



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

**CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCALES
Y PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS HUMANAS DE SANGRE DE
CORDÓN UMBILICAL EN FUNCIÓN DE SU ESTADIO EN EL CICLO
CELULAR**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
MARÍA ANGÉLICA MUÑIZ RIVERA CAMBAS

DIRECTOR DE TESIS:
DR. HÉCTOR MAYANI VIVEROS
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ TUTOR:
DR. VIANNEY ORTÍZ NAVARRETE
FACULTAD DE MEDICINA
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD DE MÉXICO OCTUBRE DE 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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo brindado para la realización de este proyecto a:

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
(CONACYT) Número de becario: 262608

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
(IMSS) Número de becario: 031-2012/99096414

Del mismo modo agradezco al comité tutorial por su apoyo y sus valiosas aportaciones para poder llevar a cabo este trabajo:

DR. HÉCTOR MAYANI VIVEROS
DR. VIANNEY ORTÍZ NAVARRETE
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

RECONOCIMIENTOS

Agradezco al apoyo y enseñanzas teóricas y técnicas para la realización de este proyecto a:

Dra. María Antonieta Chávez

Dra. Odett Balvanera

Dra. Lourdes Arriaga Pizano

Biol. Luis Enrique Torres Galeana

Técnico Laboratorista Ignacio Valencia Plata

De manera especial agradezco a mi maestro y tutor el Dr. Héctor Mayani por su apoyo brindado a lo largo de este trabajo, por sus enseñanzas, por impulsarme y motivarme.

Agradezco a la Dra. Patricia Flores, por ser la cotutora extraoficial para la realización de este trabajo, por sus enseñanzas y por su amistad.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, Roberto Muñiz Garibay y Patricia Rivera Cambas Alvarado, por ser los pilares que me han impulsado a llegar tan lejos y seguirlo haciendo, por su apoyo y por siempre estar presentes.

Agradezco el apoyo y el cariño de mi familia, mis hermanos, mi cuñada y mis dos hermosas sobrinas Stephanie y Michelle.

Agradezco también de forma especial a mi familia extendida, mis amigos que a través del tiempo siguen caminando junto a mí, me han apoyado y me han enseñado tantas cosas que se han quedado en mi corazón por siempre. Algunos de ellos me han acompañado desde hace lustros, otros de forma más reciente: Nané, Dinorah, Gio, Karen, Andrea, Pau, Vianey, Oli, Ady, y todos aquellos que de algún modo han dejado una luz en mi vida. Gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
1.MARCO TEORÍCO	7
HEMATOPOYESIS Y SU CÉLULA TRONCAL Y PROGENITORA.....	7
MIELOPOYESIS Y ERITROPOYESIS	10
FUENTES DE CÉLULAS TRONCALES Y PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS	11
CICLO CELULAR	13
REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR EN LA HEMATOPOYESIS	15
EMPLEO DE CITOCINAS PARA LA DIFERENCIACIÓN HEMATOPOYÉTICA	16
HIDROXIUREA.....	18
2. ANTECEDENTES	21
CICLO CELULAR Y SU INFLUENCIA EN LA DIFERENCIACIÓN.....	21
PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN.....	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	25
1. General.....	25
2. Particulares	25
METODOLOGÍA.....	26
1. Criterios de inclusión y exclusión de las muestras de SCU.....	26
2. Aislamiento de las células mononucleares.....	27
3. Aislamiento de la población CD34+.....	28
4. Tratamiento con hidroxurea.....	29
5. Protocolos de cultivo	30
6. Ensayos de colonias	30
7. Morfología	32
8. Citometría.....	33
9. Medición del ciclo celular.....	34
10. Separación de las poblaciones por su estado en el ciclo.....	35
11. Estadística.....	35
RESULTADOS	37

1. Cantidad de células y de unidades formadoras de colonias al día cero	37
2. Efecto de la hidroxiurea en la cantidad y tipo de unidades formadoras de colonias 39	
3. Proporción de las distintas fases del ciclo celular antes y después de la hidroxiurea y a lo largo del cultivo.....	42
4. Cinéticas de proliferación	46
5. Cinética de expansión de progenitores	50
6. Morfología	54
7. Tipos de colonias formadas.....	56
8. Cinética de proliferación de las células separadas por su fase de ciclo celular ..	61
9. Citometría de flujo	63
DISCUSIÓN	68
CONCLUSIONES.....	72
PERSPECTIVAS.....	73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

Caracterización biológica *in vitro* de células troncales y progenitoras hematopoyéticas humanas de sangre de cordón umbilical en función de su estadio en el ciclo celular

RESUMEN

Las células hematopoyéticas primitivas (que incluyen a las células progenitoras y troncales), tienen la habilidad para proliferar y diferenciarse dependiendo de la predisposición intrínseca y los estímulos externos. Sin embargo, aún no es claro a qué grado están influenciadas estas funciones por el estado del ciclo celular. En este estudio nos preguntamos; si hay diferencias fisiológicas entre las células en diferentes etapas del ciclo celular, en términos de su habilidad para proliferar y sus tendencias de diferenciación. Para ello, se utilizaron muestras de sangre de cordón umbilical, se aislaron las fracciones celulares enriquecidas para células primitivas ($CD34^+ Lin^-$), se enriquecieron por sus fases G0/G1 con el tratamiento con hidroxiurea y se cultivaron en condiciones eritroides, mieloides y mixta (eritroide + mieloides). Se encontró que el tratamiento con hidroxiurea enriquece a los progenitores eritroides. De forma interesante, estas células tuvieron una mayor capacidad de proliferación en condiciones mieloides que aquellas células no tratadas. Después de ocho días de cultivo, las células tratadas dieron lugar a progenitores tanto mieloides como eritroides mientras que las no tratadas dieron lugar principalmente a progenitores mieloides. Posteriormente se separaron las células por su estado del ciclo en dos grupos: G0/G2 y G2/M utilizando la tinción de Vybrant Dye Cycle. Se encontró que las células en G0/G1, cultivadas en las mismas condiciones, tuvieron un comportamiento similar a las tratadas con hidroxiurea, sin embargo, las células en G2/M generaron una mayor proporción de células eritroides. Concluimos que la población en G0/G1 aislada por cualquiera de los dos métodos, tiene la habilidad para diferenciarse a ambos linajes, mientras que la población G2/M tiene una tendencia más fuerte a la diferenciación eritroide. Además, hay una diferencia importante en la tendencia de diferenciación de cada población cultivada por separado o en su conjunto, en este último caso, el linaje mieloides se ve favorecido.

INTRODUCCIÓN

1.MARCO TEORÍCO

HEMATOPOYESIS Y SU CÉLULA TRONCAL Y PROGENITORA

La hematopoyesis es el proceso que se realiza en la médula ósea, que permite la formación de las células de la sangre y su recambio diario. Mediante este proceso, diariamente se producen alrededor de 2×10^{11} eritrocitos, 2×10^{11} plaquetas y 7×10^{10} granulocitos (Mayani H. et al. 2007). Diferentes células son responsables de esta formación y recambio celular, pero la célula inicial, a partir de la cual el proceso de formación de células sanguíneas se lleva a cabo de forma completa es la célula troncal hematopoyética, que constituye una población pequeña que representa solamente el 0.005% del total de células existentes en la médula ósea (Mayani H. 2003).

La célula troncal hematopoyética se describió gracias al trabajo original de Till y McCulloch (J.E. Till, E. A. McCulloch, L. Siminovich, 1963), en donde ratones trasplantados con células provenientes de médula ósea presentaban la formación de colonias en el bazo. Estas colonias al ser retomadas y retrasplantadas, podían seguir siendo efectivas para reconstituir la hematopoyesis. Más aún, había una relación lineal entre el número de células trasplantadas y el número de colonias en el bazo, sugiriendo la existencia de una población más pequeña dentro de esas células trasplantadas capaces cada una de formar una colonia completa con todos los linajes hematopoyéticos contenidos en ella.

En la actualidad se sabe que la médula ósea no es el único sitio que alberga células troncales, sino que otros sitios las contienen y de manera teórica todos los órganos poseen este tipo de células, así, ¿Qué distingue a una célula troncal del resto de las células? Las células troncales poseen dos características principales: la multipotencialidad, es decir la capacidad de generar a los diferentes linajes celulares pertenecientes al mismo tejido u órgano, y la capacidad de autorenovación, es decir que, al dividirse, además de formar células en diferenciación, también es capaz de formar otra

célula igual a la original, con la misma capacidad de multipotencia (Marín Llera Jessica, Chimal Monroy Jesús. 2017).

Una característica que se puede agregar a las dos anteriores, es la capacidad de permanecer en quiescencia por periodos mayores que las células en diferenciación, lo que permite que la población de células troncales no se agote y al mismo tiempo la protege de daño al ADN, que al presentarse en una célula con las capacidades que esta presenta, puede degenerar en cáncer (Marín Llera Jessica, Chimal Monroy Jesús. 2017).

La célula troncal hematopoyética se caracteriza por un inmunofenotipo con la combinación de diferentes marcadores, entre los cuales podemos encontrar: CD34, CD90, CD117, CD133 y la ausencia de otros como: CD38, y marcadores de linaje, es decir de células hematopoyéticas ya comprometidas o completamente diferenciadas como: CD3 (marcador de linfocitos T), CD4 (linfocitos T cooperadores), CD8 (linfocitos T citotóxicos), CD19 (linfocitos B), CD20 (linfocitos B), CD33 (granulocitos), CD71 (eritrocitos), glicoforina A (eritrocitos), entre otros (Mayani H. *et al.* 2007).

Al dividirse, una célula troncal puede generar a otra célula troncal (auto renovación) o a una célula diferente, perteneciente al compartimento de las células progenitoras, que ya no pueden auto renovarse y a medida que van proliferando, van perdiendo multipotencia, dando lugar así a célula oligopotentes, bipotentes y finalmente monopotentes, generando linajes celulares cada vez más comprometidos hasta finalmente especificarse a uno solo (Mayani H. *et al.* 2007) (Figura 1). En el sistema hematopoyético, estas células presentan su ciclo celular de forma mucho más frecuente que las troncales, lo cual permite la formación rápida de células hematopoyéticas nuevas en las cantidades mencionadas con anterioridad (Mayani H. 2003).

Así, la población de células progenitoras es la más heterogénea y las primeras en formarse son las pertenecientes a la población de progenitoras multipotentes (PMP o MPP por sus siglas en inglés), Se ha observado que las MPP tienen cierta heterogeneidad a medida que van perdiendo dicha multipotencia, produciendo así los MPP1, MPP2, MPP3 y MPP4, que se distinguen por tener tendencia a diferenciarse hacia un linaje mieloide o uno linfoide o ambos, lo que indica que el compromiso a nivel de esta célula puede ser posible (Pietras E.M. *et al.* 2015).

Las poblaciones de progenitores oligopotenciales, los que surgen de los MPPs, son los progenitores linfoides comunes (PLC o CLPs por sus siglas en inglés), los progenitores mieloides comunes (PMC o CMPs por sus siglas en inglés), los progenitores eritroides megacariocíticos (PEM o MEPs por sus siglas en inglés), los progenitores de granulocitos y monocitos (PGM o GMPs por sus siglas en inglés), y los progenitores de macrófagos y células dendríticas (PMD o MDPs por sus siglas en inglés) (Pelayo R y Vadillo E. 2011) (Figura 1).

Una vez comprometidos los progenitores dan lugar al tercer compartimento, el de las células precursoras, las cuales ya no pueden diferenciarse a un linaje diferente y simplemente llevan a cabo su proceso de maduración para formar el cuarto y último compartimento, perteneciente al de las células maduras (Pelayo R y Vadillo E. 2011).

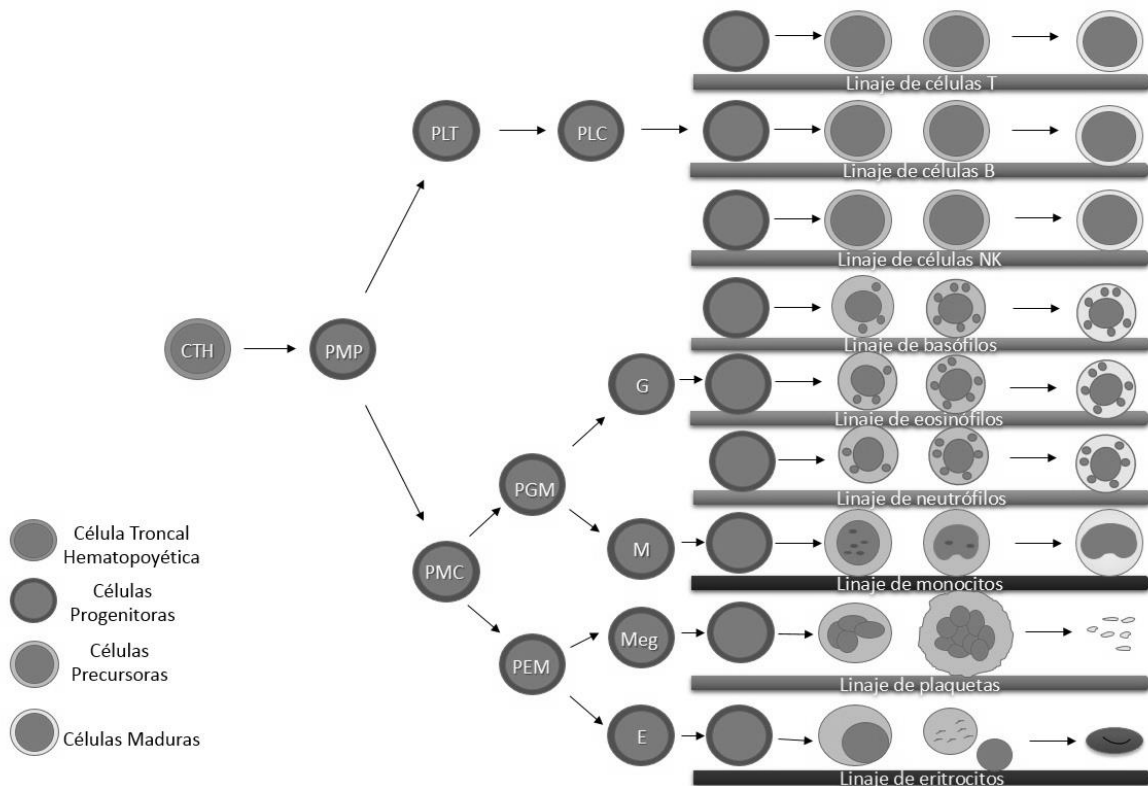


Figura 1 Esquema de la hematopoyesis. CTH: Célula troncal hematopoyética. PMP: Progenitor multipotente o MPP. PLT: Progenitor linfóide temprano o ELP. PLC: Progenitor Linfóide común o CLP. PMC: Progenitor mieloide común o MCP. PGM: Progenitor granulomonocítico o GMP. PEM: Progenitor eritroide megacariocítico o EMP. G: progenitor de granulocitos. M: progenitor de monocitos. Meg: Progenitor de megacariocitos. E: progenitor de eritrocitos (Modificado de Mayani H. 2003).

