRIP	FOSB	BIRC2

Tabla 6. Genes expresados de forma diferencial en las poblaciones ivCTH y fCTH. Se muestran los 15 genes con mayor tasa de cambio en las poblaciones de CTH, tanto los que se expresan en cada población como los que se comparten.

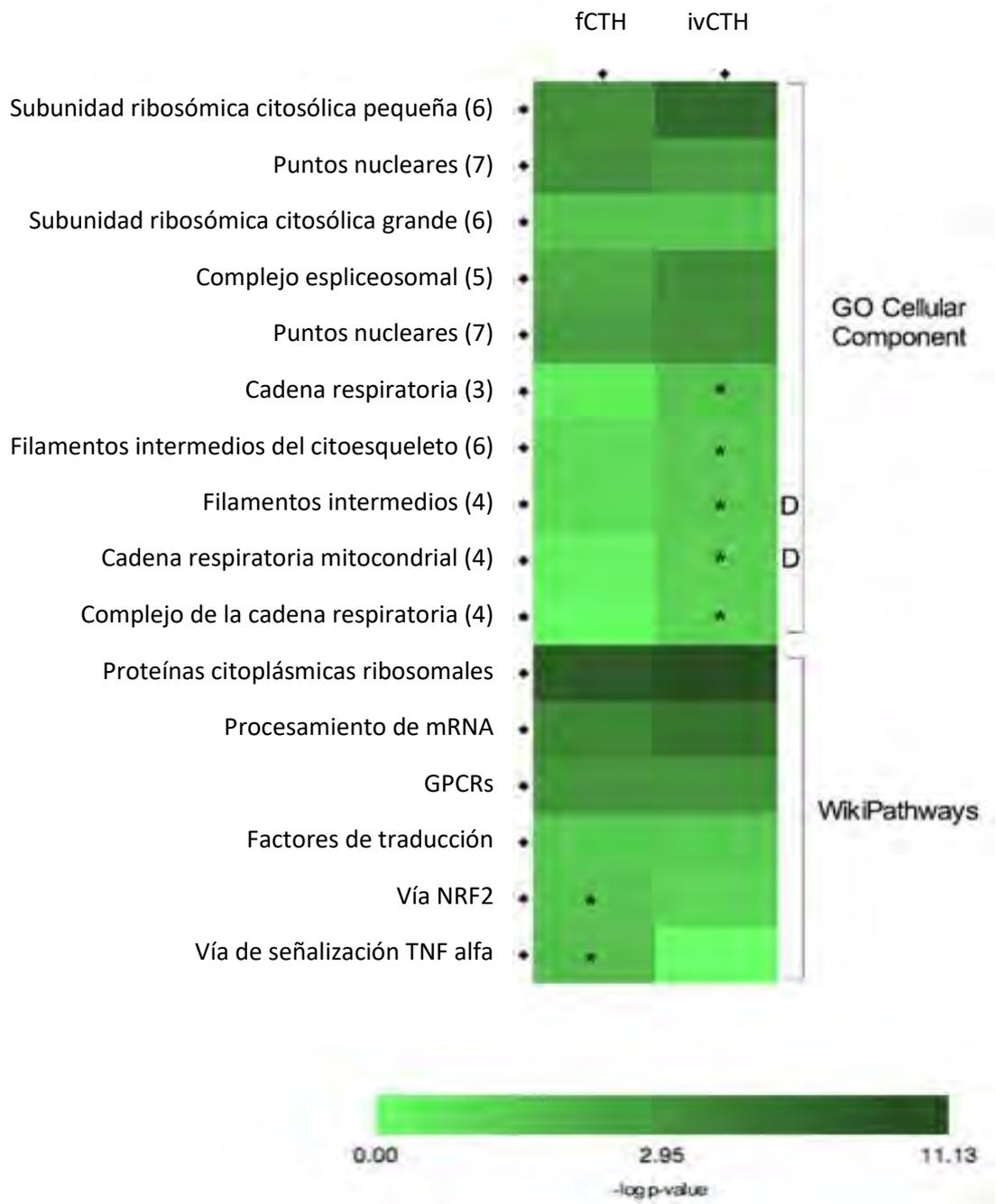


Figura 27. Heatmap de vías y componentes celulares diferencialmente encendidos o apagados, de manera independiente, en las poblaciones fCTH e ivCTH. Los números en los paréntesis indican el número de componentes que integran cada proceso. Los asteriscos indican que existe una diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$. D: apagado.

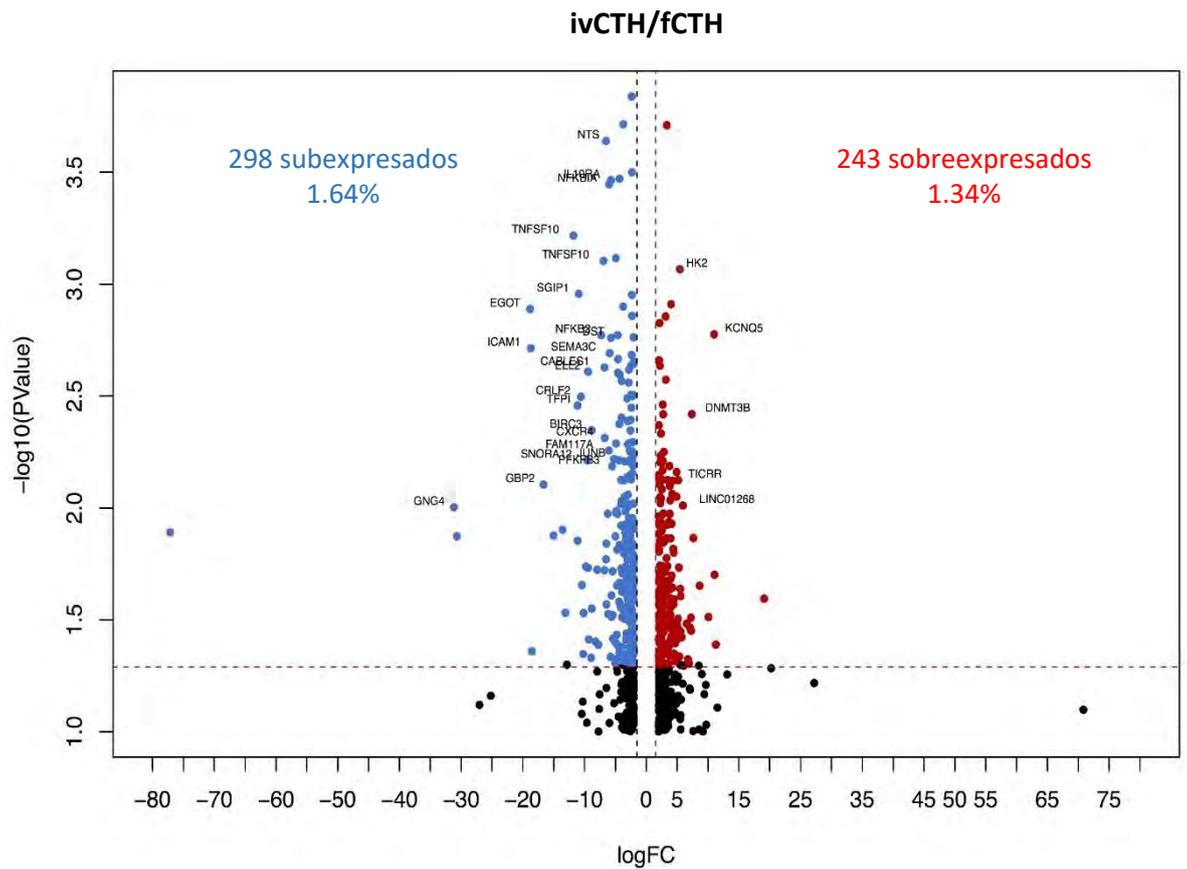


Figura 28. Genes expresados diferencialmente entre las poblaciones ivCTH/fCTH. El grafico de volcán muestra 541 genes diferencialmente expresados: 243 genes a la alza (rojo) y 298 a la baja (azul). El análisis fue realizado usando TAC affymetrix software, considerando una tasa de cambio de 2.0 y con una $p < 0.05$.



Figura 29. Los procesos biológicos y vías con mayor representatividad que fueron modificados en la población ivCTH comparado con las fCTH. El análisis fue realizado utilizando el programa GeneTrail2, y se clasificaron en procesos biológicos y vías KEGG. Los números en paréntesis indican la cantidad de componentes en cada proceso biológico.

Símbolo del Gene	Nombre del gene	Tasa de cambio	Anova p-Value
CDC6	cell division cycle 6	19.1	0.025408
BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1	11.29	0.040724
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha	11.07	0.019907
KCNQ5	potassium channel, voltage gated KQT-like subfamily Q, member 5	10.99	0.001675
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha	10.08	0.030708
MCM10	minichromosome maintenance 10 replication initiation factor	7.62	0.013615
DNMT3B	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta	7.39	0.00381
BRI3BP	BRI3 binding protein	7.29	0.035346
SNORD116-17	small nucleolar RNA, C/D box 116-17; small nucleolar RNA	7.25	0.030952
MTHFD1	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase	7.08	0.034173
ANGPT1	angiopoietin 1	6.92	0.049552
CXCL8	chemokine (C-X-C motif) ligand 8	-13.1	0.029414
SNORA11	small nucleolar RNA, H/ACA box 11	-13.56	0.012506
SMAD3	SMAD family member 3	-15.03	0.013301
GBP2	guanylate binding protein 2, interferon-inducible	-16.64	0.00786
SETBP1	SET binding protein 1	-18.54	0.043734
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	-18.72	0.001932
EGOT	eosinophil granule ontogeny transcript (non-protein coding)	-18.82	0.001293
IL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1	-30.71	0.013373
GNG4	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4	-31.16	0.009927
IL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1	-77.15	0.012842

Tabla 7. Genes diferencialmente expresados entre las poblaciones ivCTH/fCTH. Los genes más sobrepresados y los 10 más subexpresados de acuerdo al análisis realizado usando TAC Affimetrix software. Fold change >2 p < 0.05 se presentan en la tabla. El valor FDR no se consideró por que el número de muestras no fue suficiente para en análisis por este método.

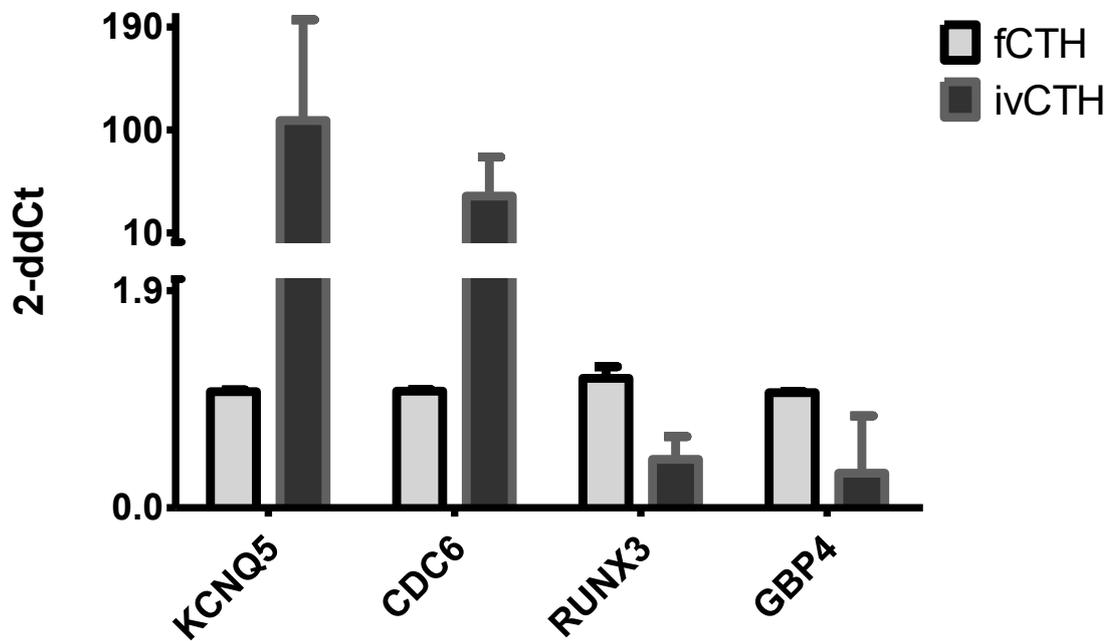


Figura 30. Validación de los microarreglos de expresión. Se seleccionaron los genes de acuerdo a su potencial función biológica. Las tasas de cambio correlacionan con lo predicho por el análisis genómico.

DDCt	RUNX3	GBP4	CDC6	KCNQ5
	Tasa de cambio			
Promedio	0.44	0.3	42.29	108.22
Desviación Estándar	0.2	0.45	34.02	88.15
ESPERADO CON BASE EN LOS DATOS DE LOS MICROARREGLOS	-2.83	-11.15	19.1	10.99

Tabla 8. Comparativo de las tasas de cambio de los genes utilizados para la validación de los microarreglos. La medición se realizó mediante el método DDCt.

Evaluación *in vitro* de la funcionalidad de las poblaciones de CPM.

Dando un enfoque similar al de las CTHs, se determinó el contenido de LTC-IC y CFC en la población de CPM (CD34+ CD38+ CD45RA+ CD71- Lin-), obtenidas tanto de SCU (fCPM) como de los cultivos iniciados con las fCTH (ivCPM). En estas poblaciones, las LTC-IC no se detectaron en ninguna de las dos poblaciones celulares analizadas. Esto está dentro de lo esperado, con base en la jerarquía hematopoyética, puesto que las LTC-IC corresponden a un estadio celular más indiferenciado que los progenitores en análisis. En cuanto a las CFC, encontramos que las frecuencias en células capaces de formar colonias fueron muy similares en ambas poblaciones, 21.4% para fCPM y 20.6 % para ivCPM. Es importante mencionar que dentro de esos porcentajes, el 93% en las fCPM y 99% en las ivCPM fueron CFC de linaje mieloide y únicamente el 7% para las fCPM y el 1% para las ivCPM fueron colonias de linaje eritroide. Se buscó la presencia de CFC con linaje mixto, pero estas no fueron encontradas. Este dato concuerda con lo observado en los LTC-IC y con el hecho de que los CPM corresponden a una fracción celular enriquecida en progenitores mieloides con potencial restringido a este linaje (Figura 31).

Ambas poblaciones, tanto frescas como las generadas *in vitro*, fueron puestas en cultivo, bajo la condición mieloide para ser analizado su potencial de proliferación. Las fCPM mostraron un incremento de 126 veces al día 10, mientras que las ivCPM su incremento fue de 100 veces al día 20, ambas poblaciones en sus puntos de máxima proliferación. Es interesante el hecho de que el potencial de proliferación de las fCPM comenzó a disminuir después del día 10, llegando a un incremento de 55 veces para el día 20, mientras que las células generadas *in vitro* mostraron una tendencia de proliferación ascendente hasta el día 20, donde se observó su mayor incremento. En ambos casos, no existieron diferencias estadísticamente significativas (Figura 32).

De manera contrastante, cuando se analizó el contenido de CFC, es decir, la capacidad de expansión, las fCPM mostraron su mayor potencial al día cinco, con un incremento de 16 veces; a partir de este punto, el contenido de CFC fue disminuyendo hasta llegar a un incremento de cinco veces al día 20. Por su parte, las ivCPM alcanzaron mayor expansión al día 10 con un incremento de 10.4 veces, a partir de este día el número de CFC disminuyó drásticamente a cero para los días 15 y 20 (Figura 33). Cuando se realizó el análisis del contenido de CFC que se generaron en ambas poblaciones a lo largo del cultivo, solo se detectaron CFC de linaje mieloide, aun cuando al día cero se habían detectado CFC eritroides en baja proporción, que a partir del día cinco, no fueron detectadas (Figura 34).

Con el objetivo de analizar los tipos celulares que se estaban generando en el cultivo, se analizó la cinética de diferenciación de ambas poblaciones. Se observó que el 100% de células presentaron morfología linfocitoide al día cero, sin embargo, a partir del día cinco sólo se observaron células de linaje mieloide, la población fCPM generó un 24% de células precursoras mieloides tempranas al día cinco, 20.5% al día 10, 10% al día 15 y para el día 20 este tipo de células no fueron observadas. Por otro lado, en la población ivCPM se determinó que al día cinco, el 77% de las células generadas en el cultivo correspondieron a precursores mieloides tempranos, mientras que se observó un 42% de este tipo celular al día 10, y un 21% al día 15. Para el día 20, al igual que en la población fCPM no se observaron células precursoras mieloides tempranas.

Estos datos en conjunto sugieren que las ivCPM, presentan una menor capacidad de proliferación y expansión respecto a las fCPM, y además responden menos a las señales de diferenciación dadas por la condición de cultivo (Figura 35).

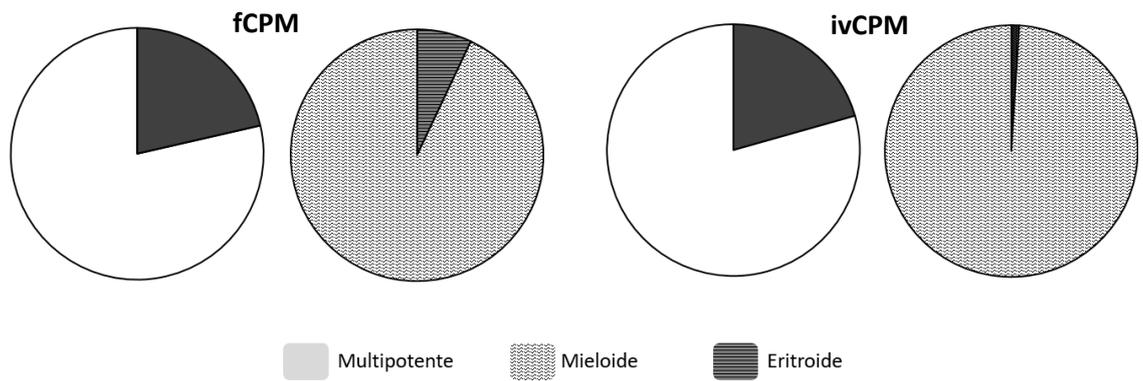


Figura 31. Evaluación del contenido de Células Formadoras de Colonias (CFC) en las CPM. Se evaluó el contenido de CFC al día cero, se observó un 21% de CFC al día cero, de las cuales para las fCPM el 93% fueron CFC mieloides y para ivCFC el porcentaje fue de 99%. Se presentan los promedios de nueve experimentos independientes. * $p < 0.05$.

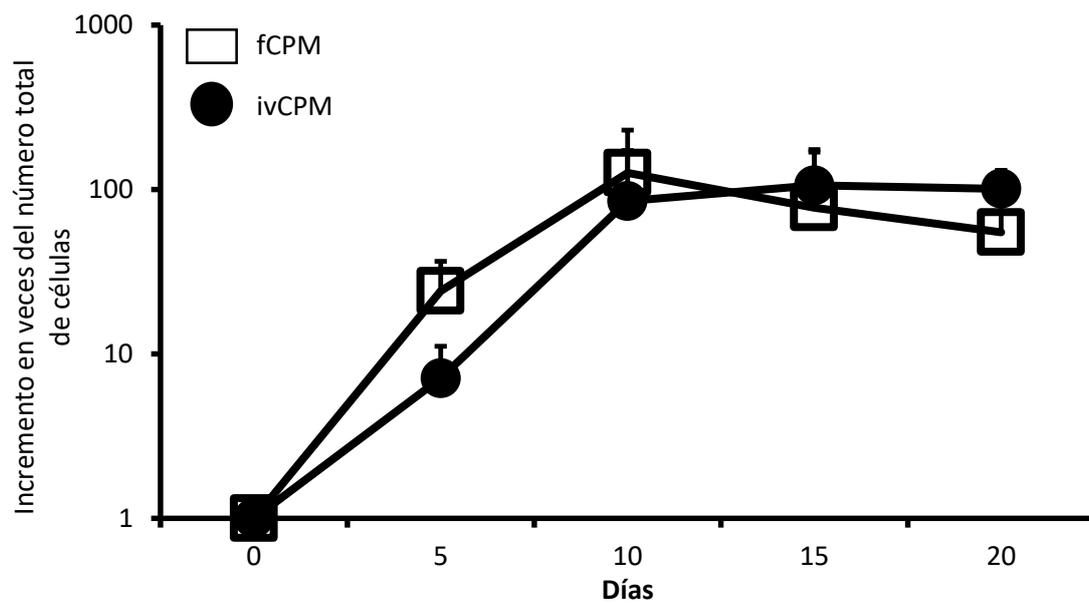


Figura 32. Cinética de proliferación de las fCPM e ivCPM a lo largo del cultivo utilizando la condición mieloide. Ambas poblaciones presentaron tendencias potenciales de proliferación similares. Los valores representan los promedios y las desviaciones estándar de tres experimentos independientes con respecto al día cero.

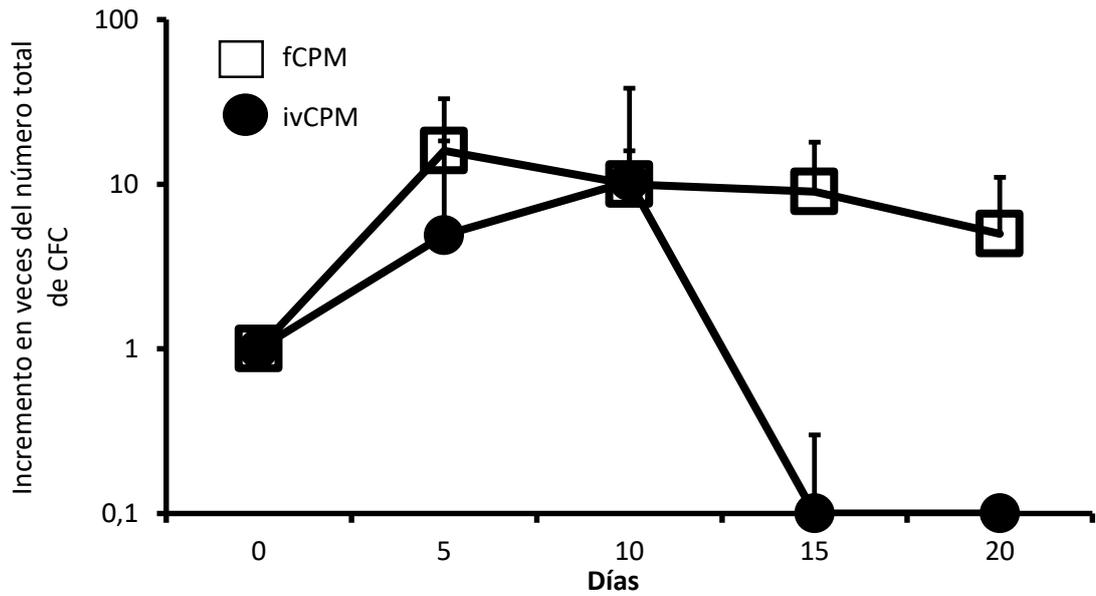


Figura 33. Cinética de expansión de CFC de las fCPM e ivCPM a lo largo del cultivo utilizando la condición mieloide. La población fCPM presentó una tendencia mayor en la capacidad de generar CFC en el cultivo, y además, esta capacidad fue disminuyendo de forma paulatina, en contraste con lo observado para la población ivCPM que expande CFC en menor cantidad y que para el día 15, esta capacidad se pierde. Los valores representan los promedios y las desviaciones estándar de tres experimentos independientes con respecto al día cero.

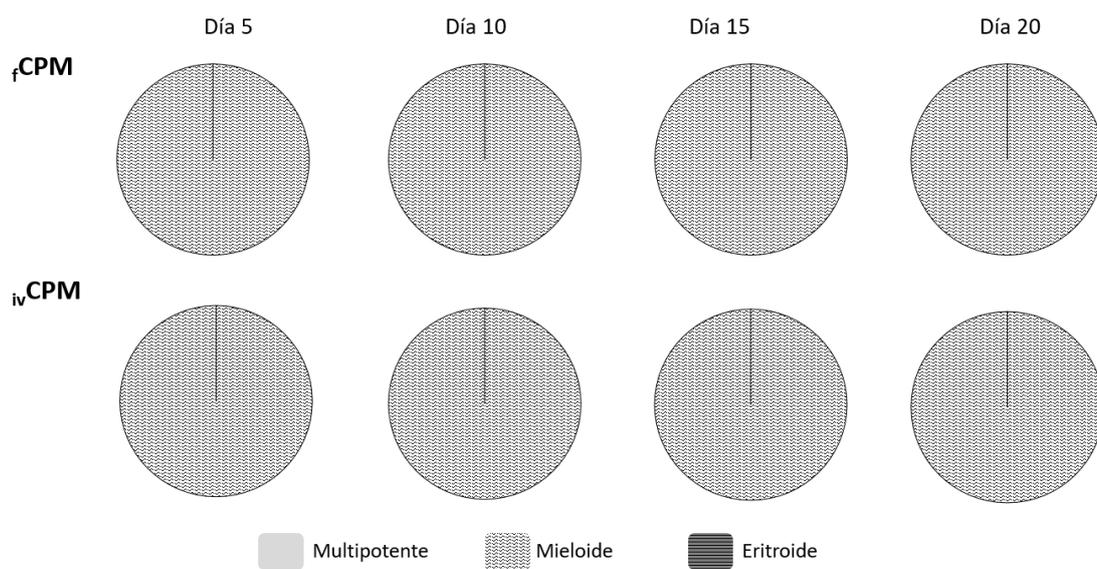


Figura 34. Frecuencia de las CFC generadas a lo largo del cultivo, presentados en porcentajes. A partir del día cinco se observó el 100% de CFC de linaje mieloide. Se presentan los promedios de 9 experimentos independientes.