MIELOPOYESIS Y ERITROPOYESIS

Dentro de la mielopoyesis encontramos múltiples procesos: la formación de monocitos o monopoyesis, la formación de plaquetas o trombopoyesis y la formación de granulocitos o granulopoyesis.

En el proceso de monopoyesis, el progenitor granulomonocítico (PGM o GMP) se diferencia hacia el progenitor de los monocitos y este a su vez se diferencia a los precursores en la secuencia: monoblasto, promonocito, monocito y macrófago (Cediel J.F. et al. 2009). Esta última célula se forma una vez que llega al tejido de especialización, tomando características acordes al lugar al que llega. Así tenemos por ejemplo las células de Langerhans en la piel, los osteoclastos en el hueso, las células de Kupffer en el hígado, la microglía en el sistema nervioso, etcétera, todos ellos de origen monocítico (Ross MH, Pawlina W. 2007).

En la granulopoyesis partimos del mismo progenitor GMP para luego diferenciarse al progenitor de granulocitos, este dará lugar a los precursores mieloblasto, promielocito, mielocito, metamielocito y bandas, que finalmente formará los tres tipos de granulocitos maduros: neutrófilos, basófilos y eosinófilos. Desde la etapa temprana, del promielocito, se empiezan a ver gránulos azurófilos (primarios) en el citoplasma, estos son sustituidos por gránulos específicos en los mielocitos, desde esta etapa empieza el compromiso hacia alguno de los tres tipos de granulocitos y de hecho ya es posible distinguirlos en la etapa del metamielocito (Ross MH, Pawlina W. 2007).

La trombopoyesis es el proceso de formación de los megacariocitos y finalmente de las plaquetas. El progenitor de megacariocitos, que parte del progenitor común entre eritrocitos y megacariocitos (PEM), pasa por una etapa proliferativa primero en donde sólo se divide el núcleo y no el citoplasma, generando así las etapas de precursores hacia la maduración megacarioblasto y protomegacariocito, en este último se da la maduración de los organelos en el citoplasma. Finalmente se forma el megacariocito y de este se fragmenta el citoplasma para formar a las plaquetas, las cuales se encargan de la coagulación de la sangre (Gal I.B. et al. 2007).

Por otro lado, la eritropoyesis es el proceso de formación de los eritrocitos, los cuales tienen como función el transporte de oxígeno por el organismo. Las distintas etapas de precursores a partir del progenitor eritroide son: proeritroblasto, eritroblasto, normoblasto (en esta etapa el núcleo empieza a descentralizarse), reticulocito (etapa en la que el núcleo es expulsado) y finalmente se forma el eritrocito cuando todos los RNAs mensajeros del reticulocito para la hemoglobina son traducidos (Rodak FB. 2005).

FUENTES DE CÉLULAS TRONCALES Y PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS

Existen tres fuentes principales a través de las cuales se pueden obtener células troncales y progenitoras hematopoyéticas: la médula ósea, la sangre periférica movilizada y la sangre de cordón umbilical (Bojanic I. *et al.* 2009).

La primera fuente de células troncales utilizada en la clínica fue la médula ósea, en ella, como se mencionó anteriormente, se localizan las células primitivas de manera normal y se lleva a cabo la hematopoyesis. Para su extracción el donador debe estar bajo anestesia general y el procedimiento incluye múltiples aspirados de los huesos de la cresta ilíaca, haciendo este proceso bastante invasivo (Bojanic I. *et al.* 2009).

Una alternativa menos invasiva a esta fuente es utilizar sangre periférica movilizada. Al donador se le administra factor estimulante de colonias de granulocitos G-CSF, y factor estimulante de colonias de granulo-monocitos GM-CSF o algún otro medicamento como Plerixafor. Los primeros dos inducen a los granulocitos a romper el eje CXCR4-CXCL12 y el último rompe este eje de forma directa, permitiendo en cualquier caso que las células primitivas, que permanecen unidas a sus nichos dentro de la médula ósea mediante este eje principalmente, salgan a circulación (Mohty M y Ho AD. 2011).

Es de notar que el obtener células troncales de médula ósea y de sangre periférica movilizada, tienen desventajas tanto clínicas como biológicas. A nivel clínico, al necesitarse un donador y un paso del mismo por procedimientos quirúrgicos o químicos, hay menos disponibilidad de estas fuentes, por otro lado, el grado de coincidencia de las moléculas HLA tiene que ser al menos de 9 de 10 para que sea compatible con el

paciente o receptor y finalmente, estas dos fuentes tienen un alto riesgo de causar enfermedad injerto contra hospedero, en la cual, las células trasplantadas reaccionan inmunológicamente contra el receptor (Julia A. Brown, Vassiliki A. Boussiotis, 2008).

La tercera fuente de células troncales, alternativa a las dos primeras, es la sangre de cordón umbilical, la cual se comenzó a utilizar en 1988 cuando el Dr. Hal E. Broxmeyer caracterizó el uso de estas células para la clínica en un paciente con anemia de Fanconi (Gluckman E, *et al.* 1989). Esta fuente ha demostrado tener diversas ventajas: a nivel clínico, no hay riesgo para el donador, ya que hay más compatibilidad debido a que es suficiente con que 4 de 6 moléculas HLA coincidan, razón por la que el riesgo de presentar enfermedad injerto contra hospedero es menor. Por otro lado, hay una mayor disponibilidad de muestras de sangre de cordón umbilical, debido a que es fácil de obtener (Julia A. Brown, Vassiliki A. Boussiotis, 2008).

Por otra parte, a nivel biológico, también se han observado diversas ventajas de esta fuente de células troncales sobre médula ósea y sangre periférica movilizada. En cultivos en presencia de citocinas que estimulan la hematopoyesis, las células de la sangre de cordón umbilical no solo proliferan más rápido, sino que tienen una mejor expansión de las células CD34+ que como ya se comentó anteriormente es un marcador de células primitivas. Así mismo, al observar a las colonias que forman los progenitores, hay mayor cantidad de colonias mixtas, es decir, con la capacidad de formar tanto células del linaje mieloide como del eritroide, lo que significa que hay una mayor proporción de células más primitivas que en las fuentes adultas (Mayani H. 2010).

La desventaja que tiene esta fuente de células troncales es que en comparación con las primeras dos, presenta una cantidad de células mucho menor, por lo que actualmente se utiliza principalmente en niños, dado que su peso y estatura son menores. Sin embargo, diferentes estrategias se utilizan para contrarrestar este problema, como el uso de más de una unidad de sangre de cordón umbilical o la expansión de las células en cultivo *in vitro* mediante diferentes estrategias como el uso de diversas citocinas o pequeñas moléculas o la modificación genética de las células (Pineault N y Khader AA. 2015).

CICLO CELULAR

El ciclo celular un conjunto altamente ordenado de sucesos que conducen al crecimiento de la célula y a su división, dando como resultado dos células hijas. El ciclo consiste en diversas fases que se pueden dividir *grosso modo* en dos: interfase y mitosis (Welsch U, Sobotta J. 2008). Dentro de la interfase existen cuatro fases:

Fase G0: esta es una fase que propiamente no está dentro del ciclo celular, pues es el estado en que la célula no se está dividiendo, el estado de quiescencia (Welsch U, Sobotta J. 2008).

Fase G1: En esta fase la célula comienza el ciclo de división, en ella la célula se prepara para la duplicación del material genético, mediante la producción de proteínas que permitirán que se lleve a cabo este proceso. Además empiezan a sintetizarse y activarse las primeras cinasas y ciclinas, particularmente la ciclina D y la cinasa cdk4/6 (Alberts B, Bray D. 2006). Se reciben señales del entorno e internas y el tiempo en que la célula permanece en esta fase depende de cada tipo celular y es muy variable. Esta es la fase más larga del ciclo (Welsch U, Sobotta J. 2008).

Dentro de esta fase encontramos el punto de control más importante porque es el punto de no retorno, conocido como el punto R. Este punto se caracteriza por una revisión del material genético, en el que si hay alteraciones se trata de reparar, sin embargo, si no ocurre la reparación, la célula puede ser inducida a entrar en apoptosis. Por otro lado, es de notar que si las condiciones del medio son propicias con relación a la cantidad de nutrientes, para que se complete el ciclo, este se llevará a cabo, si no hay la cantidad de nutrientes suficiente, la división y el crecimiento celular se detendrán. Si la célula no pasa el punto R, regresará a la Fase G0 (Alberts B, Bray D. 2006).

Fase S: Este es el intervalo en el que se divide el material genético de la célula. La doble hélice original de ADN se abre a nivel de sus puentes de hidrógeno y se genera una copia de cada hebra con ayuda de la enzima ADN polimerasa y otras proteínas accesorias como la helicasa y la ligasa que permiten la correcta replicación del ADN. Una vez en esta fase, la célula ya no puede regresar y la división celular se completará.

Se activa primero la ciclina E y se une a su cinasa cdk2 y posteriormente la ciclina A que se une a la misma cinasa (Alberts B, Bray D. 2006).

Fase G2: Existe un segundo punto de control en esta fase, en el cual se revisan los errores que pudieran existir en la nueva copia de ADN y se corrigen, si esto no es posible, la célula entra en apoptosis (Welsch U, Sobotta J. 2008). La ciclina A se une a la cdk1 o cdc2 y al final de esta fase la ciclina B se une a cdk1 (Alberts B, Bray D. 2006).

Mitosis: Esta ya no forma parte de la interfase y es la etapa en la que los cromosomas duplicados se alinean, se separan y finalmente la célula se divide. La fase de mitosis se divide a su vez en principalmente cuatro etapas: Profase, Metafase, Anafase y Telofase. En la primera, la envoltura nuclear desaparece y el ADN se condensa en cromosomas; en la segunda, los cromosomas se alinean en el plano ecuatorial de la célula y los microtúbulos forman el huso mitótico para afianzar a cada cromosoma de su centrómero, en la anafase los cromosomas son transportados por el huso mitótico mediante el acortamiento de los microtúbulos, hacia los extremos de la célula; y en la última fase, en la telofase, se vuelve a formar la membrana nuclear alrededor de cada juego cromosómico. Finalmente, en la Citocinesis la célula se divide en dos por la formación de un anillo de actina que se cierra desde la membrana celular (Lodish H. 2005).

Hay un punto de control en la Anafase, en el cual se revisa que cada juego cromosómico tenga la misma cantidad de cromosomas y que no haya más de uno del mismo tipo (Alberts B, Bray D. 2006).

Durante este proceso se lleva a cabo la fosforilación y desfosforilación de distintas proteínas que van dando lugar al avance en el ciclo. Las principales causantes de estos procesos son las previamente mencionadas cdks o cinasas dependientes de ciclinas, que como su nombre lo indica, su función es fosforilar otras proteínas y son activadas únicamente cuando se unen a su respectiva ciclina. Las cinasas están presentes todo el tiempo en el ciclo, pero las ciclinas se transcriben únicamente en la etapa que les corresponde para activar a su respectiva cinasa, es decir su aparición es cíclica, de ahí su nombre (Lodish H. 2005).

Uno de los blancos de fosforilación de las estas cinasas es pRb cuya función es mantener inactivo el factor de transcripción E2F y a medida que se va fosforilando, se libera cada vez mayor cantidad de E2F de tal forma que se transcriben genes específicos de cada fase de ciclo, incluyendo a las ciclinas subsecuentes, entonces a mayor concentración de E2F, mayor probabilidad de transcribir los genes de las fases más tardías, es así como el ciclo va avanzando (Pietras EM. *et al.* 2011).

REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR EN LA HEMATOPOYESIS

Las células troncales hematopoyéticas requieren tener un balance entre la quiescencia y la proliferación para permitir la homeostasis de la hematopoyesis en la médula ósea, por lo que la regulación del ciclo juega un papel importante dentro de este proceso tanto en la etapa fetal como en la etapa adulta (Pietras EM. *et al.* 2011).

El comportamiento del ciclo celular de las células hematopoyéticas, particularmente de las troncales, es diferente en la etapa adulta que en la etapa embrionaria; en la primera solemos encontrar a las células troncales en quiescencia principalmente mientras que las segundas tienen un ciclo celular más activo. Esto nos permite pensar que el ciclo celular de las células hematopoyéticas de la médula ósea y de la sangre de cordón umbilical es distinto (Bowie MB. *et al.* 2006).

La diferencia en la etapa de ciclo tiene consecuencias a nivel funcional, pues las células que llegan a médula ósea del ratón en la primera etapa de establecimiento como su nicho permanente, tienen un defecto que no les permite injertar de manera eficiente como las células provenientes de un ratón adulto (Bowie MB. *et al.* 2006).

La frecuencia en que las células troncales ciclan en un modelo murino es de 1 ciclo cada 24 horas en células fetales y un ciclo cada 36 días en células troncales más activas y cada 145 días o más en células menos activas. En el humano, esta frecuencia es de una vez cada 280 días en promedio. El ciclo en la médula ósea de ratón dura aproximadamente 14 horas, siendo la fase G1 la más larga, de 10.5 horas. El tiempo de

esta fase se acorta cuando las células son progenitoras, permitiendo que el ciclo sea más corto y rápido (Pietras EM. *et al.* 2011).

Algunos de los reguladores de ciclo importantes para la hematopoyesis están: De la familia de pRb, p130 parece ser el regulador de E2F más importante en las células hematopoyéticas, pues al quitarlo, la población de células troncales desaparece. Al quitar p107, de la misma familia, sólo hay una tendencia a mayor diferenciación mieloide, al remover pRb, no hay un efecto importante (Walkley CR y Orkin SH. 2006).

Por otra parte, los inhibidores del ciclo celular también juegan un papel importante en la regulación de la hematopoyesis. Por ejemplo, p21 se activa únicamente en condiciones de estrés más que en la regulación de la homeostasis; p27 tiene un efecto sobre el ciclo celular de las células progenitoras principalmente; p57 en cambio mantiene la quiescencia de las células troncales, mientras que p53, el guardián del genoma, aumenta la cantidad de células troncales, pero al ser sobreexpresado estas células son menos funcionales (Pietras EM. *et al.* 2011).

Algunos factores externos, pero que están presentes en el microambiente hematopoyético, influyen en el ciclo celular de las células, por ejemplo, factores como CXCL12, TPO, Wnt, SCF y ANG-1 activan inhibidores como p21 y p57 manteniendo a las células en estado de quiescencia. La ausencia de CXCR4, el receptor de CXCL12, induce la expresión de la ciclina D1 permitiendo la entrada a la fase G1 del ciclo. TGF- β y Notch inducen la expresión de CXCR4 evitando que lo anterior suceda. Por otra parte, la acción de citocinas, tiene el efecto contrario y activan el ciclo por la vía de Akt y de Jack/stat permitiendo la expresión de la ciclina D (Pietras EM. *et al.* 2011).

EMPLEO DE CITOCINAS PARA LA DIFERENCIACIÓN HEMATOPOYÉTICA

Como se mencionó anteriormente, las células primitivas hematopoyéticas provenientes de sangre de cordón umbilical no suelen ser suficientes en número para el uso en la clínica en individuos adultos. Por otra parte, sabemos que las citocinas presentes en el microambiente de estas células inducen su proliferación por la entrada al ciclo celular.

Es por ello que, en el laboratorio, de manera artificial, se han ideado estrategias con el uso de citocinas para proliferar a las células *in vitro*.

En los años 70's se realizaba el cultivo *in vitro* de células hematopoyéticas que se alimentaban de una capa de células estromales; esta capa le proporcionaba a las células hematopoyéticas, los nutrientes específicos que necesitaban para sobrevivir y proliferar. A este tipo de cultivo se le conoce como cultivo de largo plazo o de Dexter (Dexter *et al.* 1978).

Posteriormente, fue posible aislar las citocinas con lo que en la actualidad se pueden administrar de forma independiente, permitiendo un mejor control sobre el tipo y la concentración de citocinas que se utilizan en el cultivo, y así mismo, determinar hasta cierto grado la potencia de proliferación y también la tendencia de diferenciación hacia un linaje u otro (Flores Guzmán P. 2006).

Algunas de las citocinas hematopoyéticas utilizadas en los cultivos *in vitro* se describen a continuación:

- Citocinas de acción temprana: son citocinas que como su nombre lo indica actúa principalmente sobre las células en las etapas más tempranas de la hematopoyesis, las células troncales y los progenitores más tempranos. En esta categoría entran: SCF (factor de células troncales: el ligando para el receptor de c-kit), Flt3-L (estimula principalmente los progenitores multipotentes), TPO (trombopoyetina: estimula la auto-renovación y supervivencia de las células troncales y la diferenciación de los megacariocitos así como la formación de plaquetas), IL-6 (interleucina 6: estimula la proliferación de los progenitores mieloides tempranos) (Hoffman R *et al.* 1993; Beutler E. *et al.* 2001).
- Citocinas de acción intermedia: son aquellas que actúan sobre progenitores más tardíos pero que aún no están comprometidos a un solo linaje. Estos son: IL-3 (Interleucina-3, estimula la producción eritroide, monocítica y granulocítica), GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos) (Beutler E. *et al.* 2001).

- Citocinas de acción tardía: son las que estimulan progenitores ya comprometidos a un linaje. En esta categoría encontramos: EPO (eritropoyetina), M-CSF (factor estimulante de colonias de monocitos), y G-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos) (Beutler E. *et al.* 2001).

El uso de estas citocinas en combinación, nos pueden permitir hasta cierto punto, controlar la diferenciación de las mismas, empujándolas hacia linaje eritroide o mieloide.

En nuestro laboratorio esto se ha realizado previamente, con combinaciones distintas de citocinas hematopoyéticas que nos permiten alcanzar distintos objetivos: utilizando sólo citocinas de acción temprana SCF e IL-6, se obtuvo incremento en vece de 3.7 después de 5 días de cultivo. Cuando a esta misma combinación se le agregaron citocinas de acción intermedia y tardía EPO e IL-3, se logró incrementar la diferenciación hacia el linaje eritroide y una proliferación de 10 veces después de 5 días de cultivo. Finalmente, si se le agrega GM-CSF y G-CSF en lugar de EPO e IL-3, se obtiene una expansión de los progenitores mieloides y la proliferación es mucho más lenta durante los primeros 10 días y posteriormente rebasa a la combinación eritroide llegando hasta 500 veces a los 25-30 días (Flores-Guzmán P, Gutiérrez-Rodríguez M y Mayani H. 2002).

Por otra parte, si se hace una combinación de todas las citocinas mencionadas anteriormente, el patrón de proliferación es el mismo que en la combinación eritroide en los primeros días, pero incrementa hasta 725 veces después de 25 días de cultivo (Flores P. *et al.* 2002).

HIDROXIUREA

La hidroxurea es un compuesto orgánico simple que se utiliza como fármaco en la clínica como tratamiento quimioterapéutico para el cáncer actúa específicamente sobre células que se encuentran en la fase S del ciclo, inhibiendo la enzima ribonucleósido difosfato

reductasa, bloqueando la producción de novo de desoxirribonucleótidos y por lo tanto la síntesis de ADN (Madaan K. *et al.* 2014).

Esta particularidad de la hidroxiurea ha permitido su empleo en el laboratorio, ya que al inhibir a las células en fase S con el mecanismo previamente mencionado, estas mueren y como consecuencia de ello ya no se observan células en fase G2 o M del ciclo. Por lo tanto, con el uso de este fármaco, es posible enriquecer las células en estados tempranos del ciclo en un cultivo celular (Singh A y Xu Young-Jie. 2016).

Existen algunos mecanismos alternos al anterior que también se activan con el empleo de la hidroxiurea como puede ser la citotoxicidad causada por el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno como son: el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Este mecanismo puede ser una de las maneras en que la célula en fase S muere de forma más rápida con el tratamiento con hidroxiurea (Singh A y Xu Young-Jie. 2016).

Así mismo puede tener blancos menos afines como la enzima esteroil 14 α dimetilasa, que en algunas especies de levadura ayudan a la progresión de la citocinesis, el último paso de la división de la célula, arrestándose en ese punto con el tratamiento con hidroxiurea, sin embargo, esto sólo es observado con un tratamiento prolongado con dicho fármaco (Singh A y Xu Young-Jie. 2016).

Teóricamente la hidroxiurea puede utilizarse en cualquier tipo celular, sin embargo, de manera importante se ha utilizado en tratamientos que involucran células hematopoyéticas, como son desórdenes mieloproliferativos como policitemia vera, trombocitema, mielofibrosis primaria, entre otros. Así mismo se utiliza para el tratamiento de anemia falciforme, ya que permite la mayor producción de hemoglobina fetal en eritroblastos basofílicos, permitiendo una mejor absorción de oxígeno mediante la producción de óxido nítrico y la producción aumentada de gamma globina (Cokic V.P. *et al.* 2003; Grieco A.J. *et al.* 2015).

La hidroxiurea es entonces un fármaco que presenta mecanismos que ya están bien descritos y otros aún se están descubriendo, sin embargo, es bien sabido que hace

que las células en fase S mueran, permitiendo una sincronización de una población celular y un factible tratamiento para distintos tipos de cáncer entre otras enfermedades.

2. ANTECEDENTES

CICLO CELULAR Y SU INFLUENCIA EN LA DIFERENCIACIÓN

En el modelo de células troncales pluripotenciales (embrionarias o iPSCs) ha sido observado el papel del estado del ciclo celular en la decisión de diferenciación hacia un linaje u otro en presencia de un mismo estímulo. Se sabe que las células que se encuentran en la fase G1 del ciclo, responden a señales de diferenciación específicas más rápidamente que células en cualquier otra fase del ciclo (Dalton S y Coverdell P.D. 2015).

La gran mayoría de las células troncales hematopoyéticas se encuentra en la fase quiescente (G₀) del ciclo celular. Esto les confiere propiedades particulares que impiden que haya un descenso significativo en sus números que pueda poner en riesgo a dicha población. Por el contrario, las células progenitoras hematopoyéticas son el compartimento en la hematopoyesis que más potencial de proliferación presentan, por lo tanto, un alto porcentaje de las mismas se encuentran activamente en ciclo, principalmente en la fase G1 (Mayani H. 2003).

Hay algunas evidencias que indican que el estadio en el ciclo celular no sólo tiene repercusiones en la actividad proliferativa de las células, sino en varias propiedades biológicas. Por ejemplo, en algunos estudios se ha observado que a medida que las células troncales de médula ósea de ratón entran a ciclo celular por estimulación de citocinas, los progenitores se expanden, pero las células pierden capacidad de injerto y la recuperan al regresar a las fases G₀/G₁ del ciclo (Habibian H.K. *et al.* 1998; Quesenberry P.J. *et al.* 2010).

Así mismo, el estado del ciclo celular en que se encuentran, permite que respondan de manera distinta a un estímulo, por ejemplo, células linaje negativas, con poca expresión de Hoechst y de Rhodamina (LRH) de ratón, estimuladas con las citocinas G-CSF y GM-CSF tienden a diferenciarse hacia granulocitos cuando son estimuladas en la fase S y a megacariocitos cuando lo son en la fase G₀/G₁. La tendencia al linaje al que se diferencian las células no parece estar relacionada con la

expresión de receptores de citocinas en distintos tiempos, reforzando la hipótesis mencionada anteriormente, de que el ciclo celular influye en la tendencia de diferenciación, no sólo en células pluripotenciales, sino en hematopoyéticas (Colvin G.A. *et al.* 2007).

PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN

El ciclo celular tiene un papel importante en la fisiología de la célula primitiva (troncal y progenitora) y este papel aún no ha sido explorado a profundidad. En el modelo hematopoyético, al menos en ratón, se ha observado que la fase del ciclo celular en que se encuentra una célula es importante para determinar el destino al cual dicha célula se va a diferenciar. En el presente trabajo se explora la posibilidad de que el ciclo celular en las células primitivas hematopoyéticas humanas también juegue un papel importante para la determinación de la diferenciación, en este caso hacia linaje eritroide y mieloide. Esto es importante en la investigación básica para entender que existe otro mecanismo involucrado en la determinación de la diferenciación en estas células y abre un nuevo campo a explorar en la relación entre el ciclo celular y la diferenciación.

En la clínica es importante conocer las características biológicas de las células que se están trasplantando a los pacientes y este trabajo denota que el ciclo celular es otra de las características a tomar en cuenta en dichos trasplantes.

HIPÓTESIS

El estado del ciclo celular en que se encuentra una población de células hematopoyéticas primitivas influirá en su potencial de proliferación, así como en su diferenciación hacia el linaje mieloide o eritroide, siendo que las células en G0/G1 tendrán una mejor capacidad tanto para proliferar como para diferenciarse de forma equitativa a ambos linajes.

OBJETIVOS

1. General

- Determinar si existen diferencias funcionales en las células hematopoyéticas primitivas provenientes de sangre de cordón umbilical, dependiendo de su estado en el ciclo celular.

2. Particulares

- Determinar las frecuencias, la capacidad de proliferación, expansión y diferenciación de células G0/G1 y G2/M en la población de células hematopoyéticas primitivas de SCU.
- Al sincronizar con hidroxiaurea:
 - Observar la presencia y tipo de progenitores funcionales con y sin tratamiento con hidroxiaurea
 - Comparar las cinéticas de proliferación, expansión de progenitores hematopoyéticos y diferenciación.
 - Determinar la presencia de receptores de citocinas CD114 y EPO-R.

METODOLOGÍA

1. Criterios de inclusión y exclusión de las muestras de SCU

Las muestras de sangre de cordón umbilical fueron obtenidas a través de dos fuentes: El Hospital General de zona No. 2-A Troncoso, en el área de Tococirugía y el Banco de Células Progenitoras del Hospital La Raza. Ambos hospitales pertenecientes al Instituto Mexicano del Seguro Social.

Los criterios en ambos hospitales para la elección de muestras fueron los siguientes (Novelo *et al.* 2008):

- Que el mínimo tiempo de embarazo es de 36 semanas.
- Que las pacientes embarazadas deben estar sanas
- Que sea la primera o la segunda gesta
- Que el embarazo haya estado libre de incidentes
- Que la edad de las pacientes sea entre 18 y 45 años
- Que no presente complicaciones relacionadas con el embarazo como neoplasias, síndrome de insuficiencia de la médula ósea, desórdenes inmunológicos y metabólicos y enfermedades congénitas y hereditarias.
- Que los padres no tengan historia de abuso de drogas o actividades sexuales de alto riesgo
- Que la paciente no presente tatuajes, perforaciones ni transfusión sanguínea en un tiempo menor a un año antes del nacimiento del bebé.
- Que la paciente no presente virus de la hepatitis B o C.
- Que la temperatura corporal de la paciente no haya subido de los 37°C durante las 12 horas previas al nacimiento del bebé.
- Que no sea un embarazo múltiple debido a que el tamaño y número de células puede variar ampliamente.

Las muestras se tomaron en bolsas recolección de sangre (Industrias plásticas Médicas S.A. de C.V.) con anticoagulante de citrato, fosfato y dextrosa.

2. Aislamiento de las células mononucleares

Las muestras de SCU arribaron al Laboratorio de Células Troncales y Progenitoras Hematopoyéticas en el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional SXXI y se procesaron al llegar de la siguiente manera:

- En una campana de flujo laminar se hizo el corte de la bolsa de sangre para obtenerla.
- Se tomaron 30 ml de sangre y se pusieron en tubos de 50ml para centrifuga con 20ml previamente puestos de Ficoll-Paque® Plus (Pharmacia Biotech Uppsala, Suiza). Este proceso se repite hasta tomar toda la sangre de la bolsa.
- Se procedió a tomar los tubos y centrifugarlos a 1500 rpm durante 30 minutos.
- Posteriormente, se desechó con pipeta la parte superior de la sangre, que corresponde a la parte del suero.
- Se tomó la fase blanca que siguió a la fase de suero, donde se encuentran las células mononucleares y se puso en un tubo nuevo de 50ml.
- El resto del tubo se desechó con la fase roja que corresponde a los eritrocitos.
- Se puso el mismo volumen de PBS (Invitrogen™, Auckland NZ) que el obtenido al extraer las células, para tener una concentración 1:1.
- Se procedió a centrifugar a 1100 rpm durante 9 minutos para lavar a las células mononucleares.
- Se descartó la mayor parte del sobrenadante y con el restante se resuspendieron las células y se midió el volumen en que estas se encuentran.
- Con esta medida, se procedió a la medición de la viabilidad con Azul de Tripano (Gibco®, Life Technologies, NY, EU) en la cámara de Neubauer, que permite distinguir las células muertas que se tiñen con el azul de las vivas que no se tiñen.
- En la misma cámara, utilizando el Diluyente de Turk (preparado con ácido acético al 1% de Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V. y azul de metileno de Merck, Millipore, México) que permite el conteo únicamente de núcleos, descartando así los eritrocitos que aún permanecieron en la extracción de células, se contaron el número de células mononucleares.

- Con este número, la viabilidad y el volumen, se calcula el número de células totales presentes en la muestra.
- Se cultivaron las células mono nucleares en medio RPMI advance (Gibco® by Life Technologies, NY, EU) con cuatro antibióticos: Eritromicina (10ng/ml), Vancomicina (10ng/ml), Ciproflox (10ng/ml) y Gentamicina (50ng/ml) a una concentración de 10 millones de células por mililitro.

3. Aislamiento de la población CD34+

Después de una noche de cultivo las CMN se obtienen de nuevo para obtener la población de células primitivas mediante inmunoselección negativa de la siguiente manera:

- Se obtuvieron las células mononucleares cultivadas del día anterior, se colocaron en tubos para centrifuga y se diluyeron con PBS a una concentración de 1:1.
- Se centrifugaron los tubos a 1100 rpm durante 9 minutos.
- Se descartó la mayor parte del sobrenadante y se procedió a contar con Azul de Tripano y con Diluyente de Turk como se describió anteriormente.
- Se utilizó un mínimo de 50 millones y un máximo de 120 millones de CMN para la selección.
- Para la inmunoselección negativa se utilizó la columna magnética “Progenitor” del sistema Stem Sep™ (Stem Cell Technologies™, Vancouver, Canadá).
- Se armó la columna del sistema y se lavó primeramente con 3mL de PBS y posteriormente con 9mL de PBS con 10% de SFB (Gibco® by Life Technologies NY, EU).
- Las células se aforaron a 1mL de medio RPMI advance y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con el coctel de anticuerpos del sistema, el cual incluye: CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b y Glicoforina A.
- Posteriormente las células se incubaron con el coloide del sistema, durante 15 minutos a temperatura ambiente.