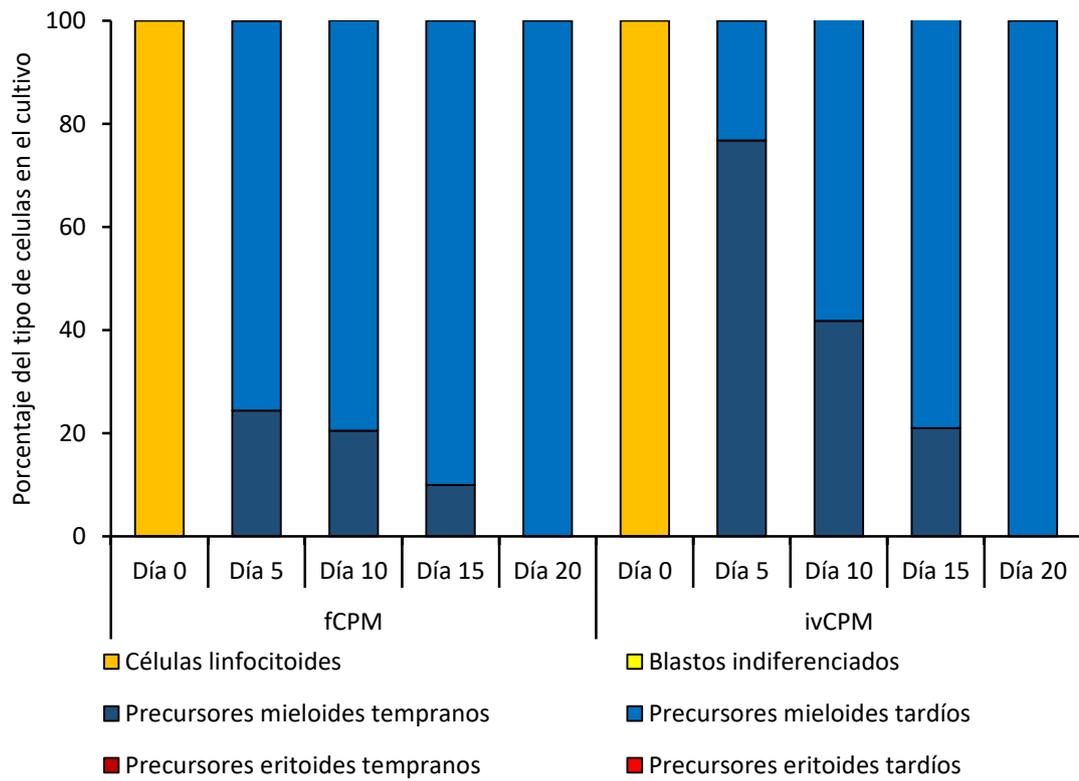


Figura 35. Evaluación *in vitro* de la cinética de diferenciación de la población CPM evaluada por morfología en condición mieloide. Los datos corresponden al porcentaje del contenido celular linaje específico dentro cada cultivo. n=3.

Análisis de los perfiles globales de expresión génica de las CPMs.

Para evaluar los elementos intrínsecos de las poblaciones, analizamos los patrones globales de expresión génica. Se analizaron cuatro muestras de la población fCPM y tres muestras de la población ivCPM, en ambos casos, se observaron patrones de expresión similares entre las muestras de cada grupo poblacional, lo que indica homogeneidad entre ellas (Figura 36).

El primer acercamiento fue realizar un análisis de los genes que se encontraran sobreexpresados o subregulados comparados con los genes constitutivos dentro de cada población, de esta forma, se esperaba contestar si a nivel génico las poblaciones presentaban diferencias importantes que reflejaran las diferencias funcionales observadas. Se determinó un corte de 453 genes cuya expresión se encontró mayormente modificada, tanto a la alza como a la baja. De los genes sub expresados, se determinó que 241 genes estaban modificados de forma compartida en ambas poblaciones, pero que existían 212 genes que solo estaban modificados en una o en otra población. De los genes a la alza, 317 genes fueron compartidos entre ambas poblaciones y 136 se expresaron de forma individual en las diferentes poblaciones (Figura 37 y tabla 9). Con estos datos, se realizó un análisis para identificar los componentes celulares, así como las vías de KEGG y los procesos biológicos que tuvieran modificaciones, y se determinó que existía un rearrreglo de la cromatina, un cambio del metabolismo hacia la cadena respiratoria mitocondria y la activación de la fosforilación oxidativa en las ivCPM (Figura 38).

Cuando se realizó el análisis comparativo entre las ivCPM y las fCPM, para evidenciar las diferencias génicas que sufren las células que son generadas en el cultivo, se encontraron 1,086 genes diferencialmente expresados (Figura 39). De esos, 859 estaban a la alza en las ivCPM, incluyendo VCAN, MRC1, FGL2, ADAMDEC1 y RNASE6, y 227 genes se encontraron a la baja, incluyendo SKIL, CCR7, MED12L, SETBP1 y CD38 (Tabla 10). Un análisis por KEGG de las vías y el GO de procesos biológicos apuntaron que el lisosoma, el fagosoma, las vías de señalización JAK-STAT, PI3K-Akt y la señalización a través de los

receptores tipo Toll se encontraron activadas; además, la migración leucocitaria, la respuesta a estímulos quimiotáxicos, la producción de TNF, y la maduración del fagosoma fueron los procesos mayormente activados en las ivCPM (Figura 40). No se encontraron procesos a la baja en niveles con significancia estadística.

Para validar los datos generados por los microarreglos, se cuantificaron por qPCR los genes VCAN, CCNB1, KCNE3 y RUNX3, utilizando GAPDH como gen constitutivo. Las tasas de cambio observadas por esta metodología, correspondieron con las tasas de cambio esperadas con base en los arreglos (Figura 41 y Tabla 11)

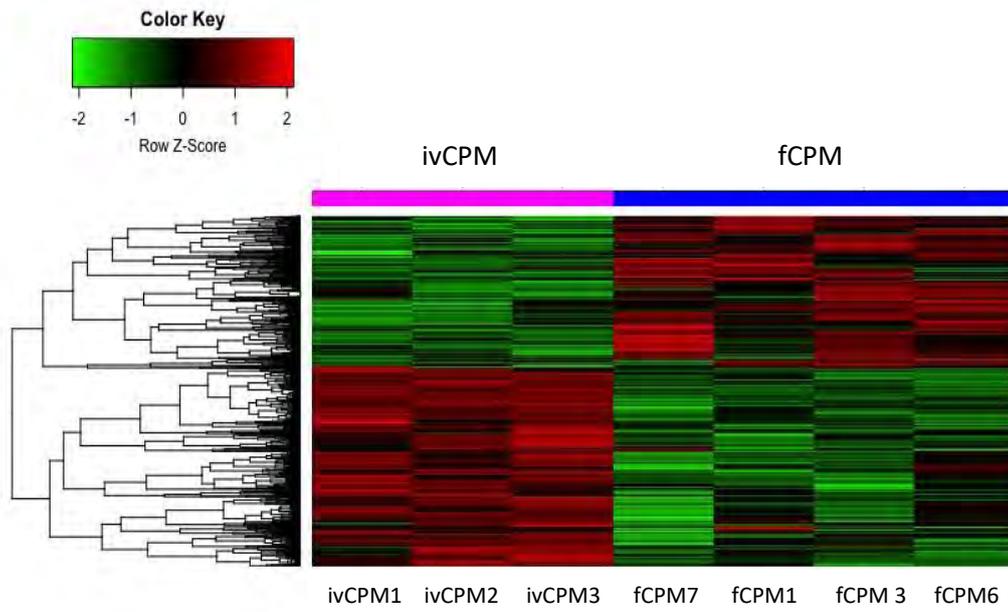


Figura 36. Heatmap de los patrones de expresión génica de las poblaciones de CPM. Las muestras están en columnas y los genes en fila. El análisis se realizó con el TAC Affymetrix software. Se muestran en rojo los genes a la alza y en verde los genes a la baja.

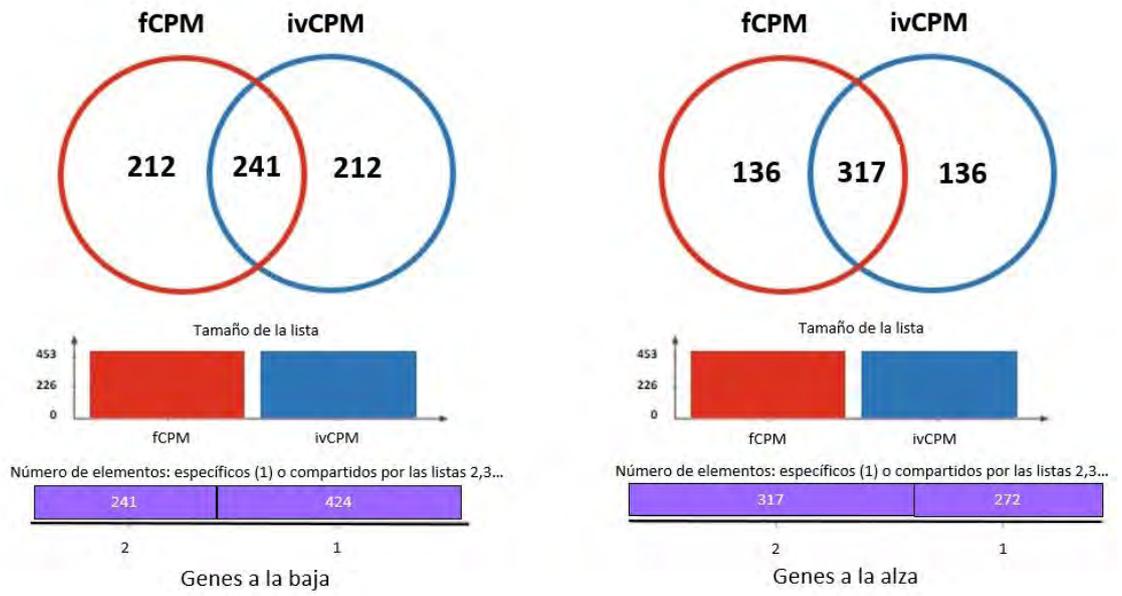


Figura 37. Diagramas de Venn mostrando el número de genes compartidos a la alza o a la baja entre las fCPM e ivCPM. El análisis se realizó con el TAC Affymetrix software.

Genes en ivCPM	Genes en fCPM	Genes en ambas poblaciones
LYZ	REL	FOSB
NKG7	SKIL	MPO
NAIP	HIF1A	RPL4
TXNIP	RGDP8	TMSB10
RAB31	TAB2	MTPN
LY86	CCR7	FTL
CTSC	KMT2A	TUBA1B
SCD	RGS1	RPL21
YBX3	TNFAIP3	RPS19
NSA2	PPIF	ITM2B
SDCBP	PCMTD2	ZZEF1
LDHB	BTG2	HLA-DRA
PPA1	EWSR1	COX8A
SLC2A3	GPBP1	SUMO2
VCAN	SELL	TXN

Tabla 9. Genes expresados de forma diferencial en las poblaciones ivCPM y fCPM. Se muestran los 15 genes con mayor tasa de cambio en las poblaciones de CPM.

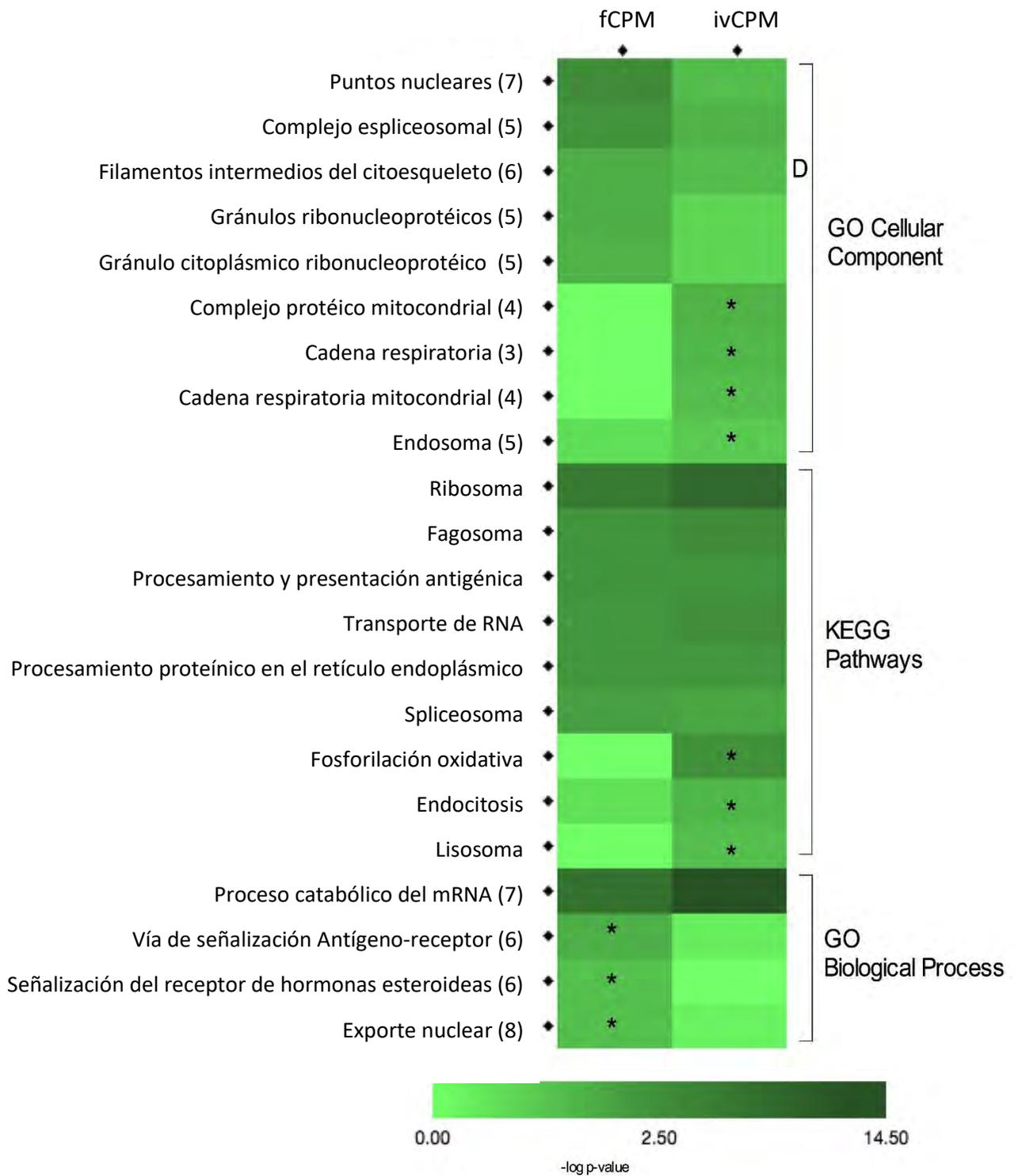


Figura 38. Heatmap de vías y componentes celulares diferencialmente encendidos o apagados, de manera independiente, en las poblaciones fCPM e ivCPM. Los números en los paréntesis indican el número de componentes que integran cada proceso. Los asteriscos indican que existe una diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$. D: apagado.

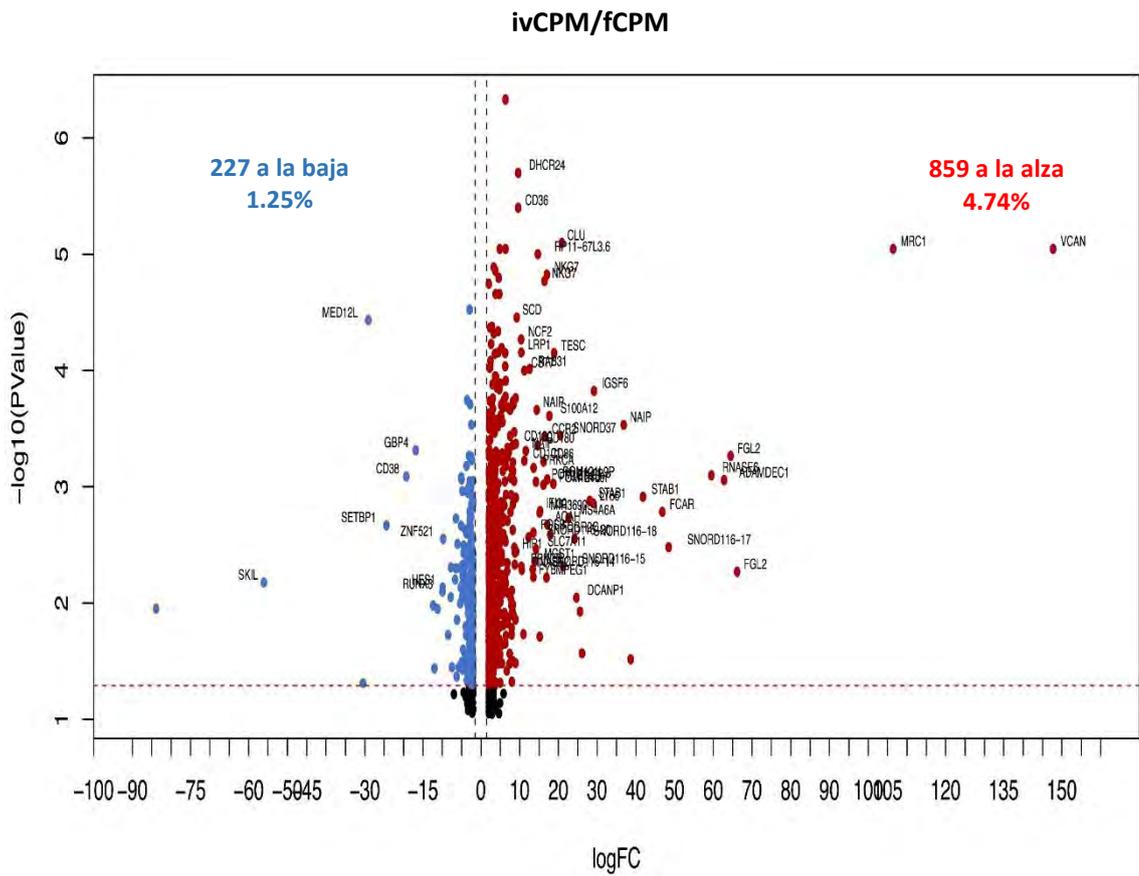


Figura 39. Genes expresados diferencialmente entre las poblaciones ivCPM/fCPM. El grafico de volcán muestra 1,086 genes diferencialmente expresados: 859 genes a la alza (rojo) y 227 a la baja (azul). El análisis fue realizado usando TAC affymetrix software, considerando una tasa de cambio de 2.0 y con una $p < 0.05$.

Símbolo del gen	Nombre del gen	Tasa de cambio	Anova p-Value
VCAN	Versican	147.73	0.000009
MRC1	mannose receptor, C type 1	106.43	0.000009
FGL2	fibrinogen-like 2	66.16	0.005389
ADAMDEC1	ADAM-like, decysin 1	62.79	0.000878
RNASE6	ribonuclease, RNase A family, k6	59.48	0.000795
SNORD116-17	small nucleolar RNA, C/D box 116-17	48.45	0.003307
FCAR	Fc fragment of IgA receptor	46.81	0.001646
STAB1	stabilin 1	41.83	0.001219
F13A1	coagulation factor XIII, A1 polypeptide	38.66	0.030505
NAIP	NLR family, apoptosis inhibitory protein	36.88	0.000294
HES1	hes family bHLH transcription factor 1	-9.92	0.007381
RUNX3	runt-related transcription factor 3	-9.94	0.007966
RASGEF1B	RasGEF domain family member 1B	-11.22	0.01123
RGS1	regulator of G-protein signaling 1	-11.99	0.036527
SCN3A	sodium channel, voltage gated, type III alpha subunit	-12.39	0.010483
GBP4	guanylate binding protein 4	-16.85	0.000485
CD38	CD38 molecule	-19.29	0.000815
SETBP1	SET binding protein 1	-24.4	0.002136
MED12L	mediator complex subunit 12 like	-29.11	0.000037
CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7	-30.47	0.048876
SKIL	SKI-like proto-oncogene	-83.88	0.011162

Tabla 10. Genes diferencialmente expresados entre las poblaciones ivCPM/fCPM. La tabla contiene los diez genes con mayor tasa de cambio positiva y los diez genes con mayor tasa de cambio negativa, de acuerdo con el TAC console. Fold change >2.0; p <0.05. El FRD no fue considerado para este análisis dado el número de muestras.

ivCPM/fCPM

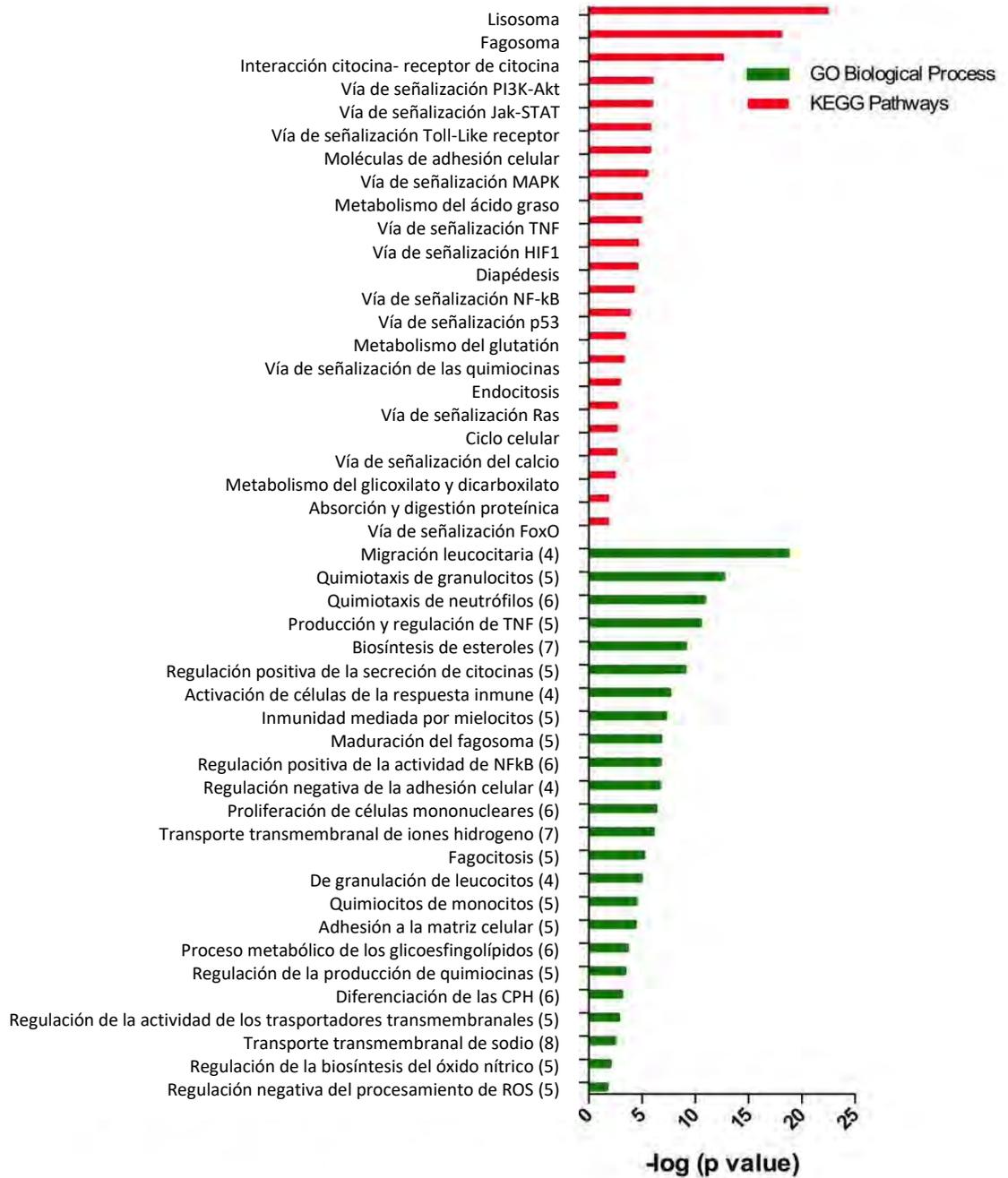


Figura 40. Los procesos biológicos y vías con mayor representatividad que fueron modificados en la población ivCPM comparado con las fCPM. El análisis fue realizado utilizando el programa GeneTrail2, y se clasificaron en procesos biológicos y vías KEGG. Los números en paréntesis indican la cantidad de componentes en cada proceso biológico.