- Las células se pasaron por la parte superior de la columna, recibiendo en la parte de abajo en un tubo de 15mL a las células seleccionadas negativamente, es decir, las que no tenían ninguno de los anticuerpos de linaje mencionados arriba. La mayoría de estas células son CD34+, por lo que el resultado es una población enriquecida en CD34 que son linaje negativas.
- Las células se centrifugaron a 1100rpm durante 9 minutos y se procedió al conteo de las mismas y su viabilidad.

4. Tratamiento con hidroxiurea

Las muestras que se utilizaron para sincronizar en G0/G1 con el tratamiento con hidroxiurea, se trataron de la siguiente forma:

- La solución con hidroxiurea se preparó justo antes de utilizarla en cada ocasión.
- Se pesaron 0.05 gramos de hidroxiurea (Sigma Aldrich®) y se colocó en un tubo eppendorf.
- Se aforó a 1mL con el medio RPMI advance con 5% de SFB para hacer una solución de 50mg/mL de hidroxiurea
- La mezcla se pasó por el Vortex a alta velocidad y durante el tiempo suficiente hasta que la hidroxiurea se diluyera por completo.
- Se tomaron 2.5µl por cada millón de células CD34+ y se colocaron en las células que previamente se dejaron en un volumen de 1mL, para tratarlas a una concentración de 125ug/mL de hidroxiurea
- Se incubaron las células a 37°C durante 50 minutos.
- Se lavaron las células con 5mL de PBS y se procedió a centrifugar a 1100rpm durante 9 minutos.
- Se descartó la mayor cantidad posible de sobrenadante y se colocó medio fresco. Este paso y el anterior son para asegurarse de limpiar a las células de la hidroxiurea, por su propiedad de citotoxicidad.
- Las células se contaron y se procedió a la medición de la viabilidad.

5. Protocolos de cultivo

Todas las células fueron sembradas con el medio de cultivo base Stem Span™ (Stem Cell Technologies™ Vancouver Canadá) y diferentes combinaciones de citocinas hematopoyéticas recombinantes humanas con la característica de ser libres de componentes animales (Xenofree). A este medio se le añadió una combinación de tres antibióticos: Penicilina, Streptovidina y gentamicina, las primeras dos a una concentración de 10 ng/mL y la última a 2 ng/mL.

Los cultivos fueron de 8 días, realizando las diferentes mediciones y experimentos los días cero, tres y ocho. Las combinaciones de citocinas utilizadas fueron las siguientes:

- Coctel de diferenciación eritroide: factor de células troncales o stem cell factor (SCF), Flt3-l, Interleucina 6 (IL-6), trombopoyetina (TPO), Interleucina 3 (IL-3), eritropoyetina (EPO). (Peprotech, EU); a una concentración de 10 ng/mL.
- Coctel de diferenciación mielóide: SCF, Flt3-l, IL-6, Factor estimulante de colonias granulo-monocíticas (GM-CSF) y factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF). (Peprotech, EU); a una concentración de 10 ng/mL.
- Coctel mixto: la combinación de los dos cocteles anteriores, es decir: SCF, Flt3-l, IL-6, IL-3, TPO, EPO, GM-CSF y G-CSF. (Peprotech, EU); a una concentración de 10 ng/mL.

En todos los casos y en cualquiera de los tres puntos de cultivo, las células fueron sembradas a una concentración de 50,000 a 100,000 células por mililitro.

6. Ensayos de colonias

Los ensayos de colonias de progenitores se realizaron conforme a lo establecido y estandarizado en los protocolos del laboratorio como se describe a continuación:

- Después de centrifugar y contar las células en los tres puntos de cultivo, se tomó un determinado número de células (ver tabla 1) y se sembró en 500 µl de un medio semi-sólido conocido como metil-celulosa (MethoCult™ de Stem Cell

Technologies TM Vancouver Canadá) que contiene las siguientes citocinas hematopoyéticas: SCF, IL-3, IL-6, EPO, G-CSF y GM-CSF. Esta combinación permite la formación de colonias eritroides, mieloides y de progenitores multipotentes.

- Se tomó el tubo eppendorf con el medio y las células y se pasó por el Vortex durante un minuto para permitir la distribución homogénea de las células.
- Se sembró cada ensayo en un pozo de una placa de 24 pozos cuidando no dejar burbujas en el cultivo.
- Se incubó el ensayo durante 14 días en la incubadora a 37°C con una concentración de 5% de CO₂.
- Se procedió a leer el ensayo en un microscopio óptico, distinguiendo las colonias de células mieloides (unidades formadoras de colonias de Granulocitos, de monocitos y de granulocitos y monocitos: CFU-G, CFU-M y CFU-GM) de las eritroides (BFU-E y CFU-E). Así mismo, en los casos en los que hubo, se contabilizaron las colonias de progenitores multipotentes, conocidas en el laboratorio como colonias mixtas.
- Los datos obtenidos en estos ensayos se utilizaron para ver la proporción de diferenciación eritroide y mieloide. Igualmente, el número total de colonias formadas se utilizó para calcular la expansión de los progenitores a lo largo del cultivo, es decir, cuánto aumenta la cantidad de células que siguen teniendo características fisiológicas de células progenitoras, a lo largo del cultivo.

Tabla 1. Número de células sembradas en cada punto del cultivo para el ensayo de colonias.

Día de cultivo	Número de células sembradas por ensayo
CMN (antes de la inmunoselección)	10,000
Día 0	500
Día 3	800
Día 8	800

El número de células sembradas es mayor en el caso de las CMN debido a que los progenitores aún no han sido enriquecidos, así mismo, es menor al día cero ya que la proporción de progenitores es más alta en ese punto, que es justo después de la columna de inmunoselección.

7. Morfología

En el día ocho de cultivo, es posible observar la morfología de las células para determinar al linaje al que están comprometidas. Para ello se realizó el siguiente método:

- Posterior al lavado de las células (con PBS y centrifugado a 1100 rpm durante 9 minutos), se realizó el conteo de las células con diluyente de Turk y la viabilidad con Azul de Tripano.
- Se tomaron 20,000 células, considerando sólo las vivas y se diluyeron hasta alcanzar un volumen de 30µl con PBS.
- Si el volumen tomado fue mayor al mencionado, se centrifugó esa parte nuevamente a 1100 rpm durante 9 minutos y se descartó el sobrenadante sustituyéndolo con PBS.
- Se marcaron las laminillas y se colocaron en el Cytospin (Cytopro™ Wescor E.U.) junto con la suspensión de células y se centrifugó en el mismo durante 5 minutos.
- Se dejaron secar las laminillas al menos un día.
- Se realizó la tinción para ver morfología con Wright / Giemsa (Sigma Aldrich®).
- Para ello se colocó el colorante sobre la laminilla durante 5 minutos.
- Se utilizó un amortiguador (Sigma Aldrich®) el cual se colocó sobre cada laminilla durante 10 minutos más.
- Posteriormente se lavaron las laminillas con agua corriente con poca presión.
- Las laminillas se dejaron secar.
- La lectura de la morfología se llevó a cabo en el microscopio óptico y se distinguieron tres clasificaciones: blastos, aquellas células que aún no es evidente el linaje al cual van dirigidas; mieloides: células con morfología granulocítica o monocítica; eritroides: células con morfología de progenitores eritroides.

8. Citometría

En los días cero y ocho de cultivo, después de lavadas y contadas las células, se tomó un número determinado de células para marcarlas con anticuerpos para su lectura en citometría:

- Se tomó un mínimo de 10,000 células para cada tubo al que se le fuera hacer la tinción.
- Se separaron al menos 10,000 células en combinación de todas las condiciones, para preparar el tubo que nos sirvió como autofluorescencia. En dicho tubo, se realizó el proceso como en los demás, pero sin la adición de los anticuerpos, sirviendo de control negativo.
- Se realizaron dos tubos por cada condición de cultivo, añadiendo a cada uno la concentración de anticuerpos previamente estandarizada: al primer tubo se le añadieron los anticuerpos: CD34-APC, CD38-FITC y CD114-PE (receptor de G-CSF), al segundo: CD34-APC, CD38-FITC y EPO-R-PE.
- Después de añadir los anticuerpos a cada tubo, excepto el de autofluorescencia, se añadieron las células y se diluyó con 100µl de PBS con EDTA y 3% de SFB.
- Se procedió a incubar los tubos durante 3 minutos a oscuridad a temperatura ambiente.
- Posteriormente se le añadió a cada tubo 250µl de fijador BD FACS™ Lysing Solution (BD Biosciences, San José, CA) al 10%, se pasaron por el Vortex durante 10 segundos y se incubaron nuevamente a temperatura ambiente, en oscuridad, durante 10 minutos.
- Se añadieron 200µl de PBS con EDTA y se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 2500 rpm.
- Se decantó el exceso de sobrenadante y se guardaron los tubos cubiertos de aluminio a 4°C hasta el momento de su lectura.
- Los tubos se leyeron en el citómetro FACSCanto™ II (BD Biosciences).
- Los datos se analizaron en el FlowJo V10.
- Tomando en cuenta la fracción CD34+ se midió el porcentaje de células positivas a CD114 y a EPO-R. Con este dato, se extrapólo el número de células en cultivo

que presentaban estos receptores y se calculó el número de veces que aumentó esta población del día cero al día ocho de cultivo en cada condición.

9. Medición del ciclo celular

El estado del ciclo celular y la proporción de cada fase del ciclo se calculó mediante dos técnicas: inmunohistoquímica para Ki-67 y la tinción de ADN y su lectura por citometría del Vybrant® Dye Cycle™ Violet stain (Molecular Probes, Life Technologies™ NY, EU).

Para Ki-67:

- Se realizaron laminillas con 20,000 células como se describió anteriormente en el apartado de morfología. Las laminillas utilizadas para esta técnica estaban previamente electrocargadas.
- Las laminillas se procesaron para inmunohistoquímica en el equipo Ventana® Benchmark GX (Roche).
- Las laminillas se leyeron en el microscopio óptico, contando las células positivas y negativas a la tinción, obteniendo así la proporción de células en fase G1 en adelante en el ciclo celular para cada condición de cultivo.

Para Vybrant Dye Cycle:

- Se colocaron aproximadamente 10,000-20,000 células por tubo, diluidas con PBS, EDTA y 3% de SFB.
- Se colocó 0.005 - 0.01µl del Vybrant® Dye cycle™ (concentración estandarizada previamente) en el tubo de citometría con las células.
- Se incubaron los tubos durante 5 minutos a 37°C en condiciones de oscuridad.
- Inmediatamente, sin lavar, se procedió a la lectura en el citómetro FACSAria™ (BD Biosciences).
- Para el análisis de los datos se utilizó el programa FlowJo V10. A partir de este análisis se determinó la proporción de células en G0/G1 (primera curva) y S/G2/M (parte posterior a la primera curva y segunda curva)

Con los datos obtenidos a partir de las dos técnicas, se calculó la proporción de células en G0 y en G1 por separado.

10. Separación de las poblaciones por su estado en el ciclo.

En otros experimentos, se procedió a separar a las células por su estado de ciclo para posteriormente cultivarlas. Esto se realizó de la siguiente manera:

- Se hizo la tinción con Vybrant® Dye Cycle™ Violet stain como se describió anteriormente. Esta tinción permite que las células puedan ser separadas mediante Cell Sorting y permanezcan al menos una proporción con vida.
- Se añadió una segunda tinción para viabilidad SYTOX™ Red Death Cell Stain (Molecular Probes, Life Technologies™ NY, EU) para descartar las células que van muriendo con la primera tinción.
- Se procedió al Cell Sorting en el FACS Aria™ y se recibieron en dos tubos previamente preparados con PBS y 3% de SFB.
- En un tubo se obtuvo la población G0/G1 y en el otro la población S/G2/M. Parte de la población en fase S tuvo que ser descartada para tener un límite más estricto entre las dos curvas que se forman en la tinción.
- Las células obtenidas fueron centrifugadas, colocadas en medio fresco Stem Span™ y contadas con Diluyente de Turk y Azul de Tripano para ver su viabilidad.
- Al obtener un número mucho más reducido de células en esta técnica que en la descrita anteriormente, solamente se utilizó la condición mixta de cultivo y se realizaron ensayos de colonias.

11. Estadística

- El programa utilizado para el análisis estadístico de los datos fue el Graph Pad Prisma 7.
- La distribución Gaussiana o normal de los datos, fue confirmada por las pruebas: D'Agostino-Pearson, Shapiro Wilk y Kolmogorov-Smirnov.

- Para conocer si había diferencia significativa entre más de dos grupos, se utilizó la prueba ANOVA con la prueba subsecuente Tuket.
- Cuando fueron comparados solamente dos grupos, se utilizó la prueba T de Student, Sidak y Bonferroni. Se consideró significativa una diferencia cuando el valor de P fue menor a 0.05.
- Se utilizó la desviación estándar para ver la distribución de los datos.
- Se utilizaron las medias para la comparación entre condiciones.

RESULTADOS

1. Cantidad de células y de unidades formadoras de colonias al día cero

Como se mencionó anteriormente, se utilizó un mínimo de 50 millones de células mononucleares (CMN) y un máximo de 120 millones para pasarlas por la columna de inmunoselección y obtener la población enriquecida en células CD34⁺ Lin⁻.

En la tabla 2 se muestran la cantidad de CMN obtenidas por muestra, la cantidad de células que se obtuvieron posteriormente a la columna de inmunoselección y el porcentaje de recuperación que eso representa. En la segunda parte de la tabla, las siguientes tres columnas, se observa la proporción de progenitores, o unidades formadoras de colonias (UFC) que encontramos antes (CMN) y después de la inmunoselección, así como el enriquecimiento en veces, es decir, cuántas veces aumentó el número de unidades formadoras de colonias con la selección de la población CD34⁺ Lin⁻.

Tabla 2. Características de la población celular antes y después de la inmunoselección

CMN (10 ⁶)	Post-columna (10 ⁶)	% de Recuperación	% de UFC en CMN	% de UFC en CD34 ⁺ Lin ⁻	EV
96.66 ±19.19	1.31±0.27	1.45±0.6	0.41±0.17	10.57±4.17	33.98±24.69

CMN: Células Mononucleares; UFC: Unidades formadoras de colonias; EV: enriquecimiento en veces.

N=8

Como se puede observar en la tabla 2, solo el 1.45% de las CMN son linaje negativas, es decir, tienen características de ser primitivas. Y de ese 1.3 millones de células primitivas, sólo el 10.57%, es decir, aproximadamente 140,000 células, son funcionalmente células progenitoras, al menos de manera comprobable a través de este método.