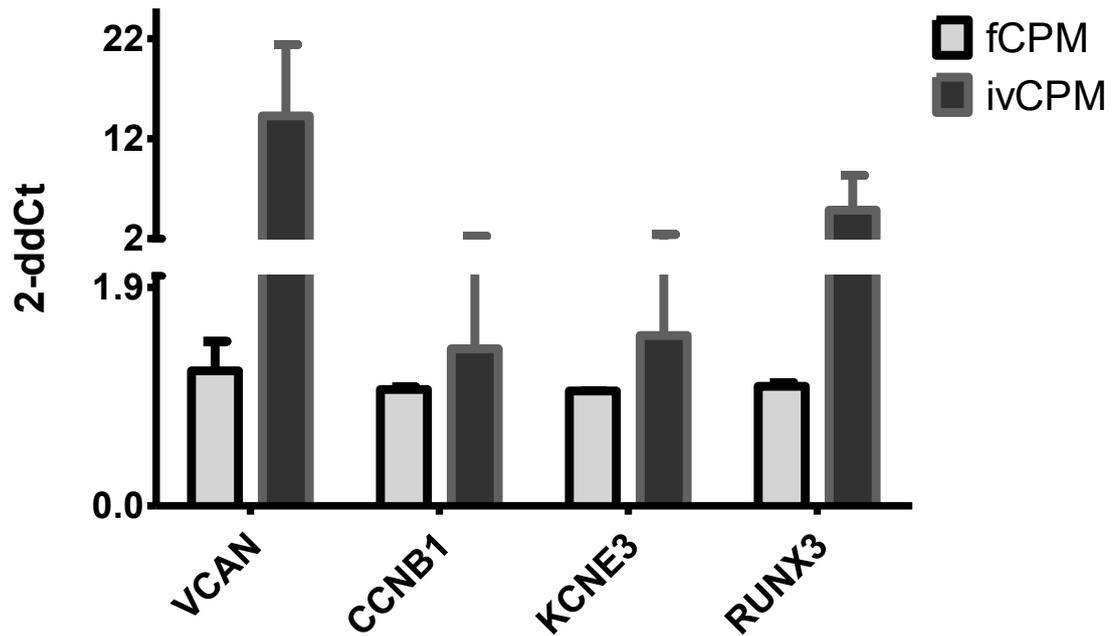


Figura 41. Validación de los microarreglos de expresión. Se seleccionaron los genes de acuerdo a su potencial función biológica. Las tasas de cambio correlacionan con lo predicho por el análisis genómico.

DDCt	VCAN	CCNB1	KCNE3	RUNX3
	Tasa de cambio			
Promedio	14.3	1.4	1.5	5.0
Desviación estándar	7.1	0.9	0.9	3.4
VALOR ESPERADO CON BASE EN LOS DATOS DE LOS MICROARREGLOS	147.73	5.39	4.09	-3.15

Tabla 11. Comparativo de las tasas de cambio de los genes utilizados para la validación de los microarreglos.

Evaluación *in vitro* de la funcionalidad de las CPE.

Se realizó el análisis funcional de las células CD34+ CD38+ CD45RA- CD71+ Lin-, que corresponden a la población de células progenitoras eritroides (CPE). Se analizaron las CPE obtenidas directamente de la SCU (fCPE) y las generadas *in vitro* a partir de fCTH (ivCPE).

Al igual que con las poblaciones de CPM, no se detectaron LTC-IC en las poblaciones de CPE. Esto concuerda con los datos descritos de la jerarquía hematopoyética, donde las CPE son células progenitoras restringidas a linaje, sin la habilidad de formar cultivos a largo plazo. Por otro lado, cuando se analizó la capacidad de formar colonias en cultivo semisólidos al día de su obtención, se determinó que las fCPE presentaron un 35% y las ivCPE presentaron un 24% de formación de colonias, en ambos casos la generación de CFC de linaje eritroide fue $\geq 95\%$. No se detectaron colonias de tipo mixto y las colonias mieloides detectadas ($\leq 5\%$) fueron pequeñas colonias de granulocitos y monocitos (Figura 42). Sin embargo, las CFC mieloides no fueron observadas a partir del día cinco de cultivo, y únicamente se generaron CFC de linaje eritroide en ambas poblaciones y en los diferentes días analizados (Figura 43).

Las CPE fueron analizadas en cuanto a su funcionalidad, cultivadas en la condición eritroide, pues al ser esta una combinación de citocinas que favorecen a este linaje, permiten a los progenitores analizados aquí, expresar sus máximos potenciales funcionales. Ambas poblaciones mostraron una alta tasa de proliferación. Al día 20, en la población fCPE mostró un incremento de 1800 veces, por su parte la población ivCPE mostró un incremento de 900 veces. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre ambas poblaciones, observándose así, una cinética similar entre ambas poblaciones (Figura 44). Es de notar que ambas poblaciones alcanzaron tasas de proliferación mayores a las observados para las poblaciones de CTH y para las de CPM.

En contraste, al analizar las cinéticas de expansión de CFC, se encontraron diferencias importantes; en su punto máximo, el día cinco, las fCPE alcanzaron un incremento de 20 veces, mientras que las ivCPE alcanzaron un incremento de apenas 1.3 veces, que bajo a 0.3 veces al día 10 y disminuyó a 0.1 veces en los días 15 y 20 (Figura 45). Este dato es interesante puesto que aunque se obtuvieron los números celulares totales similares, el contenido de células progenitoras disminuyó drásticamente en la población generada *in vitro*. Por esta razón fue importante determinar la cinética de diferenciación, evaluada por morfología, para determinar el tipo de células que estaban generándose en el cultivo. Al inicio del cultivo, en la población fCPE, el 100% de las células tenían morfología linfocitoide, que es característica de las células progenitoras. Para el día cinco se obtuvo un 100% de células eritroides tempranas (blastos eritroides y proeritroblastos) y para el día 10 se obtuvo un 5% de células eritroides tardías (eritroblastos basófilos, policromatófilos y ortocromáticos), porcentaje que aumento a 8% al día 15 y luego a 87% al día 20. Por otro lado, las ivCPE también mostraron un 100% de células linfocitoides al día cero. Para el día cinco, el 98% de las células fueron células eritroides tempranas y el 2% de células eritroides tardías. Para el día 10, las células eritroides tempranas disminuyeron a 88% en esta población, a 29% al día 15 y a 7% al día 20 (Figura 46). Estos datos demuestran que las células que se generaron en el cultivo, si bien son de linaje eritroide, son células con mayor diferenciación.

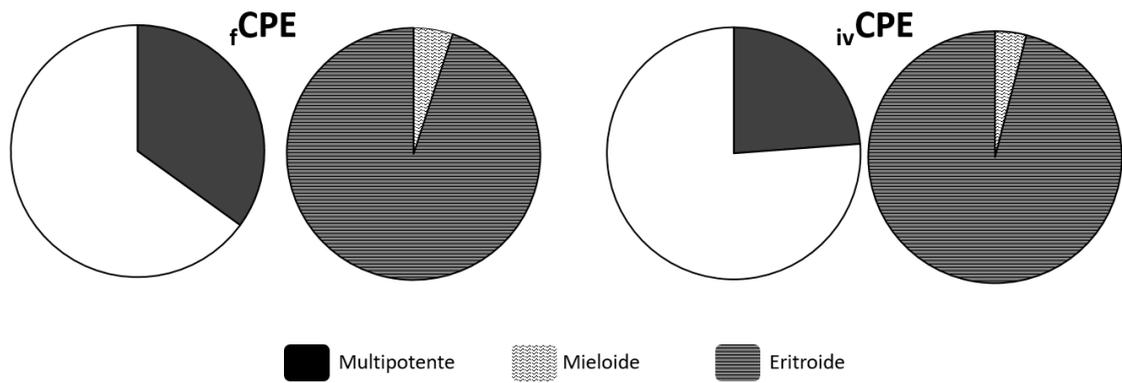


Figura 42. Evaluación del contenido de Células Formadoras de Colonias (CFC) en las CPE. Se evaluó el contenido de CFC al día cero; más del 95% de las CFC son de linaje eritroide. Se presentan los promedios de nueve experimentos independientes. * $p < 0.05$

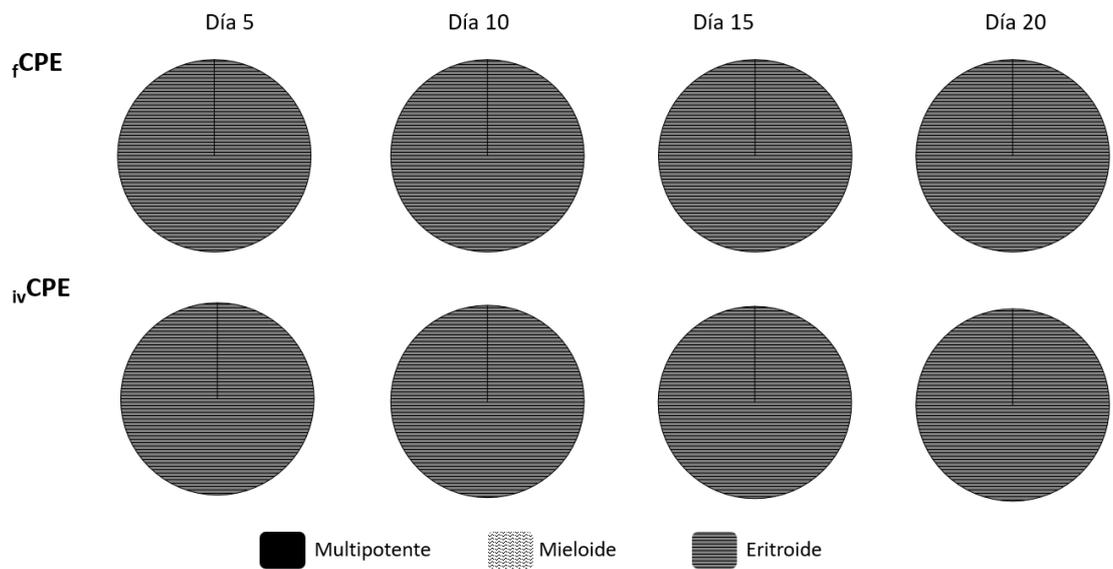


Figura 43. Frecuencia de las CFC generadas a lo largo del cultivo, presentados en porcentajes. Se presentan los promedios de 9 experimentos independientes.

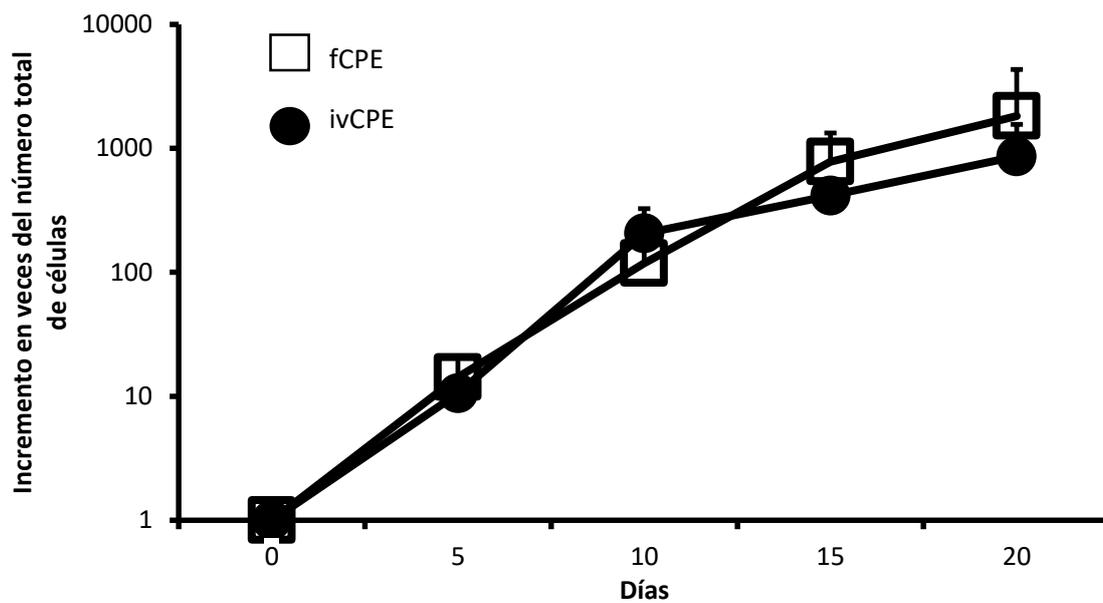


Figura 44. Cinética de proliferación de las fCPE e ivCPE a lo largo del cultivo utilizando la condición eritroide. Los valores representan los promedios y las desviaciones estándar de tres experimentos independientes con respecto al día cero.

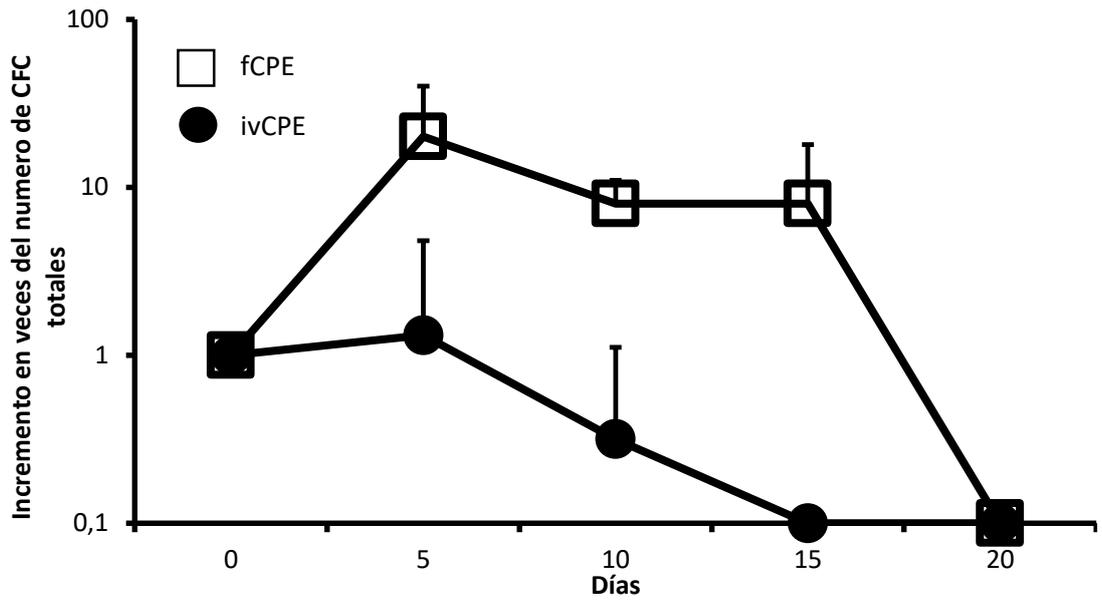


Figura 45. Cinética de expansión de CFC de las fCPE e ivCPE a lo largo del cultivo utilizando la condición eritroide. Los valores representan los promedios y las desviaciones estándar de tres experimentos independientes con respecto al día cero.

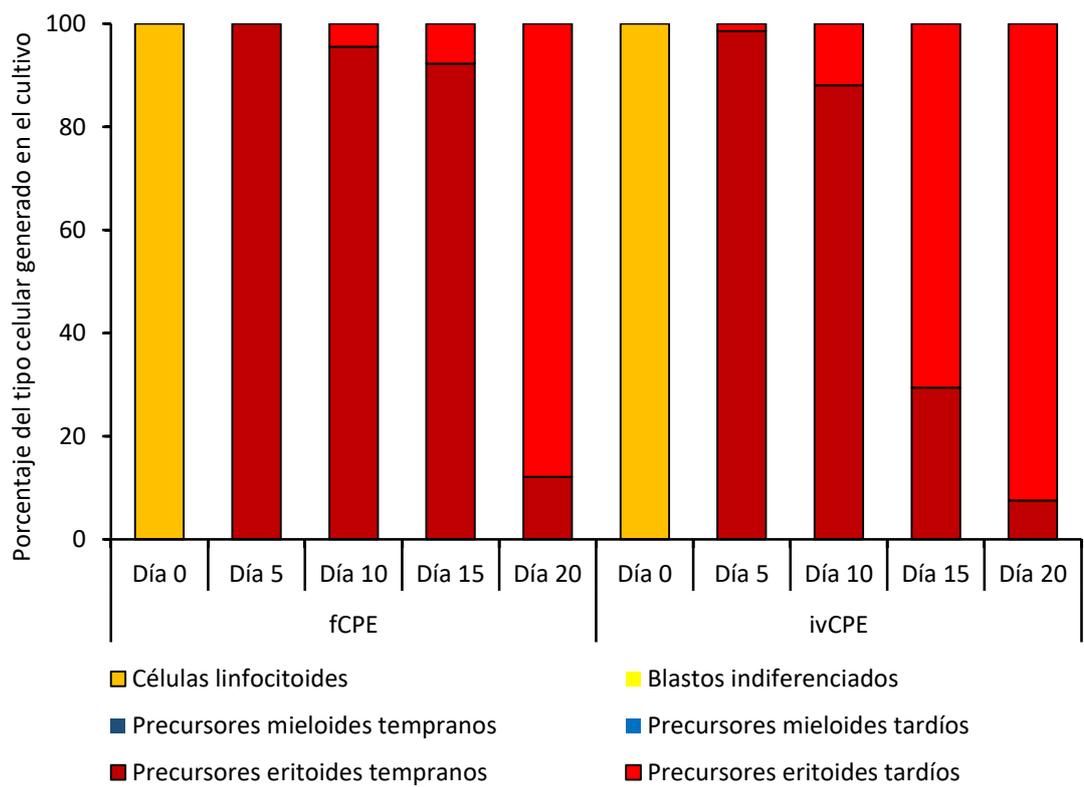


Figura 46. Evaluación *in vitro* de la cinética de diferenciación de la población CPE evaluada por morfología en condición eritroide. Los datos corresponden al porcentaje del contenido celular linaje específico dentro cada cultivo. Se presentan los promedios de 3 experimentos independientes.

Análisis de los perfiles globales de expresión génica de la población CPE.

Siguiendo el enfoque realizado con las CTH y CPM, se realizaron los perfiles globales de expresión génica utilizando microarreglos de expresión. Se analizaron cuatro muestras de fCPE y tres muestras de ivCPE, observando homogeneidad en los patrones de expresión entre las poblaciones frescas o las generadas *in vitro* (Figura 47).

En seguida analizamos las diferencias génicas a nivel poblaciones utilizando los genes constitutivos de cada población como control. A la alza, se utilizó un corte de los 453 con mayor tasa de cambio; de estos, 361 estaban compartidos entre las fCPE e ivCPE, mientras que solo 92 genes se expresaron de forma específica en cada población. Por otro lado, de los 453 genes a la baja, 257 estaban compartidos y solamente 196 genes se expresaron de forma específica en las poblaciones (Figura 48 y tabla 12). Dentro de los procesos modificados, se encontraron la fosforilación oxidativa, la formación de fagosomas y la disminución de la autofagia (Figura 49). Todos estos datos, validan que la población de progenitores eritroides generada *in vitro*, presenta elementos intrínsecos diferentes a los que las fCPE poseen.

Los perfiles globales de expresión génica de las ivCPE contra los perfiles obtenidos para las fCPE fueron comparados. Se determinó que existen 438 genes diferencialmente expresados, 196 genes a la alza y 242 a la baja (Figura 50). Dentro de los genes a la alza se encontraron SIGLEC6, EPX, PPBP, RAP27B y HBBP1, por ejemplo; mientras que dentro los 242 a la baja algunos genes fueron GBP4, SKIL, THBS1, CRHBP y CSF1 (Tabla 13).

Los análisis utilizando el GeneTrail2, revelaron que vías de señalización como PI3K-Akt, NF- κ B, Jak-STAT, señalización por citocinas y la vía de señalización por TNF se encuentran encendidas en las poblaciones generadas *in vitro*. Por otra parte, procesos biológicos como la biosíntesis de esterol, la adhesión de las células a la matriz extracelular, la respuesta celular a los niveles de oxígeno, la maduración celular y varias rutas metabólicas se encontraron activos en las ivCPE. No se encontraron vías o procesos suprimidos a niveles con significancia estadística (Figura 51).

Finalmente, los datos obtenidos por los microarreglos fueron validados por qPCR utilizando los genes PIEZO2, SELP, CCNB1 y KCNE3, estos genes fueron seleccionados por su potencial importancia biológica; como control endógeno se utilizó GAPDH. Los datos obtenidos en esta técnica coinciden en términos generales, con los esperados según el microarreglo (Figura 52 y Tabla 14).

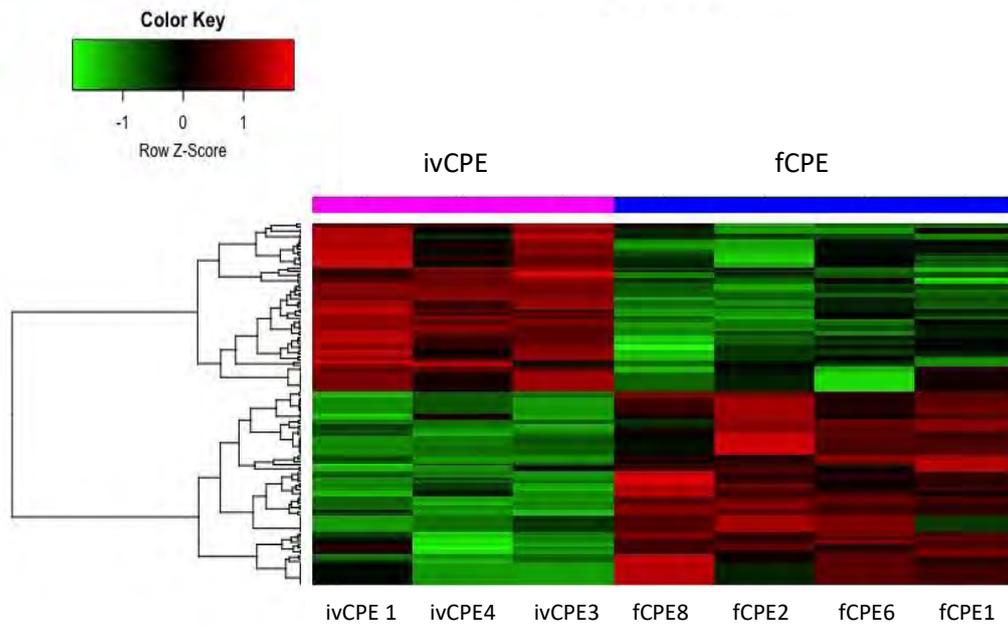


Figura 47. Heatmap de los patrones de expresión génica de las poblaciones de CPE. Las muestras están en columnas y los genes en fila. El análisis se realizó con el TAC Affymetrix software. Se muestran en rojo los genes a la alza y en verde los genes a la baja.

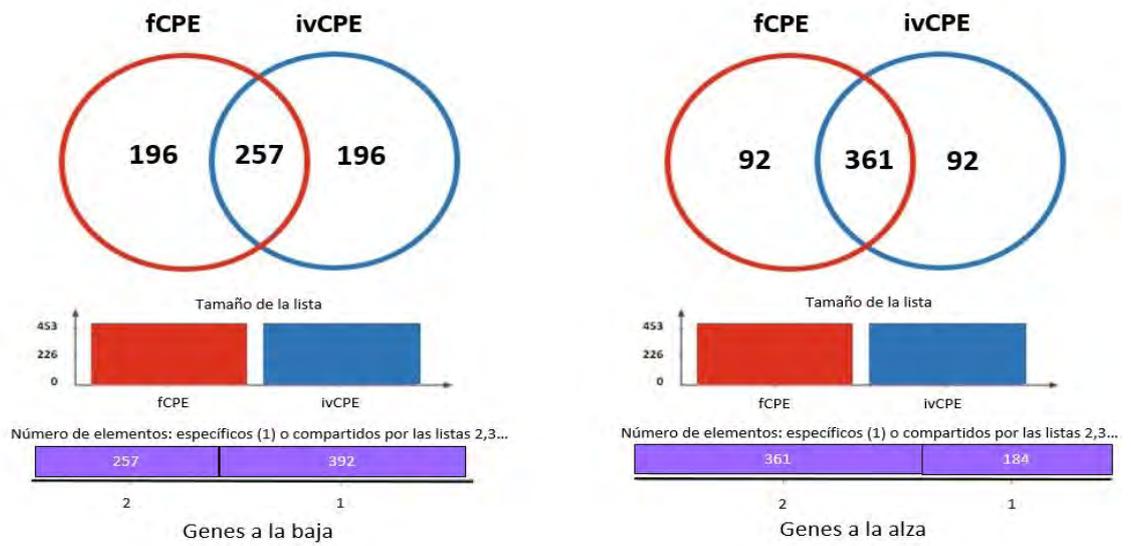


Figura 48. Diagramas de Venn mostrando el número de genes compartidos a la baja o a la alza entre las fcPE e ivCPE. El análisis se realizó con el TAC Affymetrix software.

Genes en ivCPE	Genes en fCPE	Genes en ambas poblaciones
SCD	THBS1	TUBA1B
SAMSN1	CLK1	RPS3A
TXNIP	NFKBIA	RPL27
ABCC4	CXCR4	MTPN
MPO	KIT	PABPC1
SOS1	HIF1A	FOSB
HDC	ANKRD36C	HIST1H3I
PPBP	CDK6	HSP90
ANXA1	EWSR1	CPA3
MSMO1	STAT3	TXN
NCF4	ANKRD36	COX8A
FDFT1	CD164	SUMO2
ANPEP	CD38	ZZEF1
PRG2	CREBBP	HIST2H2AC
MTHFD1	GBP4	HIST1H4C

Tabla 12. Genes expresados de forma diferencial en las poblaciones ivCPE y fCPE. Se muestran los 15 genes con mayor tasa de cambio en las poblaciones de CPE.

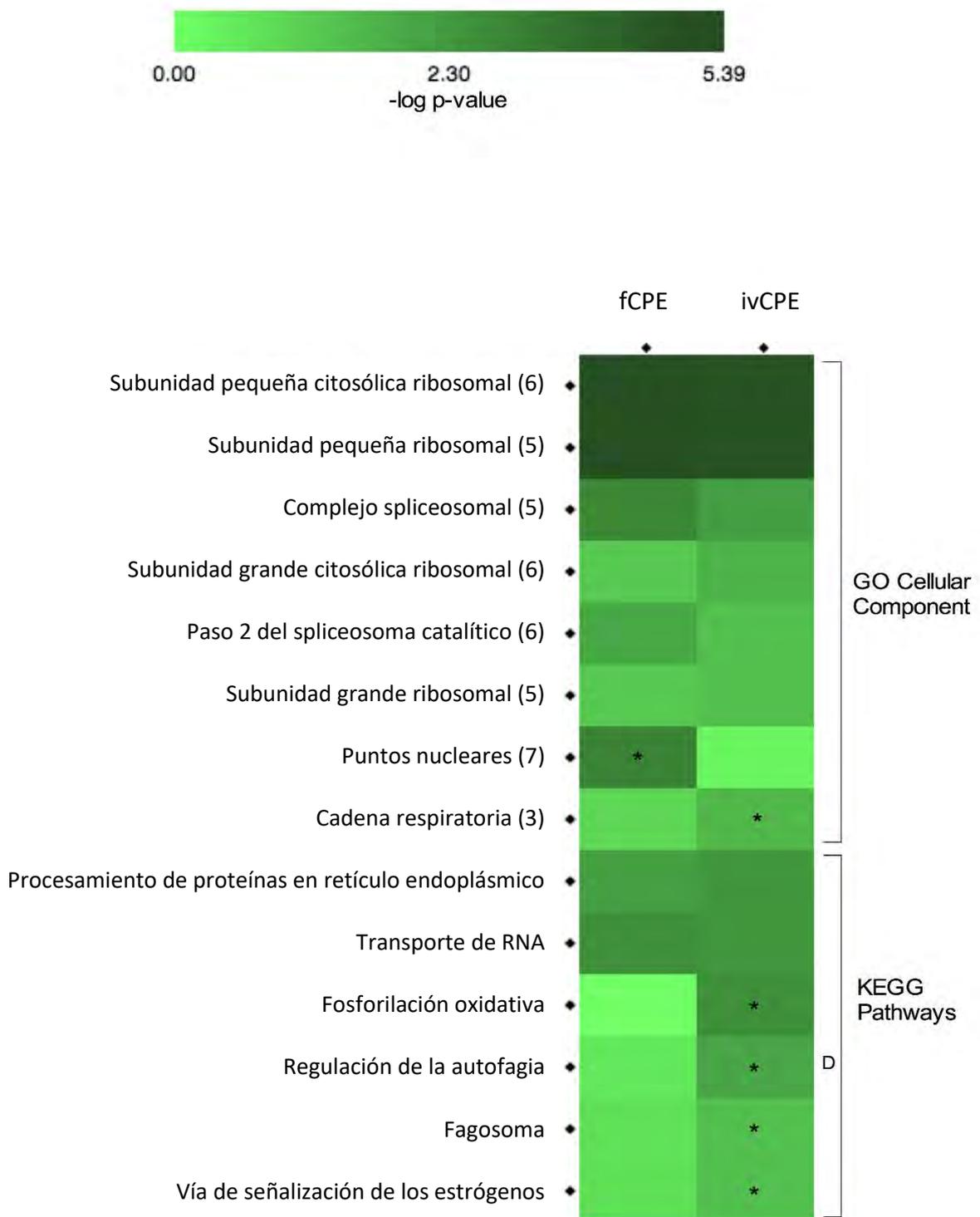


Figura 49. Heatmap de vías y componentes celulares diferencialmente encendidos o apagados, de manera independiente, en las poblaciones fCPE e ivCPE. Los números en los paréntesis indican el número de componentes que integran cada proceso. Los asteriscos indican que existe una diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$. D: apagado.

Símbolo del gen	Nombre del gen	Tasa de cambio	Anova p-Value
SIGLEC6	sialic acid binding Ig-like lectin 6	77.96	2.78E-07
EPX	eosinophil peroxidase	67.24	0.008089
PPBP	pro-platelet basic protein	38.58	0.005487
RAB27B	RAB27B, member RAS oncogene family	26.74	0.002641
HBBP1	hemoglobin, beta pseudogene 1	16.29	0.037195
SELP	selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)	14.96	0.029656
SIGLEC6	sialic acid binding Ig-like lectin 6	13.9	0.000001
MSMO1	methylsterol monooxygenase 1	12.01	0.000028
PTGER3	prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)	9.87	0.013631
FYB	FYN binding protein	9.43	0.000994
EPSTI1	epithelial stromal interaction 1 (breast)	-8.29	0.021568
TLR3	toll-like receptor 3	-8.34	0.020033
TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	-9.02	0.000701
OR2L1P	olfactory receptor, family 2, subfamily L, member 1 pseudogene	-9.27	0.014606
SPTBN1	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	-10.18	0.000048
CSF1	colony stimulating factor 1 (macrophage)	-11.8	0.000162
CRHBP	corticotropin releasing hormone binding protein	-13.83	0.004693
THBS1	thrombospondin 1	-14.75	0.032459
SKIL	SKI-like proto-oncogene	-51.91	0.024391
GBP4	guanylate binding protein 4	-63.38	0.000056

Tabla 13. Genes diferencialmente expresados entre las poblaciones ivCPE/fCPE. La tabla contiene los diez genes con mayor tasa de cambio positiva y los diez genes con mayor tasa de cambio negativa, de acuerdo con el TAC console. Fold change >2.0; p <0.05. El FRD no fue considerado para este análisis dado el número de muestras.

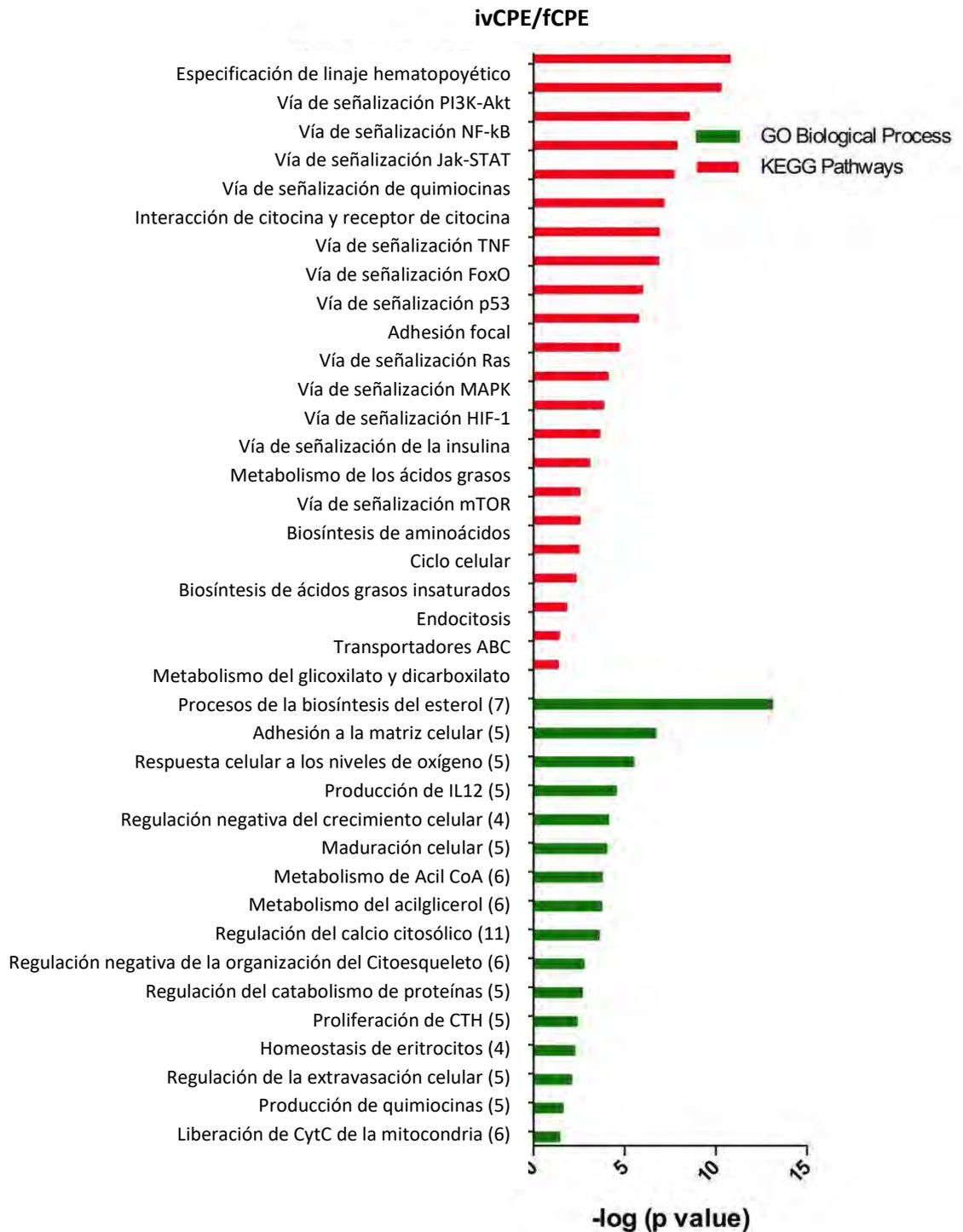


Figura 51. Los procesos biológicos y vías con mayor representatividad que fueron modificados en la población ivCPE comparado con las fCPE. El análisis fue realizado utilizando el programa GeneTrail2, y se clasificaron en procesos biológicos y vías KEGG. Los números en paréntesis indican la cantidad de componentes en cada proceso biológico.

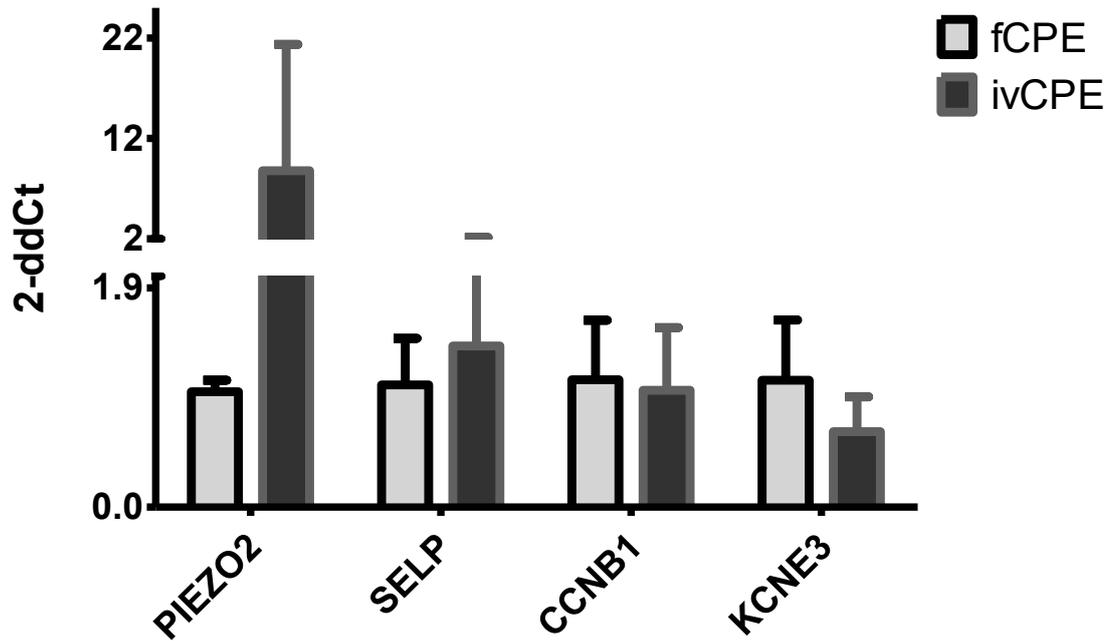


Figura 52. Validación de los microarreglos de expresión. Se seleccionaron los genes de acuerdo a su potencial función biológica. Las tasas de cambio correlacionan con lo predicho por el análisis genómico.

DDCt	CCNB1	PIEZO2	SELP	KCNE3
	Tasa de cambio			
Promedio	1.01	8.8	1.4	0.70
Desviación estándar	0.54	12.6	0.7	0.3
ESPERADO CON BASE EN LOS DATOS DE LOS MICROARREGLOS	11.51	5.14	14.96	3.4

Tabla 14. Comparativo de las tasas de cambio de los genes utilizados para la validación de los microarreglos

Discusión.

Existe particular interés en utilizar células derivadas de SCU, que son potencialmente útiles en desordenes hematológicos (Mayani & Lansdorp, 1998; Migliaccio et al., 2000). Por mucho tiempo, distintos grupos han buscado la manera de mejorar el trasplante hematopoyético utilizando SCU a través de distintas estrategias. Una de ellas ha sido tratando de incrementar el número de células de una unidad con el objetivo de acortar los tiempos de recuperación de los pacientes. Para esto han sido utilizados diferentes enfoques experimentales como el uso de quelantes de cobre, combinaciones de citocinas o con cultivos usando células estromales con diferentes poblaciones celulares hematopoyéticas iniciales (Pineault & Abu-Khader, 2015). Existen otros reportes en los que se modifican las condiciones del cultivo en el laboratorio, favoreciendo una condición hipóxica por ejemplo, resultando en una eficiente expansión de la población de células hematopoyéticas primitivas (Mantel et al., 2015). Sin embargo, no existe un análisis biológico exhaustivo con poblaciones celulares específicas, acerca del comportamiento biológico de las poblaciones generadas en el laboratorio (Miller et al., 2013). En este trabajo, investigamos el efecto sobre las CTPH cuando se realiza el proceso de expansión *in vitro*.

Tratando de contribuir al conocimiento acerca de la biología de las células generadas *in vitro*, se obtuvieron directamente de la SCU la población de CTH (CD34⁺ CD38⁻ CD45RA⁻ CD71⁻ Lin⁻), CPM (CD34⁺ CD38⁺ CD45RA⁺ CD71⁻ Lin⁻) y CPE (CD34⁺ CD38⁺ CD45RA⁻ CD71⁺ Lin⁻). Las poblaciones fueron cultivadas para evaluar sus potenciales de proliferación, expansión y diferenciación, así como determinar sus perfiles globales de expresión génica. Poblaciones inmunofenotípicamente similares fueron generadas *in vitro*, usando condiciones específicas de cultivo, y fueron analizadas de la misma manera, con el objetivo de poder hacer un análisis comparativo funcional y genómico de las poblaciones obtenidas directamente de la SCU y aquellas obtenidas *in vitro*.

Las condiciones de cultivo y la población celular con la que se inician los análisis han demostrado ser fundamentales en la biología de los análisis *in vitro* que se realizan (Lansdorp, Dragowska, & Mayani, 1993; Ledran et al., 2008;

Miller et al., 2013; Notta et al., 2016). Con base en previos reportes (Delaney et al., 2010; Fernandez-Sanchez et al., 2011), en este estudio se generaron CTH utilizando un sistema de expansión *in vitro* reportado previamente en otro trabajo del laboratorio en el 2011 (Fernandez-Sanchez et al., 2011), en el que utilizando un cocultivo de las CTH frescas con la línea celular OP-9, en un medio libre de suero y suplementado con una combinación de siete citocinas hematopoyéticas diferentes, la población inicial fue CD34+CD38-Lin-, se observó un incremento mayor a 20 veces en el número celular después del cultivo. En el presente estudio, la población inicial fue inmunofenotípicamente más astringente por la inclusión de un panel más amplio de marcadores (CD71 y CD45RA), y después del periodo de cultivo, no se observó un incremento significativo en el número celular (1.13 veces), sino un mantenimiento. Sin embargo, nosotros observamos un incremento en el número de unidades formadoras de colonias (CFC) mieloides y eritroides.

Buscando la mejor estrategia para obtener CPH *in vitro* a partir de fCTH, se utilizaron diferentes combinaciones de citocinas. Observamos que la condición con IL-6, SCF, FL, TPO e IL3 en un medio libre de suero y estroma, mostró ser la mejor opción, pues con esta combinación fuimos capaces de recuperar las CPH (eritroides y mieloides), sin tener una pronta diferenciación y además, permitió aumentar el número celular total. Esto es importante para poder obtener números suficientes de células para analizar. Los números fueron variables, obtuvimos una expansión del número total de células. Sin embargo, la población obtenida fue heterogénea en términos de inmunofenotipo a pesar de que al día cero todas las células compartían los marcadores de superficie. Este fenómeno fue constante y reproducible para todos los sistemas de cultivo empleados.

Para las CPH no existe evidencia con algunas condiciones de cultivo que nos permitieran comparar nuestros datos. Sin embargo, esta información indica que nuestros sistemas de cultivo fueron eficientes en la generación de progenitores linaje específico y fueron capaces de mantener los niveles de CTH.

Es importante mencionar que desde 1993, estudios funcionales reportados por Mayani, con poblaciones cercanas a las presentadas aquí; se observó la capacidad de las CTH para formar colonias *in vitro*, contrastante con lo reportado canónicamente, donde se dice que la población troncal no es capaz de formar colonias en cultivo semisólido (Mayani, Dragowska, & Lansdorp, 1993), nuestros datos fueron similares aun cuando el inmunofenotipo fue más astringente.

El grupo del Dr. John Dick reportó en el 2015 que las CTH son capaces de generar colonias de tipo mieloide en cultivos semisólidos (Notta et al., 2016), validando y soportando los datos observados. Toda esa información contradice el comportamiento aceptado para las CTH *in vitro*. En este sentido, obtuvimos una distribución balanceada (50% eritroide y 50% mieloide) de las colonias linaje específico cuando se evaluaron las CFC de CTH frescas. Interesantemente, cuando analizamos la formación de colonias de las ivCTH, observamos una tendencia importante (más del 90%) hacia la generación del linaje mieloide, indicando que el cultivo posiblemente esté modificando elementos intrínsecos en la población de ivCTH, resultando en células que comparten inmunofenotipo pero que tienen patrones de expresión génica diferentes. Estos datos son similares a los observados en el trabajo reportado por Delaney en el 2010 (Delaney et al., 2010).

Reportes de diferentes grupos, incluyendo a Muller-Sieburg, Eaves y Suda y sus colaboradores, han demostrado que las CTH murinas pueden presentar una distribución del potencial de linaje heterogéneo, es decir, existen CTH con tendencia a generar linaje mieloide, CTH con potencial hacia linaje linfoide, y un tercer grupo con un potencial balanceado entre linajes (Dykstra et al., 2007; Ema, Morita, & Suda, 2014; Muller-Sieburg, Cho, Karlsson, Huang, & Sieburg, 2004; Muller-Sieburg & Sieburg, 2006).

En humanos, reportes muestran que los cambios se llevan a cabo principalmente a nivel de los progenitores multipotentes, y que estos derivan de un población en común de CTH (Pietras et al., 2015). Aunque la evidencia de esas poblaciones en CTH humanas es menos clara, nuestros resultados demuestran que el cultivar a las CTH modifica el potencial de linaje en la

población, explicando la biología en trasplantes observado por otros grupos anteriormente (Delaney et al., 2010). Este es un evento importante que se debe considerar en los protocolos de expansión, por que aquellas células obtenidas en condiciones de cultivo pueden actuar de manera diferente comparadas con aquellas células no manipuladas. La idea fue reforzada cuando analizamos el contenido de LTCIC en ambas poblaciones, donde se observó que las ivCTH contienen una menor frecuencia de células de largo plazo detectadas únicamente al día cero de la evaluación, y que los niveles fueron no detectables después del día 5 de cultivo mientras que las fCTH mostraron un mantenimiento de células con esta capacidad particular.

Por otro lado, existen reportes que proponen el uso de células pluripotenciales para la generación de células linaje hematopoyético específico, utilizando diferentes estrategias (Amabile et al., 2013; Ledran et al., 2008; Ramos-Mejia et al., 2014; Real et al., 2012); esto con el objetivo de disminuir los tiempos de recuperación. Sin embargo, no existen reportes que utilicen estrategias similares a las presentadas en este trabajo. En lugar de eso, utilizan células que vienen de una mayor manipulación. Sin embargo, si se pretende utilizar estas células en el campo clínico para favorecer a los pacientes, se deben reducir la manipulación celular y el riesgo del paciente. En este sentido, analizamos las capacidades funcionales de progenitores mieloides (CPM) y progenitores eritroides (CPE).

Las poblaciones analizadas, tanto frescas como generadas *in vitro*, mostraron potenciales similares de proliferación (habilidad para dividirse y generar nuevas células, sin importar el linaje o estado de maduración), sin embargo, los potenciales de expansión (habilidad de las células de dividirse y generar nuevas células con características similares a las que les dieron origen) fueron diferentes. Aunque la razón no está clara, una posibilidad es que los números totales celulares se alcancen en los estados de precursores más que a nivel de progenitores, esto significa que las células se encuentran encaminadas a la diferenciación más que a la expansión.

En los últimos años, muchos grupos han reportado el uso de moléculas pequeñas incluyendo OAC1, SR1 y el resveratrol, entre otros, que muestran favorecer la autorrenovación de las CTH, siempre y cuando se utilicen en combinación con citocinas recombinantes hematopoyéticas (Boitano et al., 2010; Fares et al., 2014; Fares et al., 2017; Heinz et al., 2015; Huang et al., 2016; Wagner et al., 2016). Además, existe evidencia que una combinación particular de moléculas pequeñas y citocinas favorecen la expansión de la población CD34+ y CD34CD38- por potenciar la vía señalización de Notch y la inhibición de Wnt, que en conjunto bloquean la diferenciación favoreciendo la autorrenovación (Wang et al., 2017). Es importante notar que en este trabajo no se incluyó moléculas pequeñas. Sin embargo, resulta interesante analizar el comportamiento biológico de las poblaciones celulares en conjunto con esas moléculas para realizar un estudio similar al que en este trabajo se presenta.

Nuestro análisis provee un nuevo panorama funcional acerca de las CTPH generadas *in vitro*, y muestra que la expansión en el laboratorio puede modificar el comportamiento biológico de las células. Estas modificaciones posiblemente se regulen a nivel transcriptómico. Por esta razón, se hizo un análisis de los patrones globales de expresión génica, buscando vías y procesos alterados en las células generadas *in vitro*.