Posterior al enriquecimiento de la población, se llevó a cabo el tratamiento con hidroxurea para enriquecer a las células en G0/G1. En la tabla 2 se muestra el porcentaje de recuperación a partir de la población enriquecida antes y después del tratamiento con hidroxurea, así como la capacidad de formación de colonias.

Tabla 3. Porcentaje de recuperación y de porcentaje de UFC después del tratamiento con hidroxurea

% de Recuperación	% de UFC antes de HU	% de UFC después de HU	Enriquecimiento en veces
65.6±29.99	10.57±4.17	12.23±4.5	1.32±.66

UFC: Unidades formadoras de colonias; HU: hidroxurea. N=8.

Como se puede analizar en la tabla anterior, se aprecia un ligero incremento en la cantidad de unidades formadoras de colonias después del tratamiento con hidroxurea. Dicho incremento fue analizado posteriormente.

2. Efecto de la hidroxiurea en la cantidad y tipo de unidades formadoras de colonias

En la siguiente tabla se muestra el porcentaje de recuperación después del tratamiento con hidroxiurea, la cantidad de unidades formadoras de colonias que presenta la población antes y después del tratamiento y el enriquecimiento en veces que esto representa. A diferencia de la tabla 3, en la tabla 4 se muestra cada muestra por separado.

Tabla 4. Porcentaje de recuperación y de unidades formadoras de colonias antes y después del tratamiento con hidroxiurea de cada muestra por separado

% de Recuperación	% de UFC antes de HU	% de UFC después de HU	Enriquecimiento en veces
15.29	15	30.66	2.04
20	10.6	20.6	1.94
43	7.4	12.4	1.67
62.5	5.2	11	2.11
64.4	6.6	17.8	2.70
72.62	15.6	20.4	1.31
78.99	9.4	7.2	0.76
99.2	15.4	10.2	0.66

UFC: Unidades formadoras de colonias; HU: hidroxiurea

Al observar cada muestra por separado, de menor a mayor porcentaje de recuperación, se puede observar que hay una relación inversamente proporcional entre dicho porcentaje y el enriquecimiento en veces del número de colonias. Es decir, al parecer, entre mayor sea el efecto de muerte celular por parte de la hidroxiurea en cada muestra, las células progenitoras se enriquecen más. Esto puede deberse a que las células G0/G1 tienen un mayor potencial de células progenitoras, o bien a que, a través de un mecanismo desconocido, se estén enriqueciendo las células capaces de formar colonias con el tratamiento de hidroxiurea. Esta relación inversa, se puede observar mejor en la Figura 2.

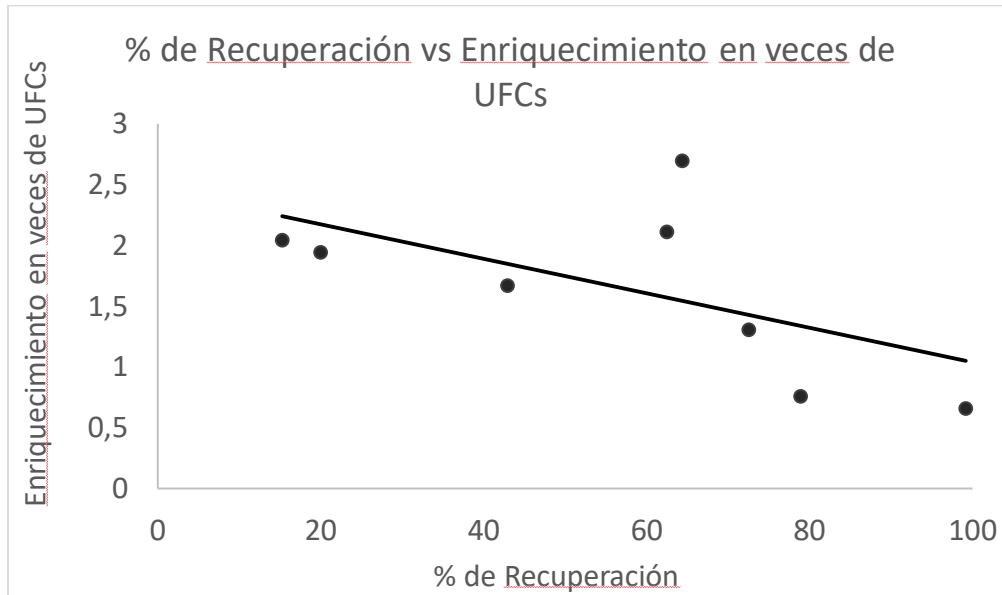


Figura 2. El enriquecimiento de las UFCs es inversamente proporcional a la recuperación de células. Entre menor sea el porcentaje de recuperación de células después del tratamiento con hidroxiurea, mayor es el enriquecimiento en veces del porcentaje de unidades formadoras de colonias con respecto a la población enriquecida en CD34⁺ Lin⁻. UFC: Unidades formadoras de colonias.

La cantidad de colonias no es la única diferencia después del tratamiento con hidroxiurea sino también el tipo de colonias formadas. Como se puede ver el número de colonias que aumenta son particularmente las eritroides y las provenientes de progenitores multipotentes, también conocidas como colonias mixtas, estas últimas son aquellas colonias que producen ambos linajes: eritroide y mieloide, ya que pertenecen teóricamente al progenitor más primitivo de la hematopoyesis (Figura 3).

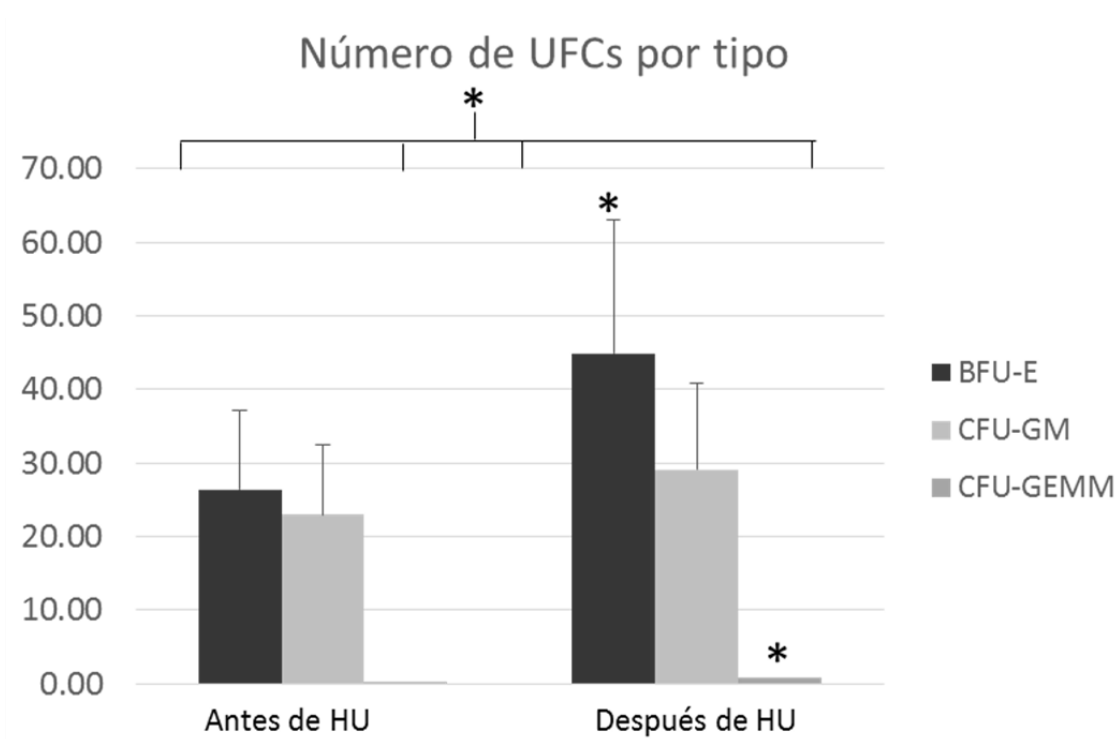


Figura 3. El tratamiento con hidroxurea enriquece a los progenitores eritroides y mixtos. BFU-E: Colonias eritroides, CFU-GM: Colonias mieloides, CFU-GEMM: colonias mixtas (Prueba post ANOVA Sidak y prueba T de Student. *= significativo cuando $p < 0.05$) (n=8).

3. Proporción de las distintas fases del ciclo celular antes y después de la hidroxiurea y a lo largo del cultivo.

La hidroxiurea, además de ser un fármaco utilizado en la clínica, también es utilizado en la investigación para matar a las células que se encuentran a partir de la fase S del ciclo con el fin de obtener un enriquecimiento en las células que se encuentran en G0/G1 y de esa manera enriquecerlas en esta fase del ciclo.

En la figura 4 se muestra la disminución del porcentaje de células que se encuentran en las fases S/G2/M después del tratamiento con hidroxiurea en nuestras manos como se esperaba.

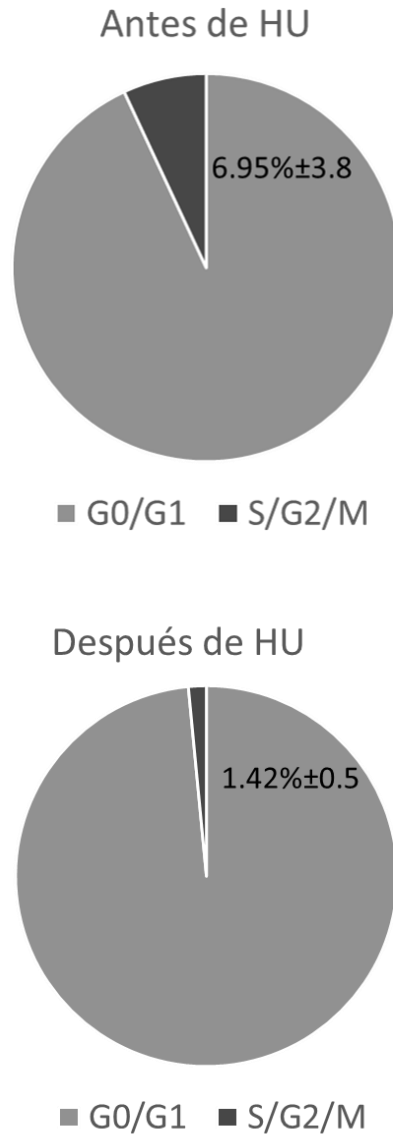


Figura 4. El tratamiento con HU reduce el Porcentaje de células en las fases S/G2/M del ciclo celular. Se muestra una disminución en el porcentaje de células en S/G2/M como era esperado (n=8) La viabilidad con el tratamiento de hidroxiurea no varía, permanece entre el 95 y 100%.

Lo anterior fue analizado con la tinción Vybrant® Dye Cycle™. Al correlacionar estos datos con los de la inmunohistoquímica para Ki-67, obtenemos también la proporción de células en G0 y G1 por separado. Las células en G0 corresponden a aquellas que son negativas a Ki67 y las G1, junto con las S, G2 y M, a las positivas. Por otra parte, las células G0 y G1, al tener la misma cantidad de ADN se encuentran en la primera curva citométrica con la tinción de Dye Cycle. Obteniendo la proporción con ambas técnicas es posible obtener la población de G0 y G1.

Como se observa en la figura 5, la proporción de células en G0 y G1 no es significativamente diferente antes o después del tratamiento con hidroxurea. Sin embargo, a lo largo del cultivo, esta proporción varía bastante.

Al día tres, la gran mayoría de las células se encuentra en la fase G1 y una proporción menor al 10% se encuentra en estado G0, esto quiere decir que el 90% de las células se encuentran en proliferación después de tres días de haber sido estimuladas con citocinas, independientemente del tipo de citocinas que se hayan utilizado. Interesantemente, a los ocho días de cultivo, existe una proporción más amplia de células en G0 que al día tres, a pesar de llevar más tiempo con estímulos mitógenos que además fueron renovados al día tres.

Lo anterior es debido a que en este tiempo de cultivo hay una proporción de células que están alcanzando o ya alcanzaron el estado de madurez, es por esto que somos capaces de analizar la morfología en este punto del cultivo. En este punto, el ciclo celular es más lento o no sucede ya si está en las últimas etapas de diferenciación.

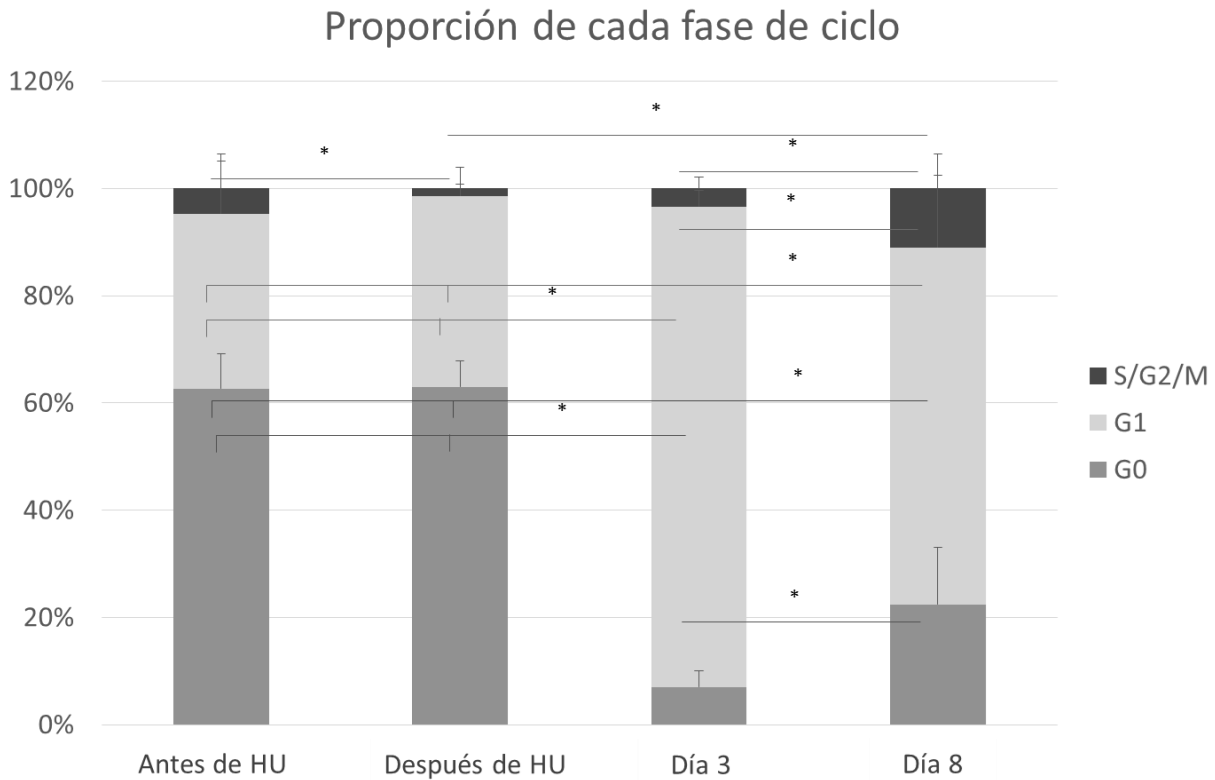


Figura 5. Proporción de cada fase del ciclo celular a lo largo del cultivo. HU: hidroxurea. Se observan diferencias significativas en la fase S/G2/M entre los grupos antes y después del tratamiento con hidroxurea, así como después del tratamiento y después de ocho días de cultivo. Se observan también diferencias significativas en las fases G0 y G1 entre el día 0 (que incluye antes y después de HU) y el día 3 y 8. (Prueba post ANOVA Sidak y prueba T de Student. *= significativo cuando $p < 0.05$). (n=8).