Los análisis transcriptómicos de cada una de las poblaciones incluidas en este estudio, demostraron que existen diferencias entre las células obtenidas de SCU y las generadas *in vitro*, por ejemplo, una activación de las vías de señalización JAK-STAT, PI3K-AKT, NFκB y HIF-1, además de procesos biológicos como ciclo celular, apoptosis y diferenciación mieloide, explican lo observado en los análisis funcionales. En un estudio reciente por el grupo de Papayannopoulou y colaboradores, se observó que cuando la población CD34+ de sangre periférica movilizada fue cultivada por 7 días en presencia de una combinación de un antagonista del receptor de Aril hidrocarbon llamado *StemRegenin1* (SR1) y el inhibidor de p38-MAPK14, LY2228820 (Ly) o bien, cultivadas con un derivado de pirimidoindol UM171, aquellas células generadas *in vitro* utilizando SR1+ Ly mostraron una disminución en la expresión de Rap-1, Ras y PI3K- Akt en contraste con las células obtenidas del cultivo con la molécula

pequeña UM171 (Psatha, Georgolopoulos, Phelps, & Papayannopoulou, 2017). Resulta importante mencionar que la activación estas vías, ha sido asociada al agotamiento de la población de CTH en ratones (Kharas et al., 2010). Interesantemente en nuestro análisis encontramos que los niveles de PI3K-Akt estaban incrementados, de manera similar a lo reportado en el trabajo de Psatha et al, para el cultivo con UM171. Estos datos resultan importantes para tratar de comprender porque en el análisis funcional, la población ivCTH mostró una reducción del contenido de LTC-IC y una disminución en la capacidad de proliferación.

Recientemente, el grupo de Passegué demostró que las CTH de ratones viejos, presentan una tendencia de diferenciación mieloide y alteraciones en rutas metabólicas de tipo mitocondrial (Ho et al., 2017). Considerando el comportamiento observado en este trabajo, se podría sugerir que el cultivar a las células troncales hematopoyéticas, las lleva a un estadio de envejecimiento.

Hemos seleccionado y purificado tres diferentes poblaciones celulares (CTH, CPM y CPE) obtenidas directamente de la SCU o generadas en condiciones específicas de cultivo. Las poblaciones fueron pareadas y comparadas en términos de funcionalidad y de expresión génica. Nuestros resultados indican que a pesar de que las células comparten inmunofenotipo, las poblaciones frescas y las poblaciones *in vitro* tienen diferencias importantes. Las CTH generadas *in vitro* contienen una frecuencia menor de LTCIC y una marcada tendencia hacia el linaje mieloide. Además, las poblaciones generadas *in vitro* (ivCTH, ivCPM, ivCPE) muestran potenciales de expansión deficientes y una rápida diferenciación en comparación con sus contrapartes obtenidas directamente de la SCU, datos que correlacionan con lo observado en el análisis transcriptómico.

Esas observaciones pueden tener implicaciones clínicas en el trasplante de SCU, debido a que pueden ser parte importante del éxito de esos trasplantes, pues generalmente se infunden una unidad no manipulada y una expandida, siendo la primera la unidad que permanece por periodos largos de tiempo, es decir, las CTH provenientes de esta unidad son las que logran hacer el injerto a

largo plazo. Parte del fenómeno biológico descrito en esos trasplantes puede explicarse por la rápida diferenciación y la baja capacidad de expansión observada en este estudio con las células expandidas *in vitro*, sin embargo las capacidad de proliferación y la generación de células en estadios avanzados de la diferenciación, podrían favorecer a acortar los tiempos de recuperación de los pacientes, por lo que resulta importante el proceso de expansión.

Conclusiones

- Se obtuvo un sistema de inducción a diferenciación de las fCTH hacia progenitores linaje-específicos, mediante la modificación de las condiciones de cultivo, que garantiza la obtención de ivCTH, ivCPE e ivCPM.
- Las poblaciones generadas *in vitro* tienen potenciales de proliferación, similares a las poblaciones hematopoyéticas que maduran *in vivo*, sin embargo, la capacidad de expansión es menor y la diferenciación se realiza de manera más acelerada.
- Las ivCTH parecen tener disminuida su capacidad de autorrenovación y tienden a diferenciarse generando principalmente linaje mielóide.
- Las condiciones de cultivo utilizadas en este estudio, resultan en la modificación de los patrones transcripcionales, activando vías como PI3K, Wnt, Notch y FoxO, modulando las variaciones en las capacidades de proliferación, expansión y diferenciación observadas en las poblaciones hematopoyéticas analizadas.
- Es importante tener en cuenta los resultados observados cuando se realiza un trasplante de células hematopoyéticas expandidas, pues es evidente que las capacidades biológicas se modifican por las señales extrínsecas que reciben las células, por ejemplo, las condiciones de cultivo descritas en este estudio.

Perspectivas

Se presentó un análisis a nivel de poblaciones individuales, por lo que es conveniente realizar un estudio en el que se incluyan en el mismo cultivo a las diferentes poblaciones generadas *in vitro*, dado que existe la posibilidad de que haya una regulación directa entre ellas, ya sea por la interacción célula – célula o por la secreción de moléculas solubles que influyan en el comportamiento biológico de las células.

Por otro lado, resulta interesante evaluar la funcionalidad de las poblaciones generadas en este estudio (ivCTH, ivCPM e ivCPE), utilizando un sistema *in vivo* con ratones inmunosuprimidos; puesto que ahí, los elementos extrínsecos serían diferentes y regularían a las células a través de los mecanismos descritos para el microambiente hematopoyético y eso podría modificar los elementos celulares intrínsecos de las poblaciones, impactando en su comportamiento biológico.

Referencias

- Alvarado-Moreno, A., Chavez-Gonzalez, A., Cerbulo, A., Arriaga-Pizano, L., Mayani, H. (2007). Cell cycle differences in vitro between primitive hematopoietic cell populations from adult and umbilical cord blood. *Stem Cells Dev*, 16(2), 223-230. doi:10.1089/scd.2006.9996
- Amabile, G., Welner, R. S., Nombela-Arrieta, C., D'Alise, A. M., Di Ruscio, A., Ebralidze, A. K., . . . Tenen, D. G. (2013). In vivo generation of transplantable human hematopoietic cells from induced pluripotent stem cells. *Blood*, 121(8), 1255-1264. doi:10.1182/blood-2012-06-434407
- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., . . . Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20), 2391-2405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544
- Ballen, K. K., Gluckman, E., & Broxmeyer, H. E. (2013). Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood*, 122(4), 491-498. doi:10.1182/blood-2013-02-453175
- Bari, S., Seah, K. K., Poon, Z., Cheung, A. M., Fan, X., Ong, S. Y., . . . Hwang, W. Y. (2015). Expansion and homing of umbilical cord blood hematopoietic stem and progenitor cells for clinical transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 21(6), 1008-1019. doi:10.1016/j.bbmt.2014.12.022
- Biasco, L., Pellin, D., Scala, S., Dionisio, F., Basso-Ricci, L., Leonardelli, L., . . . Aiuti, A. (2016). In Vivo Tracking of Human Hematopoiesis Reveals Patterns of Clonal Dynamics during Early and Steady-State Reconstitution Phases. *Cell Stem Cell*, 19(1), 107-119. doi:10.1016/j.stem.2016.04.016
- Boitano, A. E., Wang, J., Romeo, R., Bouchez, L. C., Parker, A. E., Sutton, S. E., . . . Cooke, M. P. (2010). Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science*, 329(5997), 1345-1348. doi:10.1126/science.1191536
- Broxmeyer, H. E., Douglas, G. W., Hangoc, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., . . . Boyse, E. A. (1989). Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(10), 3828-3832.
- Carrelha, J., Meng, Y., Kettyle, L. M., Luis, T. C., Norfo, R., Alcolea, V., . . . Sten Eirik, W. J. (2018). Hierarchically related lineage-restricted fates of multipotent haematopoietic stem cells. *Nature*, 554(7690), 106-111. doi:10.1038/nature25455
- Cordeiro Gomes, A., Hara, T., Lim, V. Y., Herndler-Brandstetter, D., Nevius, E., Sugiyama, T., . . . Pereira, J. P. (2016). Hematopoietic Stem Cell Niches Produce Lineage-Instructive Signals to Control Multipotent Progenitor Differentiation. *Immunity*, 45(6), 1219-1231. doi:10.1016/j.immuni.2016.11.004
- Cutler, C., Multani, P., Robbins, D., Kim, H. T., Le, T., Hoggatt, J., . . . Shoemaker, D. D. (2013). Prostaglandin-modulated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 122(17), 3074-3081. doi:10.1182/blood-2013-05-503177

- Christopherson, K. W., 2nd, Hangoc, G., & Broxmeyer, H. E. (2002). Cell surface peptidase CD26/dipeptidylpeptidase IV regulates CXCL12/stromal cell-derived factor-1 alpha-mediated chemotaxis of human cord blood CD34+ progenitor cells. *J Immunol*, *169*(12), 7000-7008.
- de Lima, M., McMannis, J., Gee, A., Komanduri, K., Couriel, D., Andersson, B. S., . . . Shpall, E. J. (2008). Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. *Bone Marrow Transplant*, *41*(9), 771-778. doi:10.1038/sj.bmt.1705979
- Delaney, C., Heimfeld, S., Brashem-Stein, C., Voorhies, H., Manger, R. L., & Bernstein, I. D. (2010). Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat Med*, *16*(2), 232-236. doi:10.1038/nm.2080
- Dircio-Maldonado, R., Flores-Guzman, P., Corral-Navarro, J., Mondragon-Garcia, I., Hidalgo-Miranda, A., Beltran-Anaya, F. O., . . . Mayani, H. (2018). Functional Integrity and Gene Expression Profiles of Human Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Generated In Vitro. *Stem Cells Transl Med*. doi:10.1002/sctm.18-0013
- Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., & Dick, J. E. (2012). Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*, *10*(2), 120-136. doi:10.1016/j.stem.2012.01.006
- Duong, H. K., Savani, B. N., Copelan, E., Devine, S., Costa, L. J., Wingard, J. R., . . . Carpenter, P. A. (2014). Peripheral blood progenitor cell mobilization for autologous and allogeneic hematopoietic cell transplantation: guidelines from the American Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, *20*(9), 1262-1273. doi:10.1016/j.bbmt.2014.05.003
- Dykstra, B., Kent, D., Bowie, M., McCaffrey, L., Hamilton, M., Lyons, K., . . . Eaves, C. (2007). Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo. *Cell Stem Cell*, *1*(2), 218-229. doi:10.1016/j.stem.2007.05.015
- Ema, H., Morita, Y., & Suda, T. (2014). Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*, *42*(2), 74-82 e72. doi:10.1016/j.exphem.2013.11.004
- Fajardo-Orduna, G. R., Mayani, H., Castro-Manrreza, M. E., Flores-Figueroa, E., Flores-Guzman, P., Arriaga-Pizano, L., . . . Montesinos, J. J. (2016). Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells from Clinical Scale Culture: In Vitro Evaluation of Their Differentiation, Hematopoietic Support, and Immunosuppressive Capacities. *Stem Cells Dev*, *25*(17), 1299-1310. doi:10.1089/scd.2016.0071
- Farag, S. S., Srivastava, S., Messina-Graham, S., Schwartz, J., Robertson, M. J., Abonour, R., . . . Broxmeyer, H. E. (2013). In vivo DPP-4 inhibition to enhance engraftment of single-unit cord blood transplants in adults with hematological malignancies. *Stem Cells Dev*, *22*(7), 1007-1015. doi:10.1089/scd.2012.0636

- Fares, I., Chagraoui, J., Gareau, Y., Gingras, S., Ruel, R., Mayotte, N., . . . Sauvageau, G. (2014). Cord blood expansion. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. *Science*, *345*(6203), 1509-1512. doi:10.1126/science.1256337
- Fares, I., Chagraoui, J., Lehnertz, B., MacRae, T., Mayotte, N., Tomellini, E., . . . Sauvageau, G. (2017). EPCR expression marks UM171-expanded CD34(+) cord blood stem cells. *Blood*, *129*(25), 3344-3351. doi:10.1182/blood-2016-11-750729
- Fernandez-Sanchez, V., Pelayo, R., Flores-Guzman, P., Flores-Figueroa, E., Villanueva-Toledo, J., Garrido, E., . . . Mayani, H. (2011). In vitro effects of stromal cells expressing different levels of Jagged-1 and Delta-1 on the growth of primitive and intermediate CD34(+) cell subsets from human cord blood. *Blood Cells Mol Dis*, *47*(4), 205-213. doi:10.1016/j.bcmd.2011.08.003
- Flores-Guzman, P., Flores-Figueroa, E., Montesinos, J. J., Martinez-Jaramillo, G., Fernandez-Sanchez, V., Valencia-Plata, I., . . . Mayani, H. (2009). Individual and combined effects of mesenchymal stromal cells and recombinant stimulatory cytokines on the in vitro growth of primitive hematopoietic cells from human umbilical cord blood. *Cytotherapy*, *11*(7), 886-896. doi:10.3109/14653240903180076
- Flores-Guzman, P., Fernandez-Sanchez, V., Valencia-Plata, I., Arriaga-Pizano, L., Alarcon-Santos, G., & Mayani, H. (2013). Comparative in vitro analysis of different hematopoietic cell populations from human cord blood: in search of the best option for clinically oriented ex vivo cell expansion. *Transfusion*, *53*(3), 668-678. doi:10.1111/j.1537-2995.2012.03799.x
- Flores-Guzman, P., Gutierrez-Rodriguez, M., & Mayani, H. (2002). In vitro proliferation, expansion, and differentiation of a CD34+ cell-enriched hematopoietic cell population from human umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. *Arch Med Res*, *33*(2), 107-114.
- Flores-Guzman, P., & Mayani, H. (2006). Growth kinetics of progenitor cell-enriched hematopoietic cell populations in long-term liquid cultures under continuous removal of mature cells. *Cytotherapy*, *8*(3), 299-307. doi:10.1080/14653240600735776
- Gage, F. H. (1998). Cell therapy. *Nature*, *392*(6679 Suppl), 18-24.
- Gluckman, E., Broxmeyer, H. A., Auerbach, A. D., Friedman, H. S., Douglas, G. W., Devergie, A., . . . et al. (1989). Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*, *321*(17), 1174-1178. doi:10.1056/NEJM198910263211707
- Hamey, F. K., Nestorowa, S., Kinston, S. J., Kent, D. G., Wilson, N. K., & Gottgens, B. (2017). Reconstructing blood stem cell regulatory network models from single-cell molecular profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(23), 5822-5829. doi:10.1073/pnas.1610609114
- Hatzimichael, E., & Tuthill, M. (2010). Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells Cloning*, *3*, 105-117. doi:10.2147/SCCAA.S6815

- Heinz, N., Ehrnstrom, B., Schambach, A., Schwarzer, A., Modlich, U., & Schiedlmeier, B. (2015). Comparison of Different Cytokine Conditions Reveals Resveratrol as a New Molecule for Ex Vivo Cultivation of Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cells Transl Med*, 4(9), 1064-1072. doi:10.5966/sctm.2014-0284
- Ho, T. T., Warr, M. R., Adelman, E. R., Lansinger, O. M., Flach, J., Verovskaya, E. V., . . . Passegue, E. (2017). Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature*, 543(7644), 205-210. doi:10.1038/nature21388
- Horwitz, M. E., Chao, N. J., Rizzieri, D. A., Long, G. D., Sullivan, K. M., Gasparetto, C., . . . Peled, T. (2014). Umbilical cord blood expansion with nicotinamide provides long-term multilineage engraftment. *J Clin Invest*, 124(7), 3121-3128. doi:10.1172/JCI74556
- Huang, X., Lee, M. R., Cooper, S., Hangoc, G., Hong, K. S., Chung, H. M., & Broxmeyer, H. E. (2016). Activation of OCT4 enhances ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem and progenitor cells by regulating HOXB4 expression. *Leukemia*, 30(1), 144-153. doi:10.1038/leu.2015.189
- Kharas, M. G., Okabe, R., Ganis, J. J., Gozo, M., Khandan, T., Paktinat, M., . . . Gritsman, K. (2010). Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice. *Blood*, 115(7), 1406-1415. doi:10.1182/blood-2009-06-229443
- Lansdorp, P. M., Dragowska, W., & Mayani, H. (1993). Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J Exp Med*, 178(3), 787-791.
- Laughlin, M. J., Eapen, M., Rubinstein, P., Wagner, J. E., Zhang, M. J., Champlin, R. E., . . . Horowitz, M. M. (2004). Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med*, 351(22), 2265-2275. doi:10.1056/NEJMoa041276
- Ledran, M. H., Krassowska, A., Armstrong, L., Dimmick, I., Renstrom, J., Lang, R., . . . Lako, M. (2008). Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell*, 3(1), 85-98. doi:10.1016/j.stem.2008.06.001
- Lee, S. H., Lee, M. W., Yoo, K. H., Kim, D. S., Son, M. H., Sung, K. W., . . . Koo, H. H. (2013). Co-transplantation of third-party umbilical cord blood-derived MSCs promotes engraftment in children undergoing unrelated umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 48(8), 1040-1045. doi:10.1038/bmt.2013.7
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Mantel, C. R., O'Leary, H. A., Chitteti, B. R., Huang, X., Cooper, S., Hangoc, G., . . . Broxmeyer, H. E. (2015). Enhancing Hematopoietic Stem Cell Transplantation Efficacy by Mitigating Oxygen Shock. *Cell*, 161(7), 1553-1565. doi:10.1016/j.cell.2015.04.054
- Mayani, H. (2003). A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Arch Med Res*, 34(1), 3-15.

- Mayani, H. (2010). Biological differences between neonatal and adult human hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev*, 19(3), 285-298. doi:10.1089/scd.2009.0327
- Mayani, H. (2011). Umbilical cord blood: lessons learned and lingering challenges after more than 20 years of basic and clinical research. *Arch Med Res*, 42(8), 645-651. doi:10.1016/j.arcmed.2011.11.010
- Mayani, H. (2012). In vitro biology of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Hematology*, 17 Suppl 1, S181-184. doi:10.1179/102453312X13336169156979
- Mayani, H., Dragowska, W., & Lansdorp, P. M. (1993). Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34+ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood*, 82(9), 2664-2672.
- Mayani H, F.-F. E., Pelayo R, Montesinos JJ, Flores-Guzman P, Chavez-Gonzalez A. (2007). Hematopoyesis. *Cancerología.*, 2, 95-107.
- Mayani, H., & Lansdorp, P. M. (1995). Proliferation of individual hematopoietic progenitors purified from umbilical cord blood. *Exp Hematol*, 23(14), 1453-1462.
- Mayani, H., & Lansdorp, P. M. (1998). Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells*, 16(3), 153-165. doi:10.1002/stem.160153
- Michalicka, M., Boisjoli, G., Jahan, S., Hovey, O., Doxtator, E., Abu-Khader, A., . . . Pineault, N. (2017). Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell-Derived Osteoblasts Promote the Expansion of Hematopoietic Progenitors Through Beta-Catenin and Notch Signaling Pathways. *Stem Cells Dev*, 26(24), 1735-1748. doi:10.1089/scd.2017.0133
- Migliaccio, A. R., Adamson, J. W., Stevens, C. E., Dobrila, N. L., Carrier, C. M., & Rubinstein, P. (2000). Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood*, 96(8), 2717-2722.
- Miller, P. H., Knapp, D. J., & Eaves, C. J. (2013). Heterogeneity in hematopoietic stem cell populations: implications for transplantation. *Curr Opin Hematol*, 20(4), 257-264. doi:10.1097/MOH.0b013e328360aaf6
- Muller-Sieburg, C. E., Cho, R. H., Karlsson, L., Huang, J. F., & Sieburg, H. B. (2004). Myeloid-biased hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished lymphoid progeny with impaired IL-7 responsiveness. *Blood*, 103(11), 4111-4118. doi:10.1182/blood-2003-10-3448
- Muller-Sieburg, C. E., & Sieburg, H. B. (2006). The GOD of hematopoietic stem cells: a clonal diversity model of the stem cell compartment. *Cell Cycle*, 5(4), 394-398. doi:10.4161/cc.5.4.2487
- North, T. E., Goessling, W., Walkley, C. R., Lengerke, C., Kopani, K. R., Lord, A. M., . . . Zon, L. I. (2007). Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis. *Nature*, 447(7147), 1007-1011. doi:10.1038/nature05883

- Notta, F., Zandi, S., Takayama, N., Dobson, S., Gan, O. I., Wilson, G., . . . Dick, J. E. (2016). Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science*, *351*(6269), aab2116. doi:10.1126/science.aab2116
- Orkin, S. H., Zon, L. I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, *132*(4), 631-644. doi:10.1016/j.cell.2008.01.025
- Pietras, E. M., Reynaud, D., Kang, Y. A., Carlin, D., Calero-Nieto, F. J., Leavitt, A. D., . . . Passegue, E. (2015). Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell*, *17*(1), 35-46. doi:10.1016/j.stem.2015.05.003
- Pineault, N., & Abu-Khader, A. (2015). Advances in umbilical cord blood stem cell expansion and clinical translation. *Exp Hematol*, *43*(7), 498-513. doi:10.1016/j.exphem.2015.04.011
- Prindull, G., Prindull, B., & Meulen, N. (1978). Haematopoietic stem cells (CFUc) in human cord blood. *Acta Paediatr Scand*, *67*(4), 413-416.
- Psatha, N., Georgolopoulos, G., Phelps, S., & Papayannopoulou, T. (2017). Brief Report: A Differential Transcriptomic Profile of Ex Vivo Expanded Adult Human Hematopoietic Stem Cells Empowers Them for Engraftment Better than Their Surface Phenotype. *Stem Cells Transl Med*, *6*(10), 1852-1858. doi:10.1002/sctm.17-0048
- Ramos-Mejia, V., Navarro-Montero, O., Ayllon, V., Bueno, C., Romero, T., Real, P. J., & Menendez, P. (2014). HOXA9 promotes hematopoietic commitment of human embryonic stem cells. *Blood*, *124*(20), 3065-3075. doi:10.1182/blood-2014-03-558825
- Real, P. J., Ligerio, G., Ayllon, V., Ramos-Mejia, V., Bueno, C., Gutierrez-Aranda, I., . . . Menendez, P. (2012). SCL/TAL1 regulates hematopoietic specification from human embryonic stem cells. *Mol Ther*, *20*(7), 1443-1453. doi:10.1038/mt.2012.49
- Rieger, M. A., & Schroeder, T. (2012). Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *4*(12). doi:10.1101/cshperspect.a008250
- Roch, A., Giger, S., Girotra, M., Campos, V., Vannini, N., Naveiras, O., . . . Lutolf, M. P. (2017). Single-cell analyses identify bioengineered niches for enhanced maintenance of hematopoietic stem cells. *Nat Commun*, *8*(1), 221. doi:10.1038/s41467-017-00291-3
- Rocha, V., Labopin, M., Sanz, G., Arcese, W., Schwerdtfeger, R., Bosi, A., . . . Eurocord-Netcord, R. (2004). Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med*, *351*(22), 2276-2285. doi:10.1056/NEJMoa041469
- Rodriguez-Fraticelli, A. E., Wolock, S. L., Weinreb, C. S., Panero, R., Patel, S. H., Jankovic, M., . . . Camargo, F. D. (2018). Clonal analysis of lineage fate in native haematopoiesis. *Nature*, *553*(7687), 212-216. doi:10.1038/nature25168
- Sabharwal, S., Verhulst, S., Guirguis, G., Kark, J. D., Labat, C., Roche, N. E., . . . Aviv, A. (2018). Telomere length dynamics in early life: the blood-and-muscle model. *FASEB J*, *32*(1), 529-534. doi:10.1096/fj.201700630R

- Shpall, E. J., Quinones, R., Giller, R., Zeng, C., Baron, A. E., Jones, R. B., . . . McNiece, I. K. (2002). Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant*, *8*(7), 368-376.
- Stockel, D., Kehl, T., Trampert, P., Schneider, L., Backes, C., Ludwig, N., . . . Lenhof, H. P. (2016). Multi-omics enrichment analysis using the GeneTrail2 web service. *Bioinformatics*, *32*(10), 1502-1508. doi:10.1093/bioinformatics/btv770
- Sun, J., Ramos, A., Chapman, B., Johnnidis, J. B., Le, L., Ho, Y. J., . . . Camargo, F. D. (2014). Clonal dynamics of native haematopoiesis. *Nature*, *514*(7522), 322-327. doi:10.1038/nature13824
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R., . . . Jaffe, E. S. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, *127*(20), 2375-2390. doi:10.1182/blood-2016-01-643569
- Szilvassy, S. J. (2003). The biology of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res*, *34*(6), 446-460. doi:10.1016/j.arcmed.2003.06.004
- Wagner, J. E., Jr., Brunstein, C. G., Boitano, A. E., DeFor, T. E., McKenna, D., Sumstad, D., . . . Bleul, C. C. (2016). Phase I/II Trial of StemRegenin-1 Expanded Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells Supports Testing as a Stand-Alone Graft. *Cell Stem Cell*, *18*(1), 144-155. doi:10.1016/j.stem.2015.10.004
- Wang, L., Guan, X., Wang, H., Shen, B., Zhang, Y., Ren, Z., . . . Jiang, Y. (2017). A small-molecule/cytokine combination enhances hematopoietic stem cell proliferation via inhibition of cell differentiation. *Stem Cell Res Ther*, *8*(1), 169. doi:10.1186/s13287-017-0625-z

Anexo 1.