Los resultados observados en la figura 5 son los mismos para las condiciones eritroide, mieloide y mixta a los días 3 y 8, es por eso que se muestra la barra representativa de las tres condiciones.

4. Cinéticas de proliferación

A lo largo del cultivo, en todos los casos, las células siempre proliferaron hasta los ocho días que duró el experimento y la viabilidad se mantuvo arriba del 80%. Como vemos en la primera figura, las células CD34+ Lin-, de manera normal sin tratamiento con hidroxiurea tienen un comportamiento hematopoyético característico. Es decir, cuando las células son estimuladas con todas las citocinas o coctel mixto, proliferan arriba de 100 veces después de ocho días de cultivo. Así mismo, cuando las células son estimuladas con el coctel eritroide, su potencial de proliferación es similar al coctel mixto a pesar de tener menor cantidad de citocinas.

Hay reportes con relación a la hematopoyesis *in vitro*, donde las células eritroides tienen un potencial alto de proliferación al principio del cultivo y este decae después de los primeros diez días. Esta naturaleza de las células permite que se cubra la necesidad de los requerimientos de oxígeno en un organismo de manera rápida. Por lo mismo, las citocinas eritroides son mitógenos más activos que las mieloides.

En congruencia con lo anterior, se observó que cuando las células son estimuladas con el coctel mieloides, a los ocho días aumentaron en número, pero no de manera tan alta como con los otros dos cocteles (Figura 6). Aunque las diferencias no son estadísticamente significativas en este punto, se observa una clara tendencia que corresponde a lo esperado en estas condiciones y esta población.

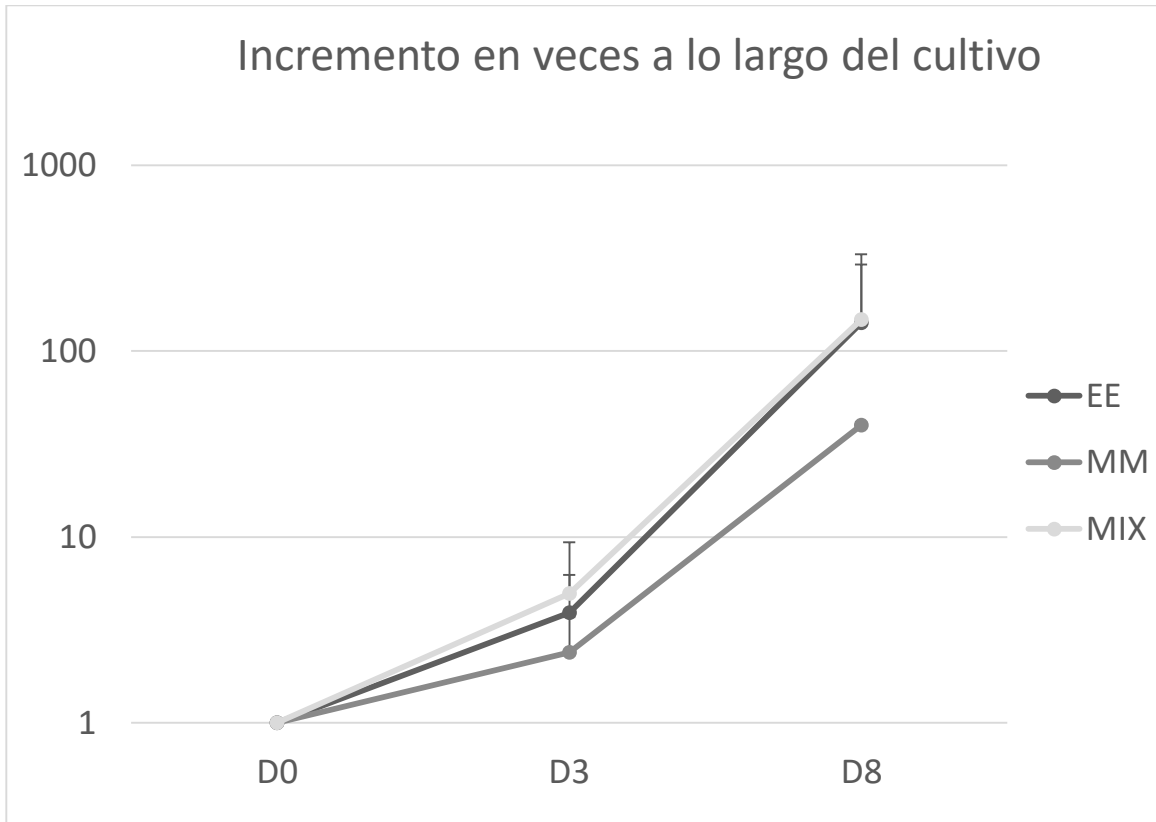


Figura 6. Las condiciones eritroide y mixta fomentan una mayor proliferación de las células no estimuladas con hidroxurea. Se muestra el incremento en veces de las células a lo largo de los tres puntos de cultivo. D0: día cero; D3: Día tres; D8: día ocho. EE: condiciones de cultivo eritroide; MM: condiciones de cultivo mieloide. Mix: condiciones de cultivo mixto. (Prueba post ANOVA Sidak y prueba T de Student. *= significativo cuando $p < 0.05$). (n=8).

En cambio, como se observa en la siguiente figura, sorpresivamente, cuando las células son previamente expuestas al día cero a hidroxurea, las cinéticas de proliferación se vuelven muy similares entre sí, de tal forma que se estimula a las células con el coctel mieloide, se comporta de una manera muy similar a cuando son estimuladas con el coctel eritroide o mixto (Figura 7).

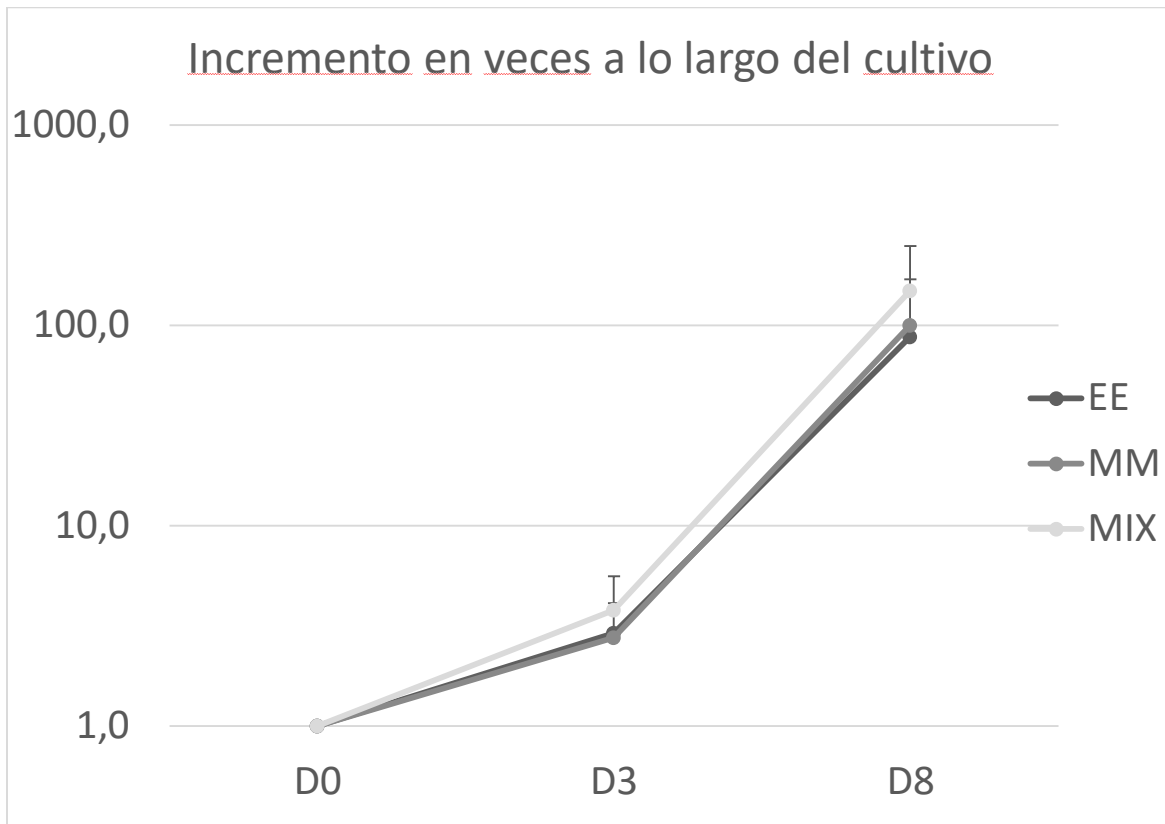


Figura 7. La condición mieloide fomenta una proliferación similar a las otras dos condiciones en células previamente estimuladas con hidroxurea. Se muestra el incremento en veces de las células a lo largo de los tres puntos de cultivo que fueron estimuladas con hidroxurea al día cero. D0: día cero; D3: Día tres; D8: día ocho. EE: condiciones de cultivo eritroide; MM: condiciones de cultivo mieloide. Mix: condiciones de cultivo mixto. (Prueba post ANOVA Sidak y prueba T de Student. *= significativo cuando $p < 0.05$). (n=8).

Tomando en cuenta estas dos gráficas, fue importante hacer un comparativo entre las células que fueron tratadas con hidroxurea de las que no fueron tratadas, al menos en el caso del coctel mieloide y eritroide. Lo que se observa es que no hay diferencias significativas entre las células estimuladas con el coctel eritroide previamente tratadas o no con hidroxurea como tampoco las hay entre estos grupos y la contraparte mieloide que fue tratada previamente con hidroxurea. Sin embargo, como se esperaba, las células que no pasaron por un tratamiento previo con hidroxurea y que se cultivaron con el coctel de citocinas mieloide, si es significativamente diferente a su contraparte mieloide que si fue tratada con hidroxurea (Figura 8).

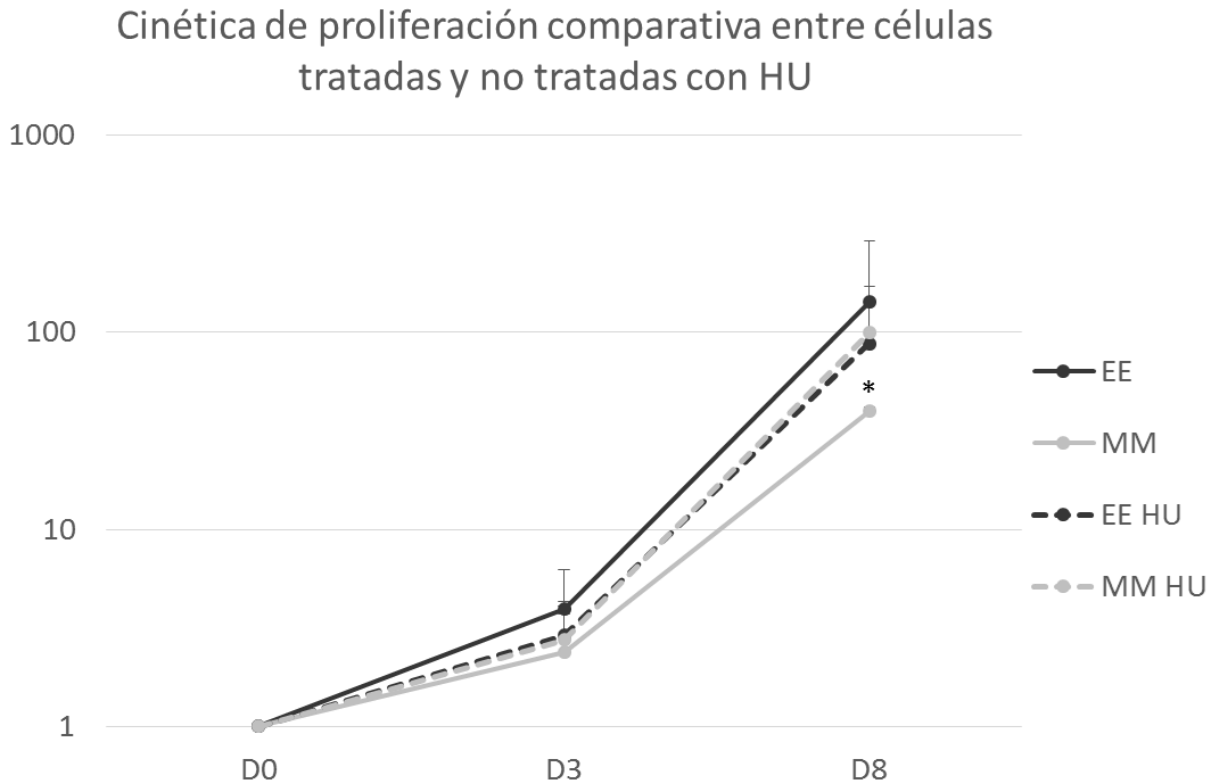


Figura 8. En condiciones de cultivo mielode, las células estimuladas con HU tienen una cinética de proliferación mayor que las no estimuladas. Se muestra el incremento en veces de las células a lo largo de los tres puntos de cultivo que fueron estimuladas y no estimuladas con hidroxurea al día cero. D0: día cero; D3: Día tres; D8: día ocho. EE: condiciones de cultivo eritroide sin estímulo previo con hidroxurea; MM: condiciones de cultivo mielode sin estímulo previo con hidroxurea. EE HU: condiciones de cultivo eritroide con estímulo previo con hidroxurea al día cero; MM HU: condiciones de cultivo mielodes con estímulo previo con hidroxurea al día cero. (Prueba post ANOVA Sidak y prueba T de Student. *= significativo cuando $p < 0.05$). (n=8).

5. Cinética de expansión de progenitores

En los ensayos de unidades formadoras de colonias se contaron la cantidad de las mismas y se extrapolo ese dato al cultivo para obtener la cantidad total de progenitores que se tenían en cada punto. Con este dato se obtuvo el número de veces que incrementó la cantidad de progenitores desde el día cero hacia el día tres y el día ocho.

En la figura 9 observamos que, al igual que en la gráfica de proliferación, las células cuando no son previamente estimuladas con hidroxiurea, presentan una mayor expansión de progenitores cuando son cultivadas con las condiciones mixtas y eritroide, mientras que cuando son cultivadas con la condición mieloide, esta expansión existe, pero es menor a las otras dos.