Artículo publicado.



Functional Integrity and Gene Expression Profiles of Human Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Generated In Vitro

ROBERTO DIRCIO-MALDONADO,^a PATRICIA FLORES-GUZMAN,^a JULIETA CORRAL-NAVARRO,^a ILEANA MONDRAGÓN-GARCÍA,^a ALFREDO HIDALGO-MIRANDA,^b FREDY OMAR BELTRAN-ANAYA,^b ALBERTO CEDRO-TANDA,^b LOURDES ARRIAGA-PIZANO,^c ODETTE BALVANERA-ORTIZ,^d HECTOR MAYANI ^a

^aHematopoietic Stem Cells Laboratory, Oncology Research Unit, Oncology Hospital, ^cImmunochemistry Research Unit, Medical Specialties Hospital, IMSS National Medical Center, Mexico City, Mexico; ^bNational Ministry of Health, National Institute of Genomic Medicine, Mexico City, Mexico; ^dTroncoso General Hospital, IMSS, Mexico City, Mexico

Correspondence: Hector Mayani, Ph.D., National Medical Center, IMSS, Tallo 2, D-102, San Pablo Tepetlapa, Coyoacan, Mexico D.F. 04620, Mexico. Telephone: 52-55-5627 6959; e-mail: hmayaniv@prodigy.net.mx

Received January 17, 2018; accepted for publication March 29, 2018

<http://dx.doi.org/10.1002/sctm.18-0013>

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

This article was published online on 26 April 2018. The logo for the Cord Blood Association incorrectly appeared on the article and has now been removed because the authors are not members of the association. This notice is included in the online version to indicate this version was corrected on 7 May 2018.

Key Words. Cord blood • Ex vivo expansion • Gene expression profiles • Hematopoietic stem and progenitor cells

ABSTRACT

To date, different experimental strategies have been developed for the ex vivo expansion of human hematopoietic stem (HSCs) and progenitor (HPCs) cells. This has resulted in significant advances on the use of such expanded cells in transplantation settings. To this day, however, it is still unclear to what extent those stem and progenitor cells generated in vitro retain the functional and genomic integrity of their freshly isolated counterparts. In trying to contribute to the solving of this issue, in the present study we have selected and purified three different hematopoietic cell populations: HSCs (CD34⁺ CD38⁻ CD45RA⁻ CD71⁻ Lin⁻ cells), myeloid progenitor cells (CD34⁺ CD38⁺ CD45RA⁺ CD71⁻ Lin⁻ cells), and erythroid progenitor cells (CD34⁺ CD38⁺ CD45RA⁻ CD71⁺ Lin⁻ cells), obtained directly from fresh human umbilical cord blood (UCB) units or generated in vitro under particular culture conditions. We, then, compared their functional integrity in vitro and their gene expression profiles. Our results indicate that in spite of being immunophenotypically similar, fresh and in vitro generated cells showed significant differences, both in functional and genetic terms. As compared to their fresh counterparts, those HSCs generated in our culture system showed a deficient content of long-term culture-initiating cells, and a marked differentiation bias toward the myeloid lineage. In addition, in vitro generated HSCs and HPCs showed a limited expansion potential. Such functional alterations correlated with differences in their gene expression profiles. These observations are relevant in terms of HSC biology and may have implications in UCB expansion and transplantation. *STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE* 2018;00:000–000

SIGNIFICANCE STATEMENT

This study presents evidence indicating that in vitro-generated hematopoietic stem and progenitor cells differ in functional and genetic terms from their freshly obtained counterparts. These findings have biologic and clinical implications.

INTRODUCTION

Over the last three decades, umbilical cord blood (UCB) has become a major source of hematopoietic stem and progenitor cells (HSCs and HPCs, respectively) for hematopoietic transplantation [1, 2]. UCB not only contains clinically relevant amounts of primitive hematopoietic cells that possess great proliferation and expansion potentials [3–6], but such cells can be stored in public or private UCB banks [7–9]. To date, it is estimated that over 40,000 UCB transplants (UCBT) have been performed worldwide. In pediatric patients, UCB transplantation has become a first-line therapy for specific hematological conditions, with results comparable to those obtained when

using adult marrow or mobilized peripheral blood [10]. In contrast, most adult patients transplanted with UCB show prolonged periods of neutropenia and thrombocytopenia after transplant, which results in increased morbidity and mortality [11]. This seems to be due, at least in part, to the fact that the absolute numbers of HSCs and HPCs in a UCB unit are significantly lower than in a bone marrow or a mobilized peripheral blood unit [12].

In the last few years, different strategies have been explored to improve UCBT in adult patients. Among them, three approaches have already been taken into the clinic, namely, double-unit transplants, intra bone injection of cells, and the use of ex vivo-expanded HSCs and HPCs [13–18]. Regarding the use of ex vivo-expanded cells,

significant advances have been reported. Indeed, a variety of experimental strategies has been developed for the expansion of such primitive cells in culture [19–22]. A common feature in all the laboratory systems reported to date is the presence of particular combinations of recombinant stimulatory cytokines that favor hematopoietic growth. These combinations usually include early acting cytokines, such as stem cell factor (SCF), the ligand for FLT-3 (FLT3-L), and thrombopoietin (TPO). Interestingly, other elements, such as mesenchymal stromal cells, metal chelators, Notch ligands, or small molecules that favor stem cell self-renewal (such as UM171, OAC1, SR1, nicotinamide, and Resveratrol), have also been incorporated into some of these systems [23–28]. In fact, some of these molecules have already been tested in clinical settings or are close to being tested. It is noteworthy that when expanded cells have been taken into the clinic, the results obtained so far have been encouraging [29–32].

In spite of the advances in the development of ex vivo expansion systems and the clinical achievements reported to date, several basic questions regarding the biology of the hematopoietic cells generated in culture are still unanswered. In this regard, it is still unclear to what extent those stem and progenitor cells generated in vitro retain the functional and genomic integrity of their freshly isolated counterparts. In other words, how similar are those HSCs and HPCs generated in vitro to their equivalent cell populations obtained directly from human UCB units? The fact that ex vivo expanded stem and progenitor cells are capable of engrafting and restoring hematopoiesis in immunodeficient mice seems to argue that these cells are similar, in biological terms, to their initially obtained counterparts. However, to the best of our knowledge, this hypothesis has not been conclusively demonstrated. In fact, there is extensive evidence indicating that when primitive hematopoietic cells are cultured in vitro, they experience a variety of phenotypic and functional changes induced by the culture conditions, including a tendency of HSCs to lose their stemness when they enter cell cycle, and an external pressure on HPCs to mature [33–35]. Thus, even though they may retain their original immunophenotype after ex vivo expansion, their genomic and functional integrity may be altered. This notion, in fact, seems to be the reason why expanded cells transplanted into patients are always infused together with an unmanipulated UCB unit.

In trying to contribute to the solving of this issue, in the present study we have purified three different human hematopoietic cell populations: HSCs, myeloid progenitor cells (MPCs), and erythroid progenitor cells (EPCs)—obtained directly from fresh UCB units or generated in vitro under a particular culture strategy (serum- and stroma-free liquid culture supplemented with human recombinant cytokines)—and compared their functional integrity in vitro and their gene expression profiles.

MATERIALS AND METHODS

Cell Collection and Processing

Human UCB cells, collected according to institutional guidelines, were obtained from normal full-term deliveries at the Troncoso Hospital (Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City), as described previously by us [36]. Informed consent was obtained from every single donor.

Purification of HSCs, MPCs, and EPCs from UCB

Cells expressing the CD34 antigen (CD34⁺ cells) were enriched from mononuclear cells (MNCs) by negative selection [37], using

the EasySep system, according to the manufacturer's instructions (StemCell Technologies Inc. [STI], Vancouver, Canada). Before negative selection, CD34⁺ cells corresponded to 0.7%–2.1% of MNCs; after negative selection, CD34⁺ cells corresponded to 67.2%–89.0% of the enriched Lineage-negative (Lin⁻) cell population. From the recovered cells, CD34⁺ cell subpopulations were purified by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS), using a FACS Aria II (BD; San Jose, California) (Fig. 1A). All the antibodies used were purchased from BD Bioscience, and were selected using the antibodies approved by EuroFlow Guide for Flow Cytometry (2011). Three different cell populations were obtained by standard FACS protocols: HSCs, defined as CD34⁺ CD38⁻ CD45RA⁻ CD71⁻ Lin⁻ cells; MPCs, defined as CD34⁺ CD38⁺ CD45RA⁺ CD71⁻ Lin⁻ cells; and EPCs, defined as CD34⁺ CD38⁺ CD45RA⁻ CD71⁺ Lin⁻ cells. These immunophenotypic criteria were based on previous studies [38]. For all three cell populations, purity was >98%, as determined by FACS (Fig. 1B). Cell populations obtained in this manner were referred to as “fresh (f)” cells (e.g., fHSCs, fMPCs, fEPCs).

In Vitro Generation of HSCs, MPCs, and EPCs

Fresh HSCs were resuspended in Serum-Free Expansion Medium (StemSpan SFEM; STI). For the in vitro generation of HSCs, fHSCs (2.3×10^4 cells/ml, in average) were cultured on an adherent cell layer of the OP9 cell line, and the culture medium was supplemented with the following recombinant hematopoietic cytokines: TPO; Flt-3-ligand (FL); Steel Factor (SF); Interleukin-3 (IL-3); IL-6; Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), and G-CSF. All cytokines were purchased from Peprotech (Rocky Hill, NJ) and were added at 10 ng/ml. We followed the protocol described in detail in our previous report [36]. After 7 days of culture, total nucleated cells were recovered and CD34⁺ CD38⁻ CD45RA⁻ CD71⁻ Lin⁻ cells were purified by FACS.

For the in vitro generation of MPCs and EPCs, fHSCs were cultured in 24-well tissue culture plates at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ in air, at a concentration of 1.1×10^4 cells/ml/well, in average, using the same culture medium supplemented with TPO, FL, SCF, IL-3, and IL-6. Culture medium was changed on day 5, and on day 10 of culture total nucleated cells were harvested from the wells, counted, and processed for flow cytometry. MPCs and EPCs were obtained by FACS following the same protocol as for fresh cells (Fig. 1B). All cells generated in culture were referred to as “in vitro generated (iv)” cells (e.g., ivHSCs, ivMPCs, and ivEPCs).

Liquid Suspension Cultures

Hematopoietic stem and progenitor cells were cultured in liquid suspension cultures, in order to assess their proliferation, expansion, and differentiation potentials. Proliferation was defined as the capacity of a primitive cell to divide and give rise to new cells, regardless of their lineage and maturation stage. Expansion was defined as the capacity of a primitive cell to divide and give rise to new primitive cells, biologically similar to the initial cells. Differentiation was defined as the capacity of a primitive cell to divide and give rise to mature cells of specific lineages, identifiable by their morphology. Each one of the cell populations obtained was resuspended in Serum-Free Expansion Medium (StemSpan SFEM; STI). The culture medium was supplemented with different combinations of the following recombinant hematopoietic cytokines: TPO, FL, SF, IL-3, IL-6, GM-CSF, G-CSF, and erythropoietin (EPO; R&D, Minneapolis, MN). All cytokines—except for EPO—were added at 10 ng/ml; EPO was added at 3 IU/ml. Cells were cultured in

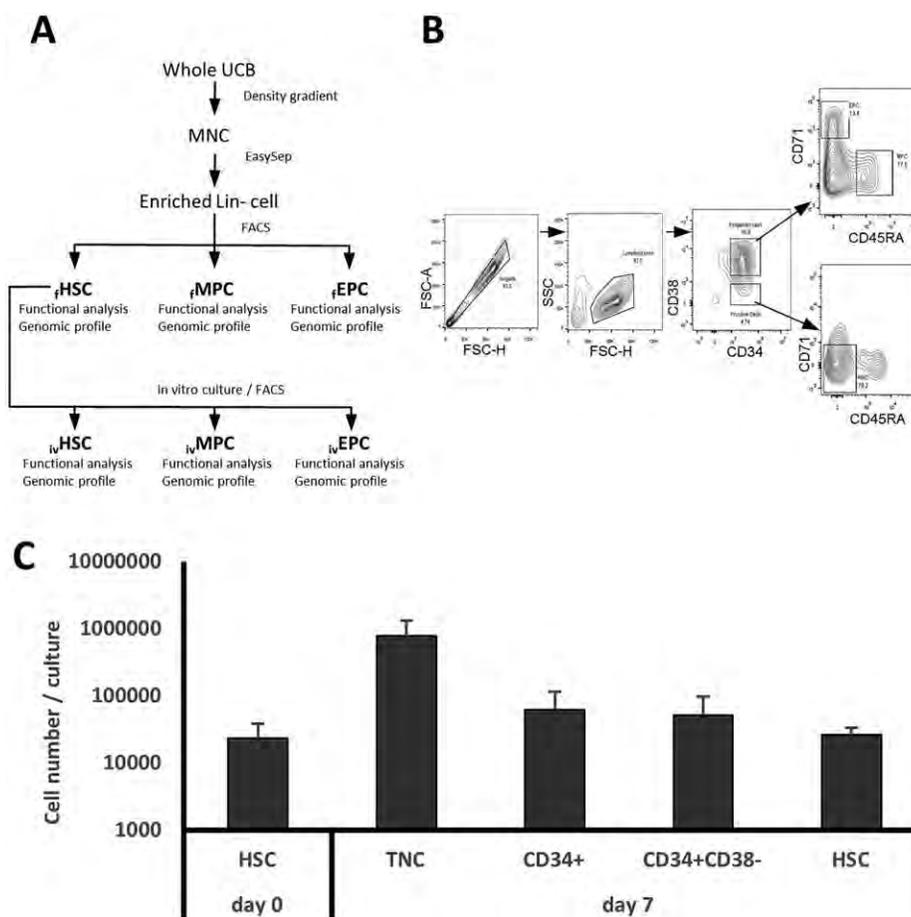


Figure 1. Selection of HSCs, MPCs, and EPCs and in vitro generation of HSCs. **(A):** Methodological strategy used in the present study for the processing of UCB units and the selection of the three cell populations obtained from fresh UCB units (f) and generated in vitro (iv). **(B):** FACS strategy for obtaining HSCs, MPCs, and EPCs from a CD34⁺ cell-enriched fraction obtained by negative selection. **(C):** In vitro generation of hematopoietic cells after 7 days of coculture of fHSCs with the OP9 stroma cell line. Values shown correspond to mean \pm SD ($n = 9$). HSC, CD34⁺ CD38⁻ CD45RA⁻ CD71⁻ Lin⁻ cells. Abbreviations: EPCs, erythroid progenitor cells; FACS, fluorescence activated cell sorting; FSC, forward scatter; HSCs, hematopoietic stem cells; MNCs, mononuclear cells; MPCs, myeloid progenitor cells; TNC, total nucleated cells; UCB, umbilical cord blood.

24-well tissue culture plates at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ in air, at a concentration of $4\text{--}12 \times 10^4$ cells/ml/well. After 5 days of culture, cells were harvested from the wells, counted, and analyzed for progenitor cell content 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; CFCs) were assayed in methylcellulose-based semisolid cultures (MethoCult, STI), as previously described in detail [36].

Long-Term Culture-Initiating Cells

The numbers of more primitive (pre-CFC) cells, that is, those cells capable of initiating and sustaining long-term hematopoietic growth in culture, were determined right after each cell population was isolated. Such long-term culture initiating cells (LTC-ICs) were assessed based on the method established by Eaves and colleagues [39], as described previously by us [40].

Morphologic Analysis

Hematopoietic cell populations obtained from UCB, as well as cells obtained from liquid cultures, were examined on slide preparations stained with Wright-Giemsa stain. Approximately 300 cells per slide were scored, following standard morphology criteria.

Statistics

Results shown correspond to mean \pm SD of the indicated number of samples. Statistical analysis was performed by using ANOVA-test.

Microarrays and Gene Expression Analysis

The quality of the RNA obtained from the cells was evaluated by capillary electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer; Agilent Technologies). Only RNA samples with an RNA Integrity Number greater than 6 were further processed for microarray studies. One hundred picograms of RNA from each experimental condition were evaluated in the Gene Chip Human transcriptome Array (HTA) 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA). The cDNA synthesis, amplification, and gene expression profiling were done with WT Pico Reagent Kit for fresh samples (Affymetrix). Wash and stain

processes were performed with the GeneChip Hybridization wash and stain kit in the GeneChip Fluid Station 450 (Affymetrix). The probe arrays were scanned using the GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix). Array signal intensities were analyzed with the Affymetrix expression console. Raw data probes were normalized using Signal Space Transformation-Robust Multichip Analysis for the background correction and quantile algorithm. To define the differential expression profile within the different cell populations, Affymetrix Transcriptome Analysis Console (TAC) software was used. Genes with fold change >2 or <-2 and with an ANOVA p -value $<.05$ were considered significantly altered between the conditions (in vitro generated populations vs. freshly obtained populations). All data were uploaded in GEO (ID: GSE107497).

Enrichment Analysis

The Gene set enrichment analysis and Over-Representation Analysis (ORA) were made using GeneTrail2 (PMID: 26787660) [41]. Genes from TAC analysis with a fold-change >2 and <-2 , and ANOVA p -value $<.05$ were used for the ORA with the following parameters: a false discovery rate of 0.05, and two genes per category as minimum number for all analysis.

Real Time RT-PCR

To validate the microarray results, cDNA was generated using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific), from RNA of cells from three different UCB samples, following the manufacturer's protocol. Samples were different from those used for gene microarrays. The following genes were selected for qPCR validation: HSCs: CDC6, KCNQ5, RUNX3 and GBP4; MPCs: VCAN, CCNB1, KCNE3 and RUNX3; EPCs: CCNB1, KCNE3, PIEZO2 and SELP. Primers design and probes selection were made using Universal Probe Library System Assay designed by Roche for qPCR. Quantitative PCR experiments were performed in a Light Cycler 480 (Roche Life Science). Primers for each gene were synthesized at T4 Oligo Company. Fold change of gene expression was determined with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method using GAPDH as the housekeeping gene. Statistical analysis was performed using Student's t test. For sequence primer details see Supporting Information Table S1.

RESULTS

In Vitro Generation of HSCs, MPCs, and EPCs

We first assessed our culture conditions as experimental systems for the ex vivo generation of human hematopoietic stem and progenitor cells. Following our previous report [36], we generated HSCs in a coculture system in which fHSCs were plated on stromal cells of the OP9 cell line, and the culture medium was supplemented with a cytokine mixture that included TPO, SCF, FL, IL-3, IL-6, GM-CSF, and G-CSF. Cultures were initiated with 2.3×10^4 CD34⁺ CD38⁻ CD45RA⁻ CD71⁻ Lin⁻ cells. After 7 days of culture, 77.6×10^4 nucleated cells, in average, were generated, which represented a 33.7-fold increase in total cell number (Fig. 1C). Of those cells, 8.0% corresponded to CD34⁺ cells and 6.6% to CD34⁺ CD38⁻ cells, indicating a 2.6- and a 2.2-fold increase in the respective cell numbers (Fig. 1C). Interestingly, 26,400 cells (3% of the total cells generated in culture), in average, corresponded to CD34⁺ CD38⁻ CD45RA⁻ CD71⁻ Lin⁻ cells. This represented a 1.13-fold increase in cells with the HSC immunophenotype, as compared to day 0 (Fig. 1C).

In terms of the in vitro generation of myeloid and erythroid progenitors, it was not possible to determine the fold-increase of such cell populations based on their immunophenotype, since the cultures were initiated with CD34⁺ CD38⁻ CD45RA⁻ CD71⁻ Lin⁻ cells (HSC immunophenotype). However, we were able to determine the number of cells giving rise to myeloid and erythroid colonies, both before and after fHSC culture for generation of progenitor cells (as described in "Materials and Methods" section). After fHSCs were cultured for 10 days in liquid suspension cultures supplemented with TPO, FL, SCF, IL-3, and IL-6, a 6.5-fold expansion in erythroid CFC numbers was observed, whereas the numbers of myeloid CFCs were increased almost 64-fold (not shown). Taken together, the above data indicate that the culture conditions that we used in the present study favored the in vitro generation of HSCs, as well as that of myeloid and erythroid progenitors.

Each one of the cell populations analyzed in this study, including those freshly obtained from UCB units and those generated in vitro, was assessed in terms of both its functional integrity in vitro (i.e., LTC-IC and CFC content, proliferation, expansion, and differentiation potentials), as well as its gene expression profile.

In Vitro Assessment of HSCs

LTC-IC and CFC Content. As a first approach into the functional characterization of HSCs, we determined their content of LTC-ICs and CFCs. In the fHSC population, the frequency of LTC-IC corresponded to 1.85% (1 LTC-IC per 54 cells). This was a significant enrichment, considering that the frequency of LTC-IC in the MNC fraction was 1 per 9,506 cells, and in the Lin⁻ cell fraction, the frequency was 1 per 670 cells (not shown). In terms of CFCs, we found that 26.6% of CD34⁺ CD38⁻ CD45RA⁻ CD71⁻ Lin⁻ cells were capable of forming colonies in semisolid cultures (Fig. 2A). Out of those CFCs, 52% corresponded to myeloid CFCs (colonies containing granulocytes and/or macrophages), 46% corresponded to erythroid CFCs (colonies containing erythroid cells), and 2% corresponded to multipotent CFCs (colonies containing both myeloid and erythroid cells). When we analyzed ivHSCs, we found that the content of LTC-IC was 0.12% (1 LTC-IC per 825 cells), which was significantly reduced, as compared to fHSCs. The frequency of CFCs was 24.6%, which was very similar to that of fHSCs. Interestingly, 91% of the CFCs corresponded to myeloid progenitors, only 8% to their erythroid counterparts and 1% to multipotent progenitors (Fig. 2A). These numbers were very different to those observed for fHSCs.

HSC Growth in Liquid Suspension Cultures. We next assessed the proliferation, expansion and differentiation potentials of HSCs. As shown in Figure 2B, both fHSCs and ivHSCs showed similar proliferation patterns throughout the 20-day culture period, reaching their highest levels (99- and 72-fold increase, respectively) by day 20 of culture. On most of the time points analyzed, the total nucleated cell numbers were higher in cultures of fHSCs; however, such differences were not statistically significant. In terms of their expansion potentials (i.e., LTC-IC and CFC levels throughout the culture period), we observed that the absolute numbers of LTC-ICs in cultures of fHSCs were sustained throughout the culture period (Fig. 2C). In contrast, the levels of LTC-ICs in cultures of ivHSCs abruptly declined, so this type of cell was undetectable from day 5 of culture (Fig. 2C). In terms of progenitor cells, the levels of CFCs were always higher in cultures of fHSCs as compared to ivHSCs. Although such differences were not statistically significant, the tendency was clear (Fig. 2D). It is noteworthy that throughout the

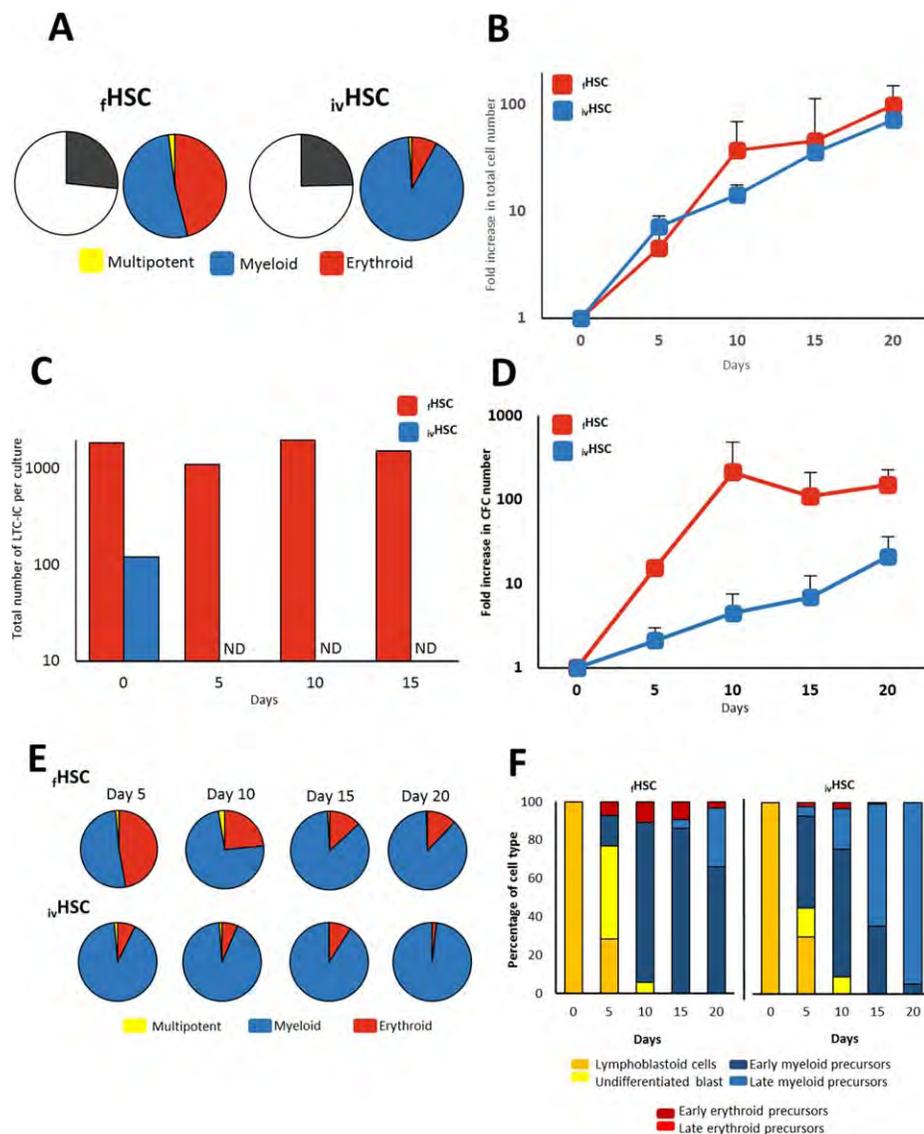


Figure 2. In vitro functional characterization of HSCs. **(A):** CFC content in the cell fractions corresponding to fHSCs and ivHSCs right after they were obtained by fluorescence activated cell sorting and before culture. Graphics represent the mean frequency (%; $n = 9$) of myeloid, erythroid, and multipotent progenitors. **(B):** Proliferation kinetics of fHSCs and ivHSCs throughout liquid culture. Values (mean \pm SD; $n = 5$) represent the increments in total nucleated cell number, as compared to day 0. **(C):** Kinetics of LTC-ICs throughout liquid culture. Values (means; $n = 5$) represent absolute cell numbers. ND, not detected. **(D):** Expansion kinetics of fHSCs and ivHSCs throughout liquid culture. Values (mean \pm SD; $n = 5$) represent the increments in CFC number, as compared to day 0. **(E):** Frequency of myeloid, erythroid, and multipotent progenitors (as percentage of total CFC; $n = 9$) throughout liquid cultures of fHSCs and ivHSCs. **(F):** Frequency (%) ($n = 3$) of the different hematopoietic cell types, recognized by their morphology, generated in cultures of fHSCs and ivHSCs. Abbreviations: CFCs, colony-forming cells; HSCs, hematopoietic stem cells; LTC-ICs, long-term culture initiating cells.

culture period there was a marked tendency toward the production of progenitors giving rise to colonies containing granulocytes and/or macrophages. Indeed, by day 20 of culture, myeloid CFCs corresponded to almost 90% of the CFCs in cultures of fHSCs, and to almost 100% of CFCs in cultures of ivHSCs (Fig. 2E). Erythroid progenitors became a minority, whereas multipotent progenitors were detected only in cultures of fHSCs, and at extremely low levels. In keeping with this observation, the differentiation patterns of both fresh and in vitro generated HSCs showed a marked tendency toward the production of myeloid precursors. Such a tendency seemed to be more pronounced in ivHSCs. As shown in Figure 2F, all of the cells observed on day 20 in cultures of ivHSCs consisted of myeloid precursors (the majority of them were late

precursors), whereas in cultures of fHSCs, a small proportion of early erythroid precursors was still observed on that same day. No late erythroid precursors were observed, most likely due to the absence of EPO in liquid cultures.

Global Gene Expression Profiles of HSCs. We next performed a global comparison of the gene expression profiles from both fresh and in vitro generated HSCs. By using Affymetrix Gene Chip HTA 2.0, we assessed the expression of over 18,000 genes and clearly observed significant differences in such profiles (Fig. 3A). We found 541 genes differentially expressed (Fig. 3B). Of these, 243 were upregulated in ivHSCs (including CDC6, BRIP1, TOP2A, KCNQ5, DNMT3B, and ANGPT1; Supporting Information Table S2)

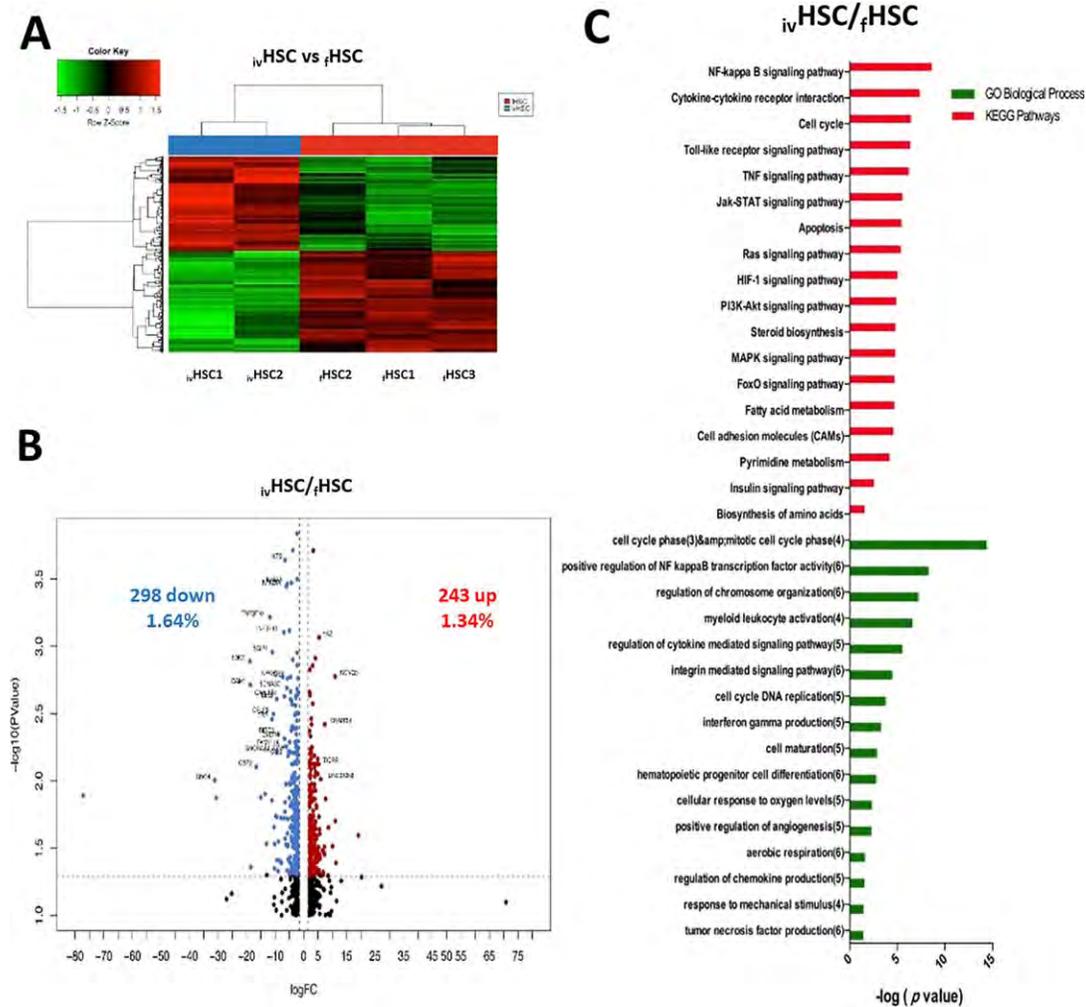


Figure 3. Differentially expressed genes between ivHSCs and fHSCs. **(A):** Hierarchical cluster showing the genes differentially expressed between ivHSCs and fHSCs. Samples are in columns, genes are in rows. Both cell populations were compared using the TAC Affymetrix software, considering a fold change of 2.0 and $p < .05$. **(B):** The volcano plot shows 541 genes differentially expressed (243 genes upregulated -red- and 298 downregulated -blue- in ivHSCs). The analysis was made using TAC Affymetrix software, considering a fold change of 2.0 and $p < .05$. **(C):** Most highly represented biologic processes/pathways that were upregulated in ivHSCs as compared to fHSCs. Functional annotation in Gene Ontology categories was made using GeneTrail2, and were classified in biological processes and KEGG categories. Abbreviation: HSCs, hematopoietic stem cells.

and 298 were downregulated (including IL1RL1, GNG4, ICAM1, SETBP1, GBP2, SMAD3, and CXCL8; Supporting Information Table S2). KEGG and GO analyses indicated that NF κ B, TNF, JAK-STAT, HIF, and PI3K-AKT signaling pathways were significantly upregulated in ivHSCs, and that cell cycle, apoptosis, leukocyte activation, myeloid differentiation, and chromatin remodeling were among the most upregulated biological processes/pathways (Fig. 3C). No pathways or processes were found to be downregulated at significant levels (not shown). In order to validate these results, we selected four genes (CDC6, KCNQ5, RUNX3, and GBP4) and quantitated their levels by qRT-PCR (Supporting Information Fig. S1).

In Vitro Assessment of MPCs

LTC-IC and CFC Content. Following a similar approach to the one used for HSCs, we determined the content of LTC-ICs and CFCs in the MPC population. LTC-ICs were not detected in any of the MPC populations analyzed (fresh or in vitro generated; not shown). This is in keeping with the fact that within the

hematopoietic hierarchy, LTC-IC corresponds to a cell stage earlier than the committed progenitor stage [39]. In terms of CFCs, we found that their frequencies were very similar in fresh and in in vitro generated MPCs (21.4% and 20.6% of the cells in each cell fraction, respectively; Fig. 4A). Among those CFCs, the vast majority (93%–99%) corresponded to cells producing colonies containing granulocytes and/or macrophages, and only 1%–7% corresponded to small erythroid colonies (Fig. 4A). No mixed colonies were observed. These results are also in keeping with the fact that MPCs correspond to a cell fraction enriched for myeloid progenitors.

MPC Growth in Liquid Suspension Cultures. The proliferation potentials of both MPCs were similar, reaching a 105- and 126-fold-increase in total cell number, respectively (Fig. 4B). From day 10 of culture, the levels of total cells remained relatively constant. In contrast to the kinetics of total cells, CFCs from fMPCs and ivMPCs showed very different kinetics (Fig. 4C). At all time points

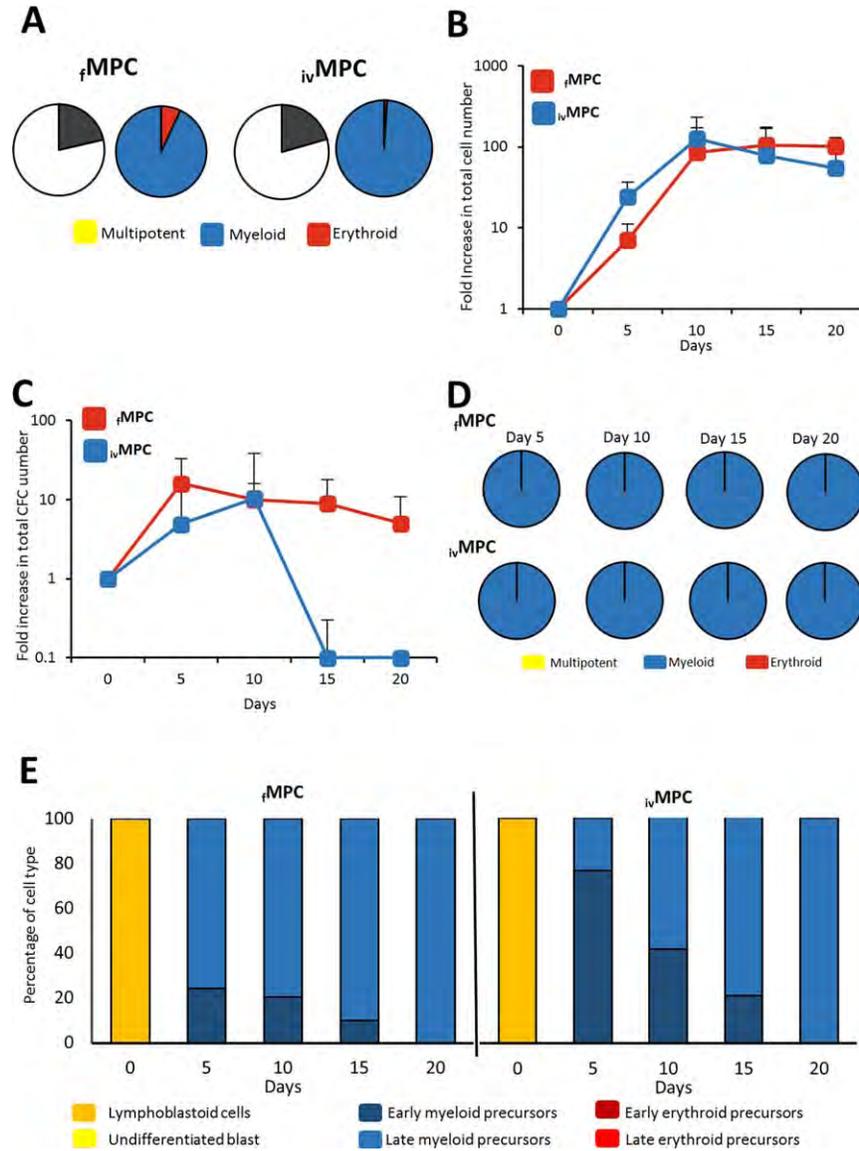


Figure 4. In vitro functional characterization of MPCs. **(A):** CFC content in the cell fractions corresponding to fMPCs and ivMPCs right after they were obtained by fluorescence activated cell sorting and before culture. Graphics represent the mean frequency (%; $n = 9$) of myeloid, erythroid, and multipotent progenitors. **(B):** Proliferation kinetics of fMPCs and ivMPCs throughout liquid culture. Values (mean \pm SD; $n = 5$) represent the increments in total nucleated cell number, as compared to day 0. **(C):** Expansion kinetics of fMPCs and ivMPCs throughout liquid culture. Values (mean \pm SD; $n = 5$) represent the increments in CFC number, as compared to day 0. **(D):** Frequency of myeloid, erythroid, and multipotent progenitors (as percentage of total CFC; $n = 9$) throughout liquid cultures of fMPCs and ivMPCs. **(E):** Frequency (%) of the different hematopoietic cell types, recognized by their morphology, generated in cultures of fMPCs and ivMPCs. Abbreviations: CFCs, colony-forming cells; HSCs, hematopoietic stem cells; MPCs, myeloid progenitor cells.

analyzed, except for day 10, CFC levels were higher in cultures of fMPCs; in fact, by day 15, CFC levels in ivMPCs were extremely low. It is noteworthy that from day 5 of culture, only colonies containing granulocytes and/or macrophages were observed; no erythroid or mixed colonies were detected (Fig. 4D). As shown in Figure 4E, at culture onset, MPCs consisted of lymphoblastoid cells; however, and in keeping with the fact that only granulocyte/macrophage colonies were present in culture, from day 5 of culture only myeloid precursors were observed.

Global Gene Expression Profiles of MPCs. When we compared the gene expression profiles of both fresh and in vitro generated MPCs (Fig. 5A), we found 1,086 genes differentially expressed

(Fig. 5B). Of these, 859 were upregulated in ivMPCs (including VCAN, MRC1, FGL2, ADAMDEC1, and RNASE6; Supporting Information Table S3) and 227 were downregulated (including SKIL, CCR7, MED12L, SETBP1, and CD38; Supporting Information Table S3). KEGG and GO analyses indicated that Lysosome, Phagosome, JAK-STAT, PI3K-AKT, Toll-like receptor signaling, and CAMs signaling pathways were significantly upregulated in ivMPCs, and that myeloid leukocyte migration, granulocyte chemotaxis, TNF family production, myeloid leukocyte-mediated immunity, and phagosome maturation were among the most upregulated biological processes (Fig. 5C). No pathways or processes were found to be downregulated at significant levels (not shown). In order to validate these results, we selected four genes (VCAN, CCNB1, KCNE3, and

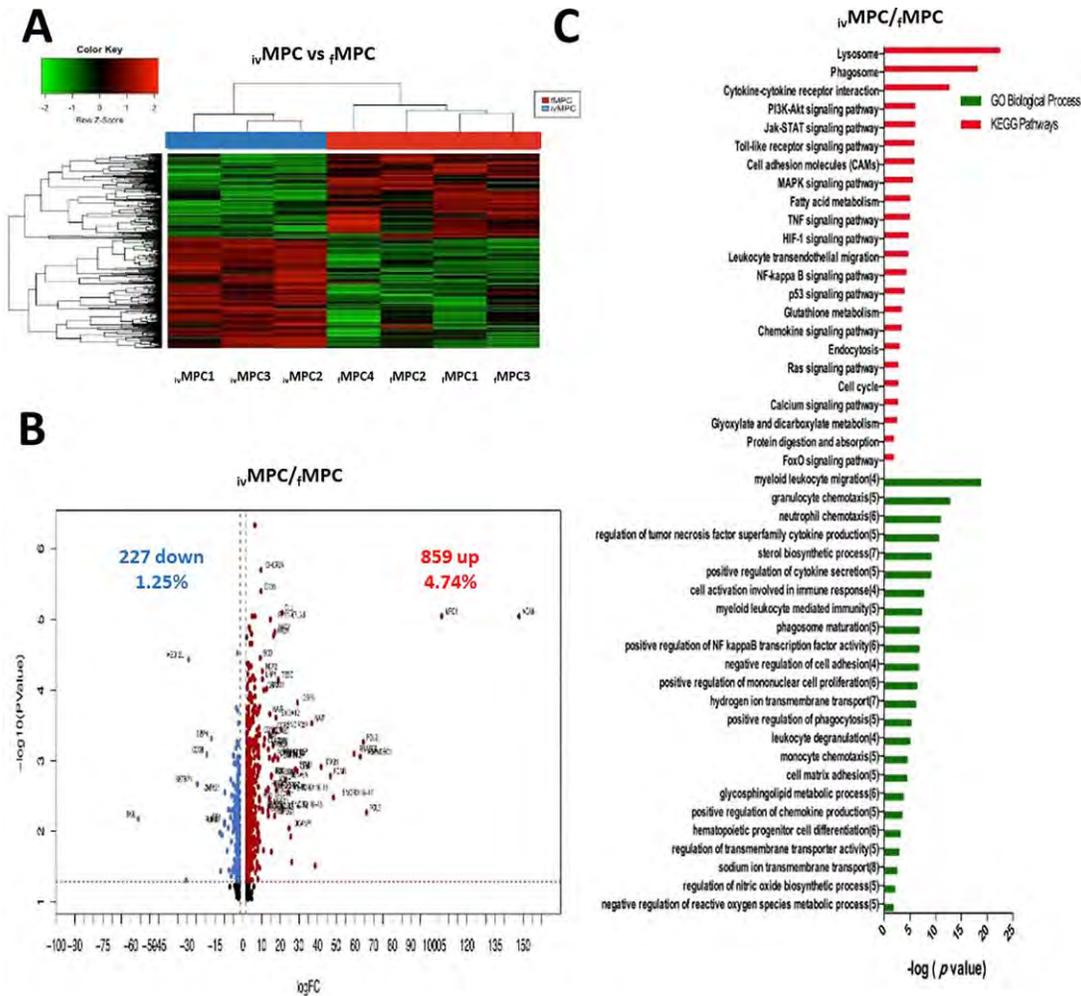


Figure 5. Differentially expressed genes between ivMPCs and fMPCs. **(A):** Hierarchical cluster showing the genes differentially expressed between ivMPCs and fMPCs. Samples are in columns, genes are in rows. Both cell populations were compared using the TAC Affymetrix software, considering a fold change of 2.0 and $p < .05$. **(B):** The volcano plot shows 1,086 genes differentially expressed (859 genes upregulated -red- and 227 downregulated -blue- in ivMPCs). The analysis was made using TAC Affymetrix software, considering a fold change of 2.0 and $p < .05$. **(C):** Most highly represented biologic processes/pathways that were upregulated in ivMPCs as compared to fMPCs. Functional annotation in Gene Ontology categories was made using GeneTrail2, and were classified in biological processes and KEGG categories. Abbreviation: MPCs, myeloid progenitor cells.

RUNX3) and quantitated their levels by qRT-PCR (Supporting Information Fig. S1).

In Vitro Assessment of EPCs

LTC-IC and CFC Content. As expected, we were unable to detect LTC-ICs in the EPC population (not shown), which is in keeping with the hierarchical organization of hematopoiesis and with the results obtained for MPCs. Thirty five percent of the cells in the fEPC fraction were capable of forming colonies in semisolid cultures and the vast majority (95%) corresponded to colonies containing exclusively erythroid cells (Fig. 6A). For ivEPCs, the levels of CFCs (24%) were lower than in fEPCs, and more than 95% of them also formed erythroid colonies (Fig. 6A). Myeloid colonies consisted of small granulocyte and/or macrophage clusters. No multipotent (mixed) colonies were detected.

EPC Growth in Liquid Suspension Cultures. Both fEPCs and ivEPCs showed very high proliferation potentials in liquid cultures, reaching higher levels of total cells than the ones observed for

HSCs or MPCs (Fig. 6B). The growth patterns were similar in both erythroid cell populations; however, it is noteworthy that on days 15 and 20 of culture, total nucleated cell numbers were much higher in cultures of fEPCs, although such differences were not statistically significant. In contrast, expansion kinetics were very different. Indeed, whereas a significant increase in CFCs was observed in cultures of fEPCs, particularly during the first 15 days of culture, there was no expansion in cultures of ivEPCs (Fig. 6C). From day 5 to day 20 of culture, only colonies containing erythroid cells were observed (no myeloid or mixed colonies were observed; Fig. 6D), and in keeping with this, from day 5 of culture only erythroid precursors were detected in culture (Fig. 6E). During the first days of culture the majority of the erythroid cells corresponded to early precursors (proerythroblasts and basophilic erythroblasts), whereas by day 20, the vast majority corresponded to late erythroblasts (polychromatic and orthochromatic erythroblasts).

Global Gene Expression Profiles of EPCs. We, then, compared the gene expression profiles of both fresh and in vitro generated

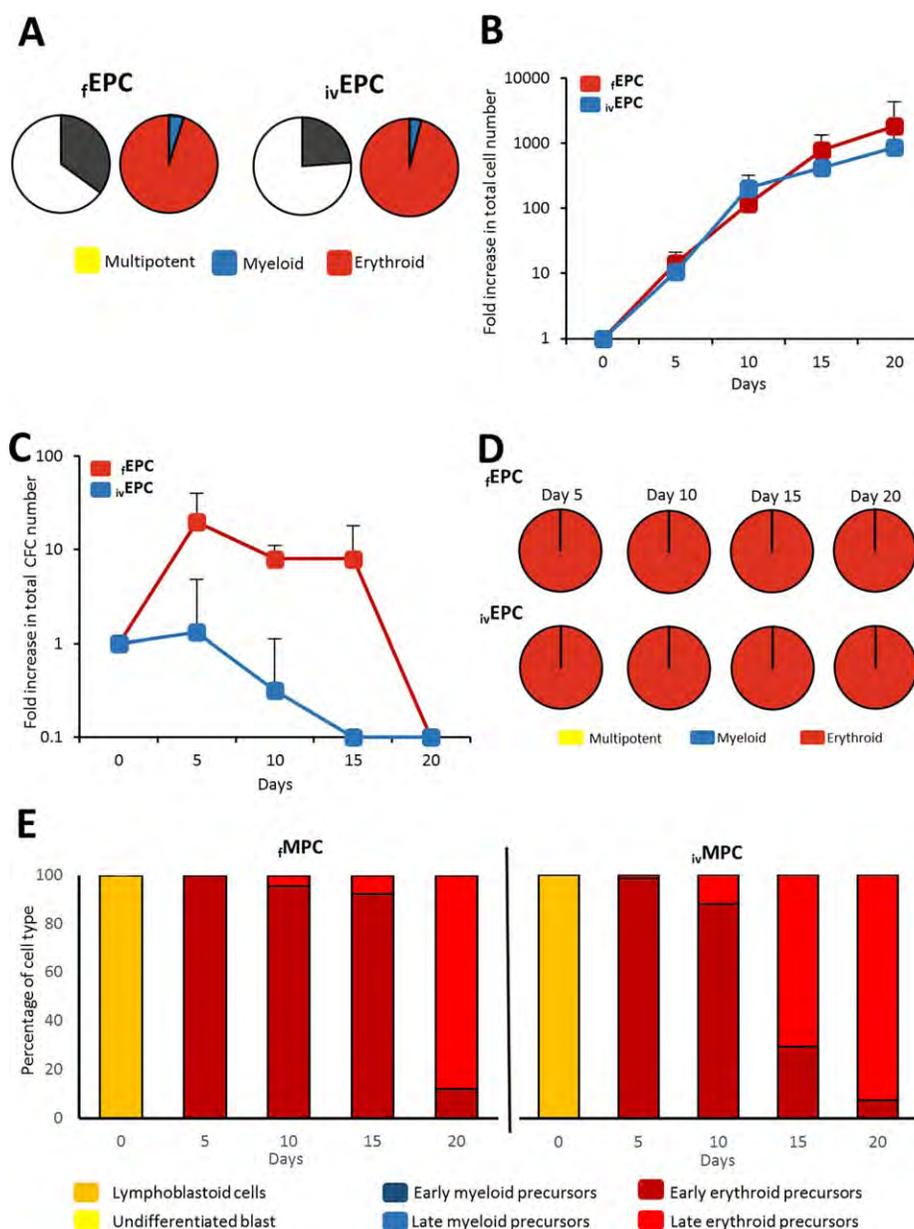


Figure 6. In vitro functional characterization of EPCs. **(A):** CFC content in the cell fractions corresponding to fEPCs and ivEPCs right after they were obtained by fluorescence activated cell sorting and before culture. Graphics represent the mean frequency (%; $n = 9$) of myeloid, erythroid, and multipotent progenitors. **(B):** Proliferation kinetics of fEPCs and ivEPCs throughout liquid culture. Values (mean \pm SD; $n = 5$) represent the increments in total nucleated cell number, as compared to day 0. **(C):** Expansion kinetics of fEPCs and ivEPCs throughout liquid culture. Values (mean \pm SD; $n = 5$) represent the increments in CFC number, as compared to day 0. **(D):** Frequency of myeloid, erythroid, and multipotent progenitors (as percentage of total CFC; $n = 9$) throughout liquid cultures of fEPCs and ivEPCs. **(E):** Frequency (%; $n = 3$) of the different hematopoietic cell types, recognized by their morphology, generated in cultures of fEPCs and ivEPCs. Abbreviations: CFCs, colony-forming cells; EPCs, erythroid progenitor cells; MPCs, myeloid progenitor cells.