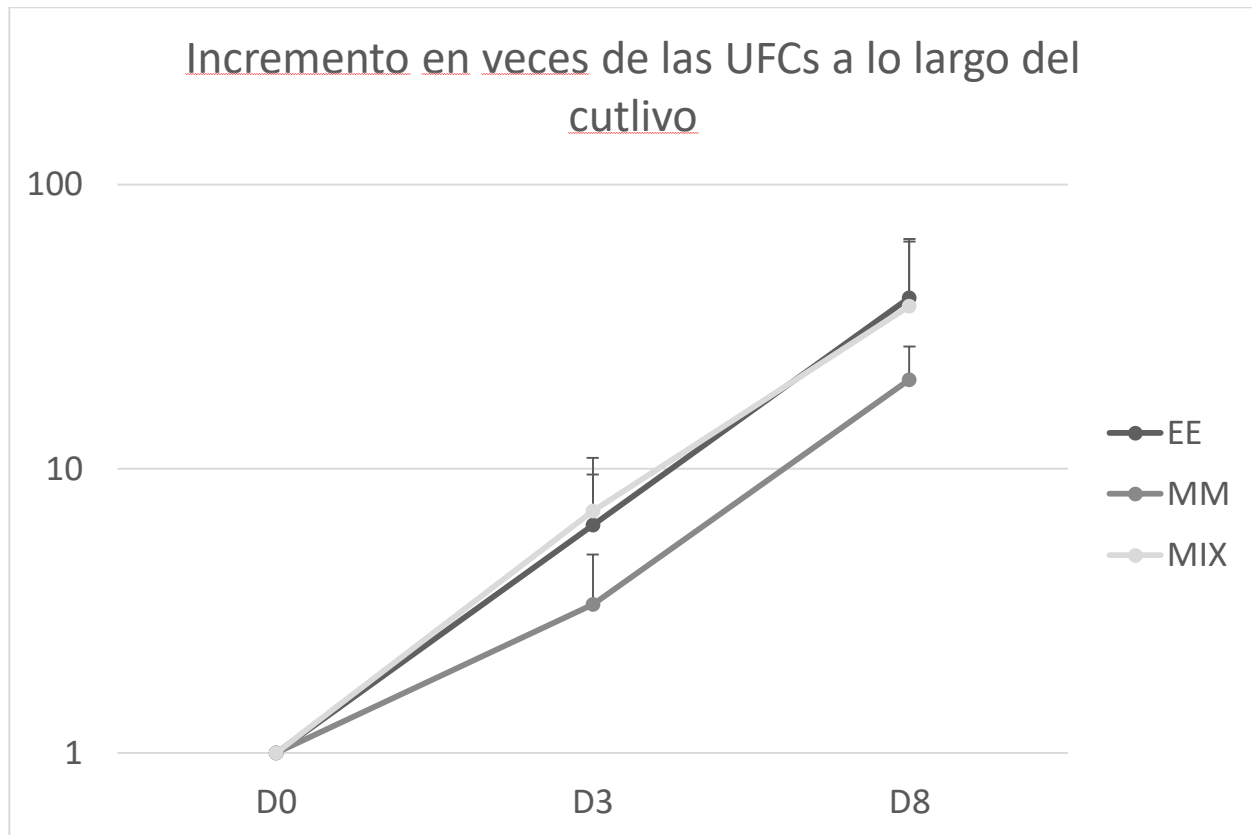


Figura 9. Incremento en veces de las unidades formadoras de colonias a lo largo del cultivo en células no estimuladas previamente con hidroxurea. Se muestra el incremento en veces de las unidades formadoras de colonias a lo largo de los tres puntos de cultivo. D0: día cero; D3: Día tres; D8: día ocho. EE: condiciones de cultivo eritroide; MM: condiciones de cultivo mieloide. Mix: condiciones de cultivo mixto. (Prueba post ANOVA Sidak y prueba T de Student. *= significativo cuando $p < 0.05$). (n=8).

Así mismo, como se observó previamente en las cinéticas de proliferación, en la cinética de expansión de células que fueron estimuladas al día cero con hidroxurea, se advirtió que las condiciones de cultivo mieloide estimulan no sólo a la población en general a proliferar sino también a los progenitores y probablemente a las troncales a que generen mayor cantidad de progenitores, de manera similar como en los cocteles mixto y eritroide. De hecho, hubo una ligera tendencia a que la condición mieloide expanda los cultivos de manera más importante que las otras dos, aunque esto no fue significativo (Figura 10).

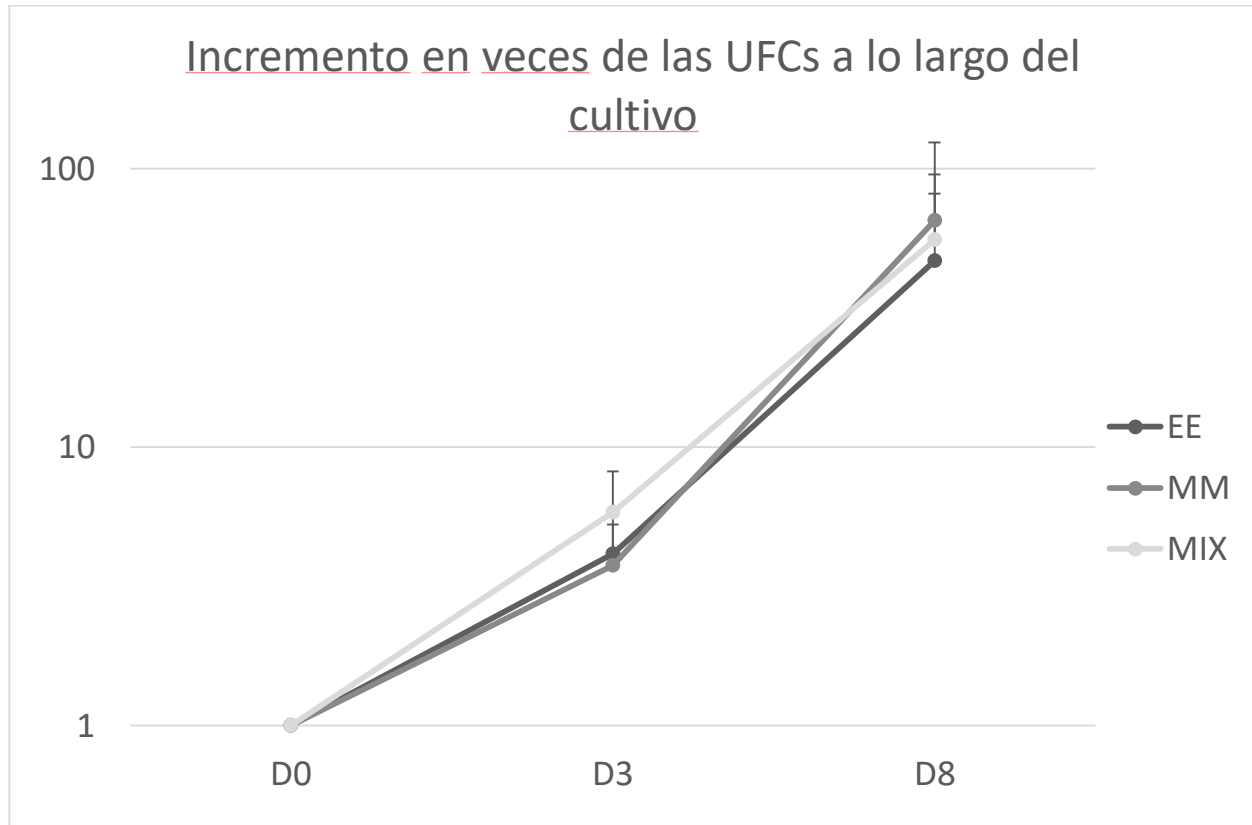


Figura 10. Incremento en veces de las UFCs a lo largo del cultivo en células que fueron previamente estimuladas con hidroxurea. Se muestra el incremento en veces de las UFCs a lo largo de los tres puntos de cultivo que fueron estimuladas con hidroxurea al día cero. D0: día cero; D3: Día tres; D8: día ocho. EE: condiciones de cultivo eritroide; MM: condiciones de cultivo mieloides. Mix: condiciones de cultivo mixto. (Prueba post ANOVA Sidak y prueba T de Student. *= significativo cuando $p < 0.05$). (n=8).

Una vez más, tomando en cuenta estos datos, se hizo el comparativo entre células estimuladas con hidroxurea al día cero ya fueran cultivadas en condiciones mieloides y eritroides. Observamos, de manera congruente con la proliferación, que las células mieloides que no fueron tratadas con hidroxurea tienen una expansión de progenitores significativamente menor que las células tratadas con hidroxurea al día cero y cultivadas en las mismas condiciones (Figura 11).

Cinética de expansión de UFCs comparativa entre células tratadas y no tratadas con hidroxiurea

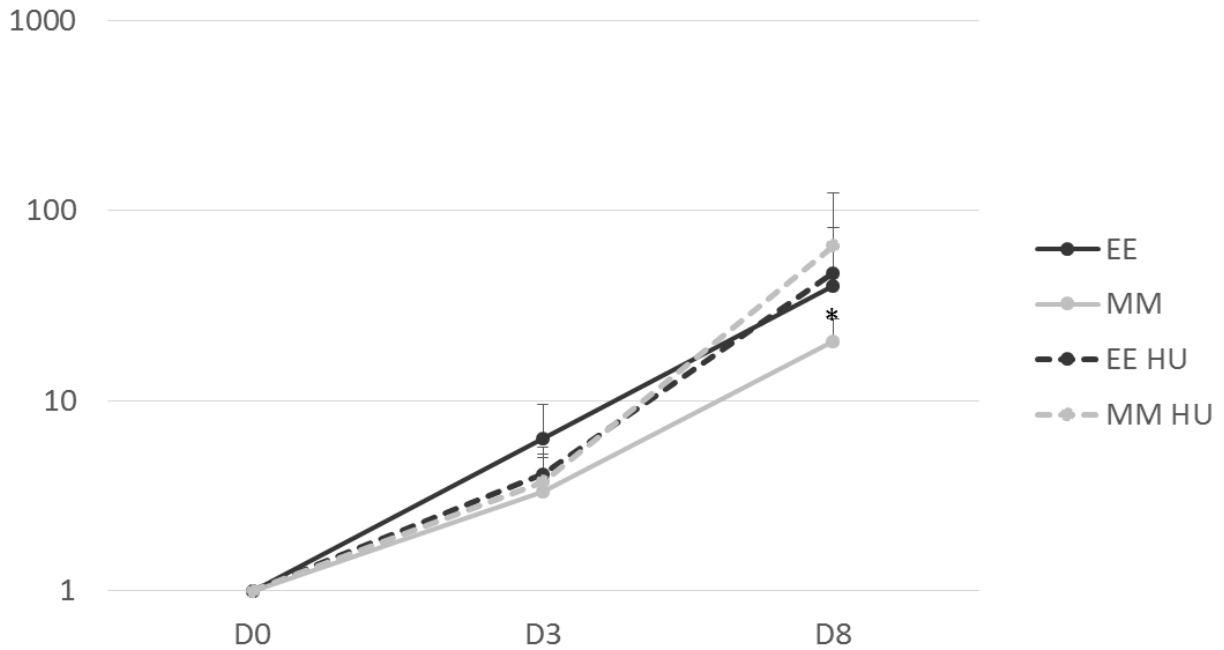


Figura 11. Cinética de expansión de UFCs comparativa entre células tratadas y no tratadas con hidroxiurea. Se muestra el incremento en veces de las UFCs a lo largo de los tres puntos de cultivo que fueron estimuladas y no estimuladas con hidroxiurea al día cero. D0: día cero; D3: Día tres; D8: día ocho. EE: condiciones de cultivo eritroide sin estímulo previo con hidroxiurea; MM: condiciones de cultivo mieloide sin estímulo previo con hidroxiurea. EE HU: condiciones de cultivo eritroide con estímulo previo con hidroxiurea al día cero; MM HU: condiciones de cultivo mieloides con estímulo previo con hidroxiurea al día cero. (Prueba post ANOVA Sidak y prueba T de Student. *= significativo cuando $p < 0.05$). (n=8).

6. Morfología

En la observación de la morfología al día ocho observamos una proporción menor al 10% de células con morfología de blasto, es decir, la mayor parte de la población celular ya está determinada hacia un linaje específico. Dado que las condiciones de cultivo no permiten la formación de linaje de linfocitos y en una proporción mínima de megacariocitos, los linajes, al igual que en los ensayos de colonias se contabilizaron para determinar linaje eritroide y mieloide, incluyendo en este último, los granulocitos y los monocitos.

Como se esperaba, en la condición eritroide hay una alta proporción de células con morfología eritroide, en la condición mieloide hay una mayor proporción de células mieloides, siendo esta de arriba del 90% y en la condición mixta se observa una mayor proporción de células mieloides que eritroides, pero no tan alta como la condición mieloide. Al comparar los grupos de células tratadas inicialmente con hidroxurea y las no tratadas, en ninguna de las tres condiciones se observan diferencias significativas, lo cual indica que, a nivel de precursores, no hay una tendencia distinta de diferenciación con el tratamiento con hidroxurea (Figura 12). Aunque no hay diferencia significativa entre los grupos tratados y no tratados con hidroxurea, si se observa una tendencia a mayor cantidad de células eritroides en las condiciones eritroide y mieloide.

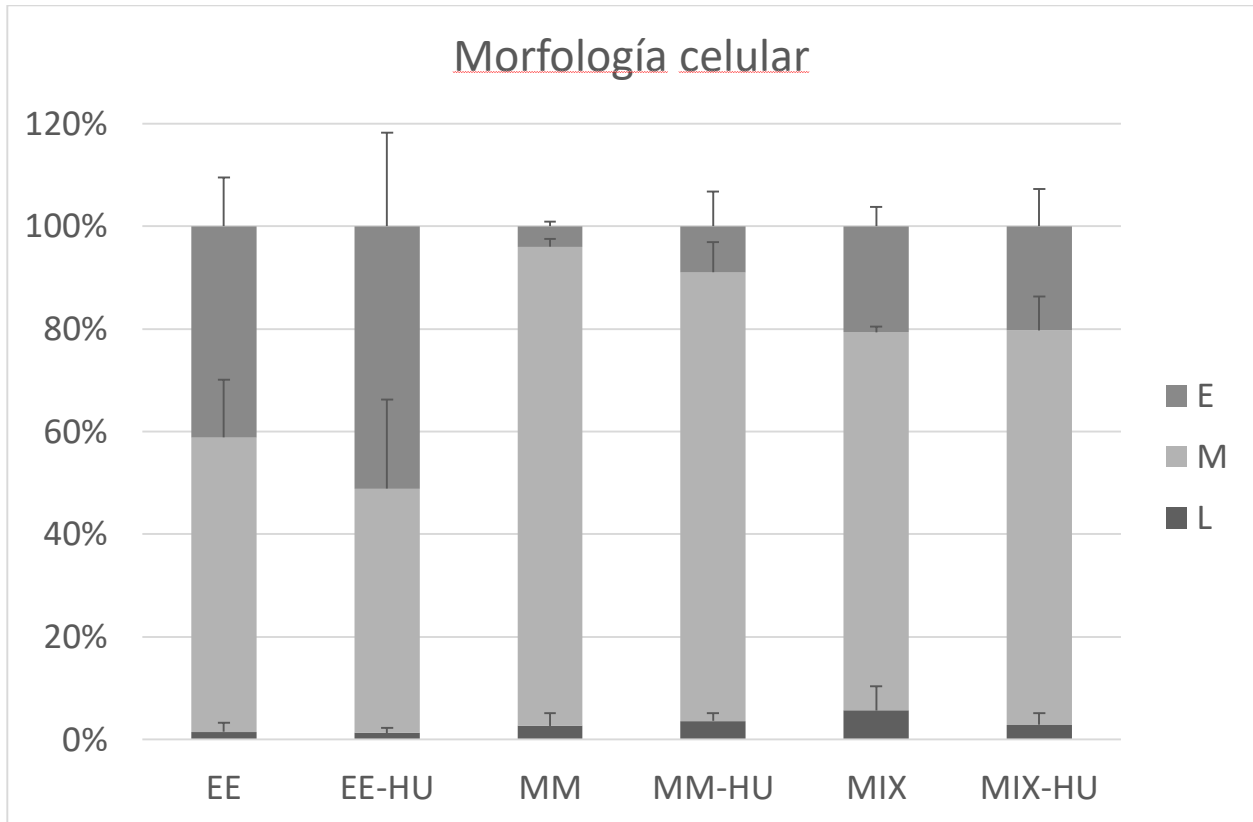


Figura 12. Morfología celular en las distintas condiciones de cultivo con y sin tratamiento previo con hidroxiurea. Se observa la proporción de las células con distinta morfología siendo E la morfología eritroide, M la mieloides y L la de linfoblastoide o no definida. EE: condiciones de cultivo eritroides, MM: condiciones de cultivo mieloides, Mix: Condiciones de cultivo mixto. HU: con tratamiento con hidroxiurea al día cero. No hay diferencia significativa entre células tratadas y no tratadas con HU para cada condición ($p < 0.05$ prueba post ANOVA Sidak y prueba T de Student) ($n = 3$ grupos no tratadas con HU; $n = 5$ grupos tratados con HU).