EPCs (Fig. 7A), and found 438 genes differentially expressed (Fig. 7B). Of these, 196 were upregulated in ivEPCs (including SIGLEC6, EPX, PPBP, RAP27B, and HBBP1; Supporting Information Table S4) and 242 were downregulated (including GBP4, SKIL, THBS1, CRHBP, and CSF1; Supporting Information Table S4). KEGG and GO analyses indicated that PI3K-Akt, NF- κ B, Jak-STAT, chemokine signaling, and TNF signaling pathways were significantly upregulated in ivEPCs, and that sterol biosynthesis, cell matrix adhesion, cellular response to oxygen levels, negative regulation of cell growth, cell maturation, and several metabolic routes were among the

most upregulated biological processes (Fig. 7C). No pathways or processes were found to be downregulated at significant levels (not shown). In order to validate these results, we selected four genes (CCNB1, KCNE3, PIEZO2, and SELP) and quantitated their levels by qRT-PCR (Supporting Information Fig. S1).

DISCUSSION

Great interest on the ex vivo generation of primitive hematopoietic cells, including self-renewing stem cells and multipotent and

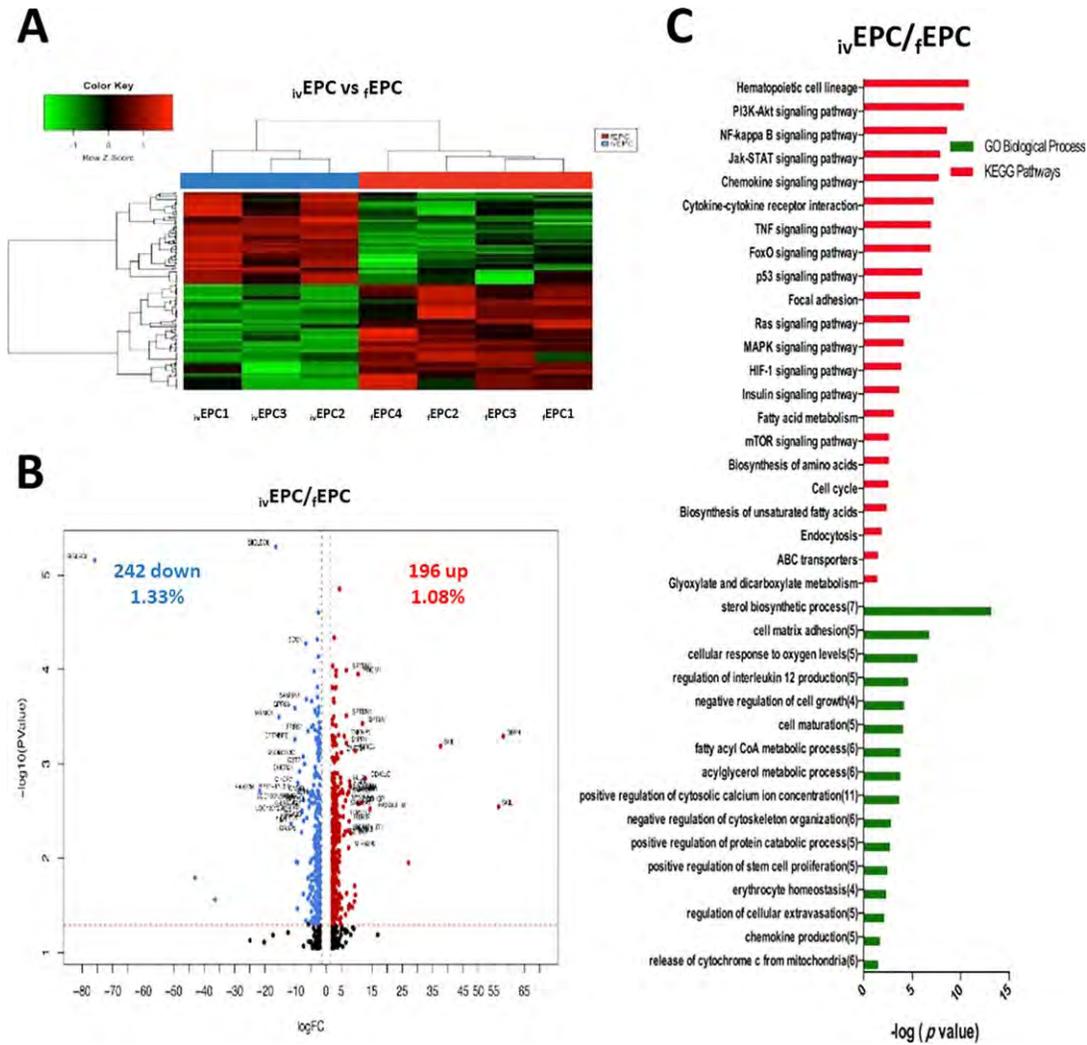


Figure 7. Differentially expressed genes between ivEPCs and fEPCs. **(A):** Hierarchical cluster showing the genes differentially expressed between ivEPCs and fEPCs. Samples are in columns, genes are in rows. Both cell populations were compared using the TAC Affymetrix software, considering a fold change of 2.0 and $p < .05$. **(B):** The volcano plot shows 438 genes differentially expressed (196 genes upregulated - red- and 242 downregulated -blue- in ivEPCs). The analysis was made using TAC Affymetrix software, considering a fold change of 2.0 and $p < .05$. **(C):** Most highly represented biologic processes/pathways that were upregulated in ivEPCs as compared to fEPCs. Functional annotation in Gene Ontology categories was made using GeneTrail2, and were classified in biological processes and KEGG categories. Abbreviation: EPCs, erythroid progenitor cells.

committed progenitors, has grown over the last few years, due to both biologic and clinical reasons. This is particularly true for UCB-derived HSCs and HPCs, since UCB transplantation has become a major therapeutic approach for a wide variety of hematologic diseases [2, 12]. In this regard, different culture systems and experimental approaches have been developed, and significant achievements have already been reported [19–28]. To date, however, it is still unclear to what extent those stem and progenitor cells generated in vitro retain the functional and genomic integrity of their freshly isolated counterparts. This yet unanswered question possesses both academic and practical implications. In trying to contribute to answering the above question, in the present study we obtained fresh human UCB units and isolated HSCs, MPCs, and EPCs. We, then, determined their content of LTC-ICs and CFCs, assessed their in vitro proliferation, expansion, and differentiation capacities under particular culture conditions, and determined their global gene expression profiles. Immunophenotypically

similar cell populations were generated in vitro, by using specific culture systems, and then were analyzed in the same manner. Thus, a comparative functional and genomic study of both fresh and in vitro generated cell populations was performed.

It has long been recognized that the in vitro growth of hematopoietic cells depends on the input cell population and the culture conditions used [20, 34]. Based on our previous report [36], in the present study, we generated HSCs by using a culture system in which fHSCs were cultured with the OP9 stromal cell line and the culture medium was supplemented with a combination of seven different early- and late-acting hematopoietic cytokines. In our previous report, the input cell population consisted of $CD34^+ CD38^- Lin^-$ cells, and we observed a >20 -fold increase in the number of such cells after culture. Herein, our input cell population consisted of $CD34^+ CD38^- CD45RA^- CD71^- Lin^-$ cells, and after the culture period, we did not observe a significant increase in such a cell number, but a maintenance. In contrast, we did observe a

significant increase in the levels of myeloid and erythroid CFCs. On the other hand, by culturing fHSCs in a stroma-free liquid culture system supplemented with five early-acting cytokines, we achieved the generation of significant numbers of CD34⁺ CD38⁺ CD45RA⁺ CD71⁻ Lin⁻ and CD34⁺ CD38⁺ CD45RA⁻ CD71⁺ Lin⁻ cells. Taken together, these results indicate that our culture systems were efficient in generating committed myeloid and EPCs and were able to sustain HSCs over input levels.

In spite of their identical immunophenotypes, it was clear that fresh and in vitro generated cells showed significant differences in terms of their biology. This was particularly evident for the HSC populations. Indeed, the frequency of LTC-ICs in the ivHSC population was significantly reduced, as compared to fHSCs, and their levels were undetectable after 5 days of culture, whereas LTC-IC levels in cultures of fHSCs were sustained throughout the culture period. It was also evident that whereas fHSCs showed a “balanced” frequency of myeloid and erythroid CFCs, the vast majority of the CFCs detected in the ivHSC population corresponded to myeloid progenitors. Work by different groups, including those of Muller-Sieburg and colleagues, Eaves and colleagues, and Suda and colleagues, has demonstrated that among murine HSCs, some clones are biased toward the production of myeloid cells, some are biased toward the production of lymphoid cells, whereas others show a balanced capacity toward the production of both myeloid and lymphoid cells [42–45]. Although the presence of such HSC subpopulations is less clear in humans, our results seem to suggest that whereas most of the HSCs obtained from fresh UCB units correspond to a balanced myeloid-erythroid subtype, the majority of the HSCs generated in our culture system are biased toward the myeloid lineage. Interestingly, and in keeping with previous reports [38], a marked tendency toward the myeloid lineage was observed once HSCs were put into culture, regardless of whether HSCs were fresh or generated in vitro.

In all three populations analyzed (i.e., HSCs, MPCs, and EPCs), both fresh and in vitro generated cells showed a similar proliferation capacity (ability to divide and produce new cells, regardless of their lineage and maturation stage). However, their expansion potentials (ability of primitive cells to divide and give rise to more primitive cells) were clearly different. Although the reason for this is not clear, one possibility is that there is an increased proliferation activity at the level of the precursor cells generated in vitro; thus, although the levels of CFCs in cultures of in vitro generated cells were reduced, as compared to their fresh counterparts, the total numbers of cells generated in culture were similar.

Global gene expression analysis of each one of the cell populations included in the present study also demonstrated significant differences between fresh and in vitro generated cells. The latter showed consistent increased expression of particular signaling pathways, such as JAK-STAT, PI3K-AKT, NFκB, and HIF-1, and processes such as cell cycle, apoptosis, and myeloid differentiation, which is in keeping with their proliferation, expansion, and differentiation patterns in culture. In a recent study by Papayannopoulos and colleagues, they observed that when CD34⁺ cells from adult mobilized peripheral blood were cultured for 7 days in the presence of a combination of recombinant cytokines and small molecules, those cells generated in culture that showed reduced expression of Rap-1, Ras, and PI3K-Akt showed a higher hematopoietic performance in vivo, as compared to those with a higher expression [46]. It is interesting that in the present study, in all cell populations generated after culture, the levels of PI3K-Akt were increased. This was, in fact, a consistent finding. So, this may be

one of the reasons for the reduced expansion potential of such cells, as compared to their fresh counterparts.

In the last few years, several groups have reported the use of small molecules, including UM171, OAC1, SR1, and Resveratrol, among others, that have been shown to favor the self-renewal activity of HSCs when used in combination with early-acting recombinant hematopoietic cytokines [27, 28, 31, 47, 48]. Indeed, evidence exists that a particular combination of small molecules and cytokines favors the expansion of CD34⁺ and CD34⁺CD38⁻ cells by enhancing the Notch pathway—which favors retention of stemness—and by inhibiting the Wnt pathway, which results in blocking of the differentiation process [49]. In the present study, we did not include any of those small molecules as part of the culture system. Thus, it would be interesting to include them in future studies and to perform similar analyses to the one described here.

It is noteworthy that in the present study, the functional integrity of the cells analyzed was assessed by using in vitro systems only; no in vivo systems were used. Thus, we are not certain as to the functional in vivo capacities of the fresh and in vitro generated cells included herein. It should also be considered that in the present study, our main criteria for the identification, selection, and purification of the different cell populations was their immunophenotype. And to this purpose, we followed well-defined, standard criteria. However, it has been shown that the relationship of stem cell immunophenotype and function is altered when primitive hematopoietic cells are cultured in serum-free liquid suspension cultures [33, 35, 50]. Thus, it is possible that when selecting the cell populations generated in vitro, we were gating-out cells that possess functional capacities related to HSCs and progenitor cells, but whose immunophenotypes do not correspond to those considered as standard phenotypes of HSCs and HPCs. This, of course, is a very important issue that should be taken into account when developing protocols for the ex vivo expansion of primitive hematopoietic cells.

In summary, in the present study we have selected and purified three different cell populations (HSCs, MPCs, and EPCs) obtained directly from fresh human UCB units or generated in vitro under specific culture conditions. We, then, compared their functional integrity in vitro and their gene expression profiles. Our results indicate that in spite of being immunophenotypically similar, fresh and in vitro generated cells showed significant differences, both in functional and genetic terms. In general, those HSCs generated in culture showed a deficient content of LTC-ICs, and a marked tendency toward the myeloid lineage. In addition, in vitro generated HSCs and HPCs showed limited expansion potentials. Such functional alterations correlated with changes in their gene expression profiles. Our results, however, need to be taken with caution, since in the present study we used a single ex vivo culture strategy (serum- and stroma-free liquid culture supplemented with different combinations of recombinant stimulatory cytokines). Thus, we are not certain as to the functional integrity and gene expression profiles of the same cell populations generated under different culture conditions (e.g., in the presence of stroma cells and/or small molecules such as UM171, OAC1, SR1, nicotinamide, and Resveratrol).

Nevertheless, our observations may have clinical implications in UCB transplantation. Indeed, in all clinical trials reported so far on the use of expanded cells for UCBT, such cells have been infused together with non-manipulated cells and in the vast majority of cases, it has been the latter the ones that remain long-term in patients. It is, thus, possible that, as suggested by the results of the present study, expanded cells do not retain the

complete functional and genomic integrity of non-manipulated cells, so that they are at disadvantage when competing under physiological conditions with their fresh counterparts.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Grant FIS/IMSS/PROT/PRI0/14/032 from the Mexican Institute of Social Security (IMSS) to H.M. Roberto Dircio-Maldonado was a doctoral student from *Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)* and he received fellowships from CONACYT (fellowship no. 445062) and from the Mexican Institute of Social Security (IMSS; fellowship no. 038–2012). We thank Luis Enrique Torres-Galeana and Ignacio Valencia-Plata for excellent technical assistance. We would also like to thank the staff at the Flow Cytometry Core Facility (*Coordinación de Investigación en Salud, IMSS*) for their technical assistance and support.

REFERENCES

- 1 Gluckman E. History of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2009;44:621–626.
- 2 Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE. Umbilical cord blood transplantation: The first 25 years and beyond. *Blood* 2013;122:491–498.
- 3 Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4109–4113.
- 4 Lansdorp PM, Dragowska W, Mayani H. Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J Exp Med* 1993;178:787–791.
- 5 Vormoor J, Lapidot T, Plumbo F et al. Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice. *Blood* 1994;83:2489–2497.
- 6 Mayani H. Biological differences between neonatal and adult human hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev* 2010;19:285–298.
- 7 Navarrete C, Contreras M. Cord blood banking: A historical perspective. *Br J Haematol* 2009;147:236–245.
- 8 Murphy A, McKenna D, McCullough J. Cord blood banking and quality issues. *Transfusion* 2016;56:645–652.
- 9 Mayani H. Umbilical Cord Blood: Lessons learned and lingering challenges after more than 20 years of basic and clinical research. *Arch Med Res* 2011;42:645–651.
- 10 Rocha V, Kabbara N, Ionescu I et al. Pediatric related and unrelated cord blood transplantation for malignant diseases. *Bone Marrow Transplant* 2009;44:653–659.
- 11 Ooi J. Cord blood transplantation in adults. *Bone Marrow Transplant* 2009;44:661–666.
- 12 Stanevsky A, Goldstein G, Nagler A. Umbilical cord blood transplantation: Pros, cons and beyond. *Blood Rev* 2009;23:199–204.
- 13 Kelly SS, Parmar S, de Lima M et al. Overcoming the barriers to umbilical cord blood transplantation. *Cytotherapy* 2010;12:121–130.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

R.D.-M.: conception and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval; P.F.-G.: data analysis and interpretation, final approval; J.C.-N., I.M.-G., and L.A.-P.: collection and assembly of data, final approval; A.H.-M.: financial support, data analysis and interpretation, final approval; F.O.B.-A. and A.C.-T.: collection and assembly of data, data analysis and interpretation, final approval; O.B.-O.: provision of study patients, final approval; H.M.: conception and design, financial support, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicated no potential conflicts of interest.

- 14 Delaney C, Ratajczak MZ, Laughlin M. Strategies to enhance umbilical cord blood engraftment in adult patients. *Expert Rev Hematol* 2010;3:273–283.
- 15 Brunstein CG, Setubal DC, Wagner JE. Expanding the role of umbilical cord blood transplantation. *Br J Haematol* 2007;137:20–35.
- 16 Haspel RL, Ballen KK. Double cord blood transplants: Filling a niche? *Stem Cell Rev* 2006;2:81–86.
- 17 Frassoni F, Gualandi F, Podesta M et al. Direct intrabone transplant of unrelated cord blood cells in acute leukaemia: A phase I/II study. *Lancet Oncol* 2008;9:831–839.
- 18 Brunstein CG, Barker JN, Weisdorf DJ et al. Intra BM-injection to enhance engraftment after myeloablative umbilical cord blood transplantation with two partially HLA-matched units. *Bone Marrow Transplant* 2009;43:935–940.
- 19 Dahlberg A, Delaney C, Bernstein ID. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 2011;117:6083–6090.
- 20 Flores-Guzmán P, Fernández-Sánchez V, Mayani H. Ex vivo expansion of cord blood-derived hematopoietic stem and progenitor cells: Basic principles, experimental approaches, and impact in regenerative medicine. *STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE* 2013;2:830–838.
- 21 Pineault N, Abu-Khader A. Advances in umbilical cord blood stem cell expansion and clinical translation. *Exp Hematol* 2015;43:498–513.
- 22 Baron F, Ruggeri A, Nagler A. Methods of ex vivo expansion of human cord blood cells: Challenges, successes, and clinical implications. *Expert Rev Hematol* 2016;9:297–314.
- 23 Peled T, Mandel J, Goudsmid RN 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;6:344–355.
- 24 Robinson SN, Ng J, Niu T et al. Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant* 2006;37:359–366.
- 25 Flores-Guzmán P, Flores-Figueroa E, Montesinos JJ et al. Individual and combined effects of mesenchymal stromal cells and

recombinant stimulatory cytokines on the in vitro growth of primitive hematopoietic cells from human umbilical cord blood. *Cytotherapy* 2009;11:886–896.

- 26 Boitano AE, Wang J, Romeo R et al. Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* 2010;329:1345–1348.
- 27 Fares I, Chagraoui J, Gareau Y et al. Cord blood expansion. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. *Science* 2014;345:1509–1512.
- 28 Huang X, Lee M-R, Cooper S et al. Activation of OCT4 enhances ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem and progenitor cells by regulating HOXB4 expression. *Leukemia* 2016;30:144–153.
- 29 Delaney C, Heimfeld S, Brashem-Stein C et al. Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat Med* 2010;16:232–236.
- 30 de Lima MR, McNiece I, Robinson SN et al. Cord blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. *N Engl J Med* 2012;367:2305–2315.
- 31 Wagner JE, Brunstein CG, Boitano AE et al. Phase I/II trial of StemRegenin-1 expanded umbilical cord blood hematopoietic stem cells supports testing as a stand-alone graft. *Cell Stem Cell* 2016;18:144–145.
- 32 Anand S, Thomas S, Hyslop T et al. Transplantation of ex vivo expanded umbilical cord blood (NiCord) decreases early infection and hospitalization. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017;23:1151–1157.
- 33 Dorrell C, Gan OI, Pereira DS et al. 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.
- 34 Douay L. Experimental culture conditions are critical for ex vivo expansion of hematopoietic cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2001;10:341–346.
- 35 McKenzie JL, Gan OI, Doedens M et al. Reversible cell surface expression of CD38 on CD34-positive human hematopoietic repopulating cells. *Exp Hematol* 2007;35:1429–1436.

36 Fernandez-Sanchez V, Pelayo R, Flores-Guzman P et al. In vitro effects of stromal cells expressing different levels of Jagged-1 and Delta-1 on the growth of primitive and intermediate CD34⁺ cell subsets from human cord blood. *Blood Cells Mol Dis* 2011;47:205–213.

37 Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* 2003;34:461–475.

38 Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM. Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34⁺ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood* 1993;82:2664–2672.

39 Miller CL, Eaves CJ. Long-term culture initiating-cell assays for human and murine cells. In: Klug CA, Jordan CT, eds. *Hematopoietic Stem Cell Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 2002:123–141.

40 Flores-Guzman P, Fernandez-Sanchez V, Valencia-Plata I et al. Comparative in vitro analysis of different hematopoietic cell populations from human cord blood: In search of

the best option for clinically oriented ex vivo cell expansion. *Transfusion* 2013;53:668–678.

41 Stöckel D, Kehl T, Trampert P et al. Multi-omics enrichment analysis using the GeneTrail2 web service. *Bioinformatics* 2016;32:1502–1508.

42 Muller-Sieburg CE, Cho RH, Karlsson L et al. Myeloid-biased hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished lymphoid progeny with impaired IL-7 responsiveness. *Blood* 2004;103:4111–4118.

43 Muller-Sieburg CE, Sieburg HB. The GOD of hematopoietic stem cells: A clonal diversity model of the stem cell compartment. *Cell Cycle* 2006;5:394–398.

44 Dykstra B, Kent D, Bowie M et al. Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo. *Cell Stem Cell* 2007;1:218–229.

45 Ema H, Morita Y, Suda T. Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2014;42:74–82.

46 Psatha N, Georgolopoulos G, Phelps S et al. Brief report: A differential transcriptomic

profile of ex vivo expanded adult human hematopoietic stem cells empowers them for engraftment better than their surface phenotype. *STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE* 2017;6:1852–1858.

47 Heinz N, Ehrnstrom B, Schambach A et al. Comparison of different cytokine conditions reveals resveratrol as a new molecule for ex vivo cultivation of cord blood-derived hematopoietic stem cells. *STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE* 2015;4:1064–1072.

48 Fares I, Chagraoui J, Lehnertz B et al. EPCR expression marks UM171-expanded CD34⁺ cord blood stem cells. *Blood* 2017;129:3344–3351.

49 Wang L, Guan X, Wang H et al. A small-molecule/cytokine combination enhances hematopoietic stem cell proliferation via inhibition of cell differentiation. *Stem Cell Res Ther* 2017;8:169.

50 Danet GH, Lee HW, Luongo JL et al. Dissociation between stem cell phenotype and NOD/SCID repopulating activity in human peripheral blood CD34⁺ cells after ex vivo expansion. *Exp Hematol* 2001;29:1465–1473.



See www.StemCellsTM.com for supporting information available online.