7. Tipos de colonias formadas

A pesar de que en la morfología no encontramos diferencias entre los grupos tratados, en los tipos de colonias si encontramos algunas diferencias interesantes.

Al día cero de cultivo, las células tratadas con hidroxiurea, observamos en la figura 3 hay un mayor número de colonias eritroides y mixtas; en términos de proporción o porcentaje, este dato se repite, el porcentaje de colonias eritroides y mixtas aumenta cuanto las células son tratadas con hidroxiurea (Figura 13).

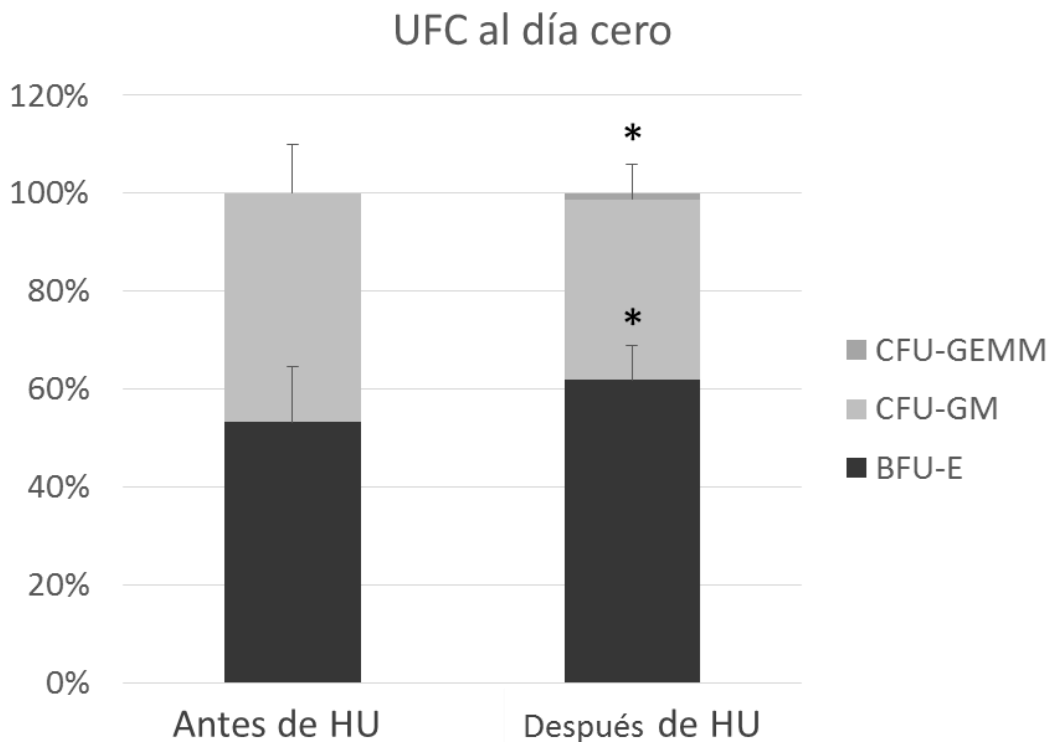


Figura 13. Porcentaje de UFC al día cero, antes y después del tratamiento con hidroxiurea. CFU-GEMM: colonias mixtas, CFU-GM: colonias mieloides; BFU-E: colonias eritroides. Se observa la diferencia significativa en el porcentaje de BFU-E y CFU-GEMM entre las células después del tratamiento con hidroxiurea y las antes o no tratadas. (*= diferencia significativa cuando $p < 0.05$, en prueba post ANOVA Sidak y prueba T de Student). (n=8).

Interesantemente, esta diferencia desaparece después de tres días de cultivo en cualquiera de las tres condiciones, como se observa en la figura 14, sin embargo, la tendencia en las condiciones eritroides parece ser contraria al día cero, es decir, las células no tratadas con hidroxiaurea parecen tener mayor cantidad de colonias eritroides, a diferencia en las condiciones mieloides y mixta donde no parece existir diferencia alguna entre las proporciones.

Por otro lado, la capacidad de formar colonias mixtas prácticamente desaparece, esto es esperado debido a que las citocinas utilizadas inducen la proliferación y diferenciación de las células, haciendo que los progenitores presentes en el cultivo sean menos primitivos que los del día cero.

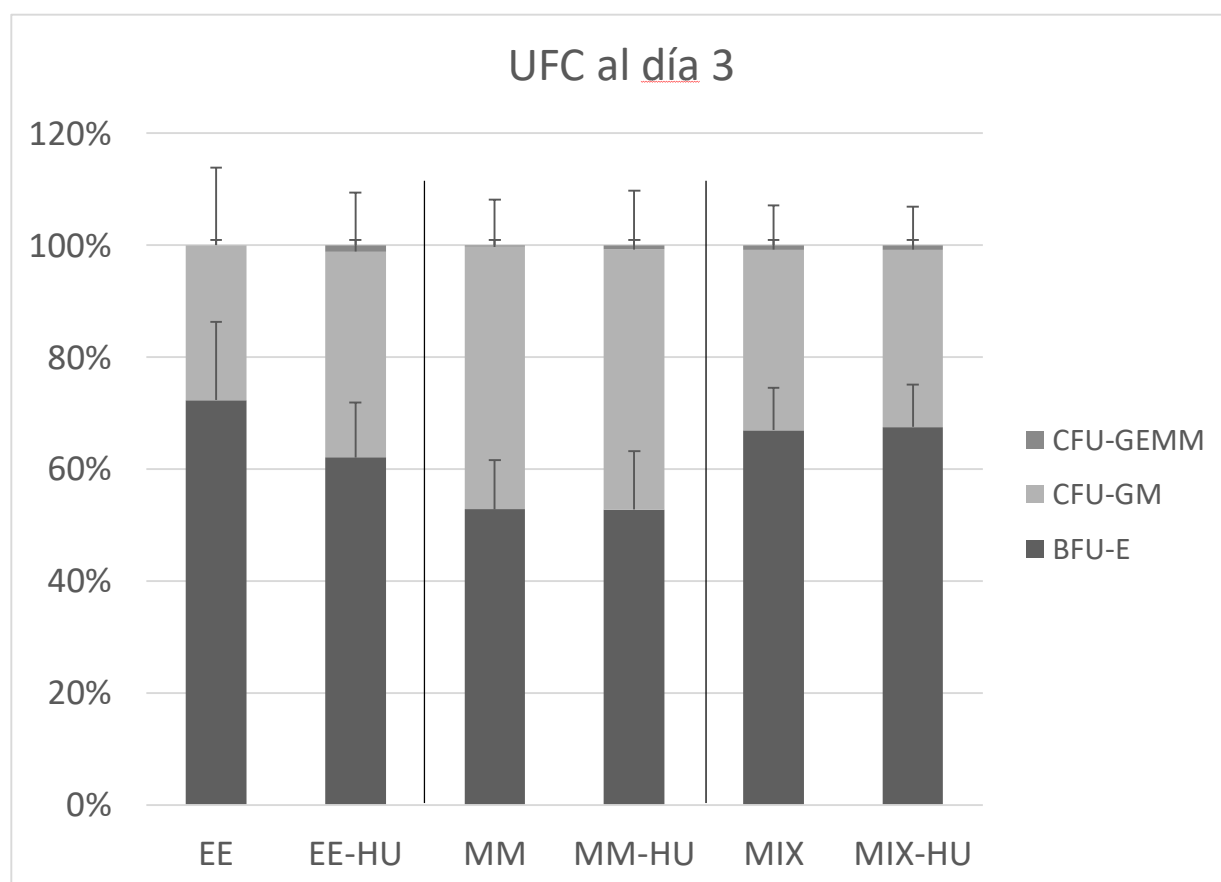


Figura 14. Porcentaje de UFC al día 3 de cultivo. EE: condiciones eritroides; MM: condiciones mieloides; MIX: condiciones mixtas. HU: células tratadas con hidroxiaurea al día cero. CFU-GEMM: colonias mixtas, CFU-GM: colonias mieloides; BFU-E: colonias eritroides. (*= diferencia significativa cuando $p < 0.05$, en prueba post ANOVA Sidak y prueba T de Student; células tratadas con HU versus no tratadas). (n=3 para grupos de células no tratadas con HU; n=8 para grupos de células tratadas con HU al día cero).

Sin embargo, al día ocho de cultivo, las diferencias significativas vuelven a aparecer, tanto en la condición eritroide como en la condición mixta, acorde con lo que se observó al día cero, las células que fueron tratadas con hidroxurea al día cero presentan en estas dos condiciones una mayor proporción de colonias eritroides (Figura 15).

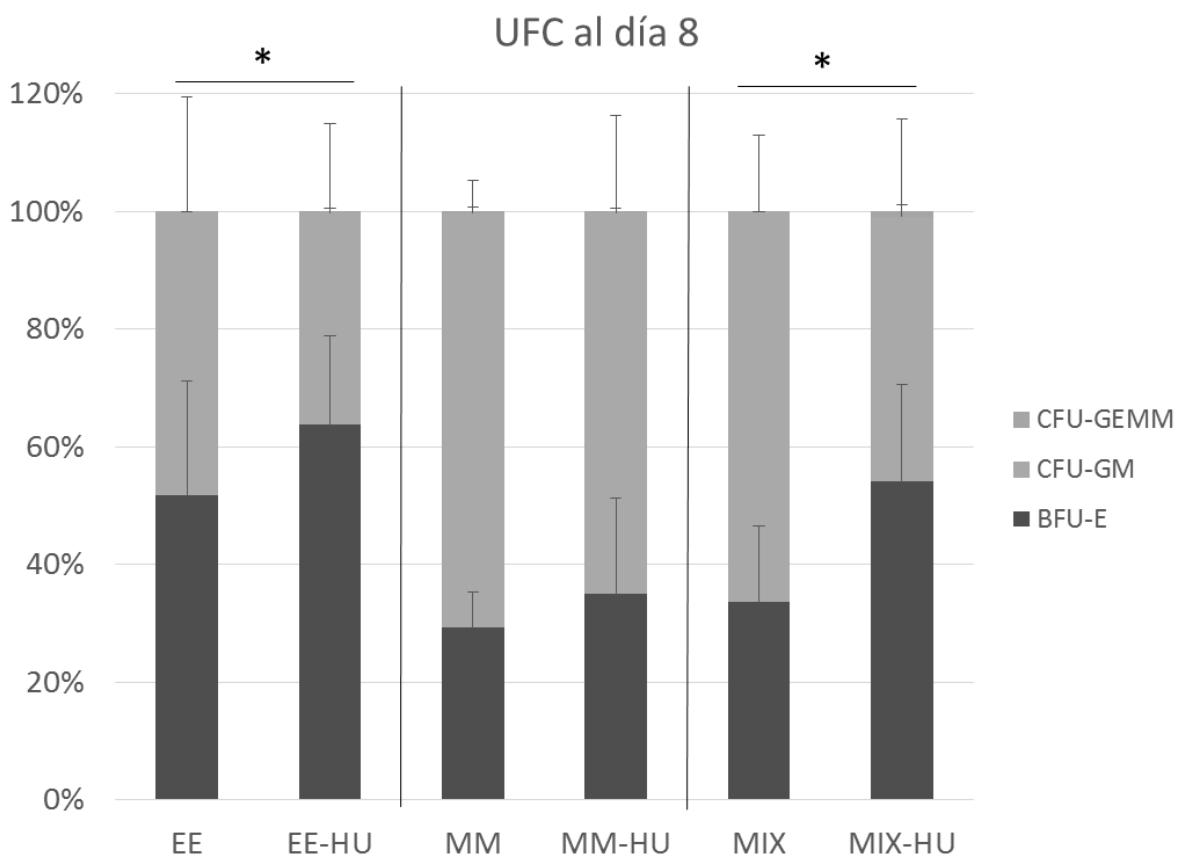


Figura 15. Porcentaje de UFC al día ocho de cultivo. EE: condiciones eritroides; MM: condiciones mieloides; MIX: condiciones mixtas. HU: células tratadas con hidroxurea al día cero. CFU-GEMM: colonias mixtas, CFU-GM: colonias mieloides; BFU-E: colonias eritroides. (*= diferencia significativa cuando $p < 0.05$, en prueba post ANOVA Sidak y prueba T de Student; células tratadas con HU versus no tratadas). (n=3 para grupos de células no tratadas con HU; n=8 para grupos de células tratadas con HU al día cero).

Con estos datos podemos observar que el tratamiento con hidroxiurea favorece la formación de colonias eritroides, tanto inmediatamente después del tratamiento como ocho días después de cultivo, en condiciones con citocinas eritroides presentes, es decir en un ambiente permisivo hacia el linaje eritroide.

En términos de ciclo celular, cuando se tratan a las células con hidroxiurea, se enriquece la población que se encuentra en G0/G1, podemos pensar que esta población tiene una tendencia a formar más progenitores eritroides que la población no sincronizada, es decir que contiene células en todas las fases del ciclo celular.

Para determinar si efectivamente encontramos una diferencia en la tendencia de formación de colonias por el estado de ciclo celular, se separaron las células por Cell Sorting con el marcador de ADN Vybrant Dye Cycle y se cultivaron en un medio permisivo hacia cualquiera de los dos linajes, es decir la condición mixta.

El comportamiento de las células que originalmente estaban en las fases G0/G1 del ciclo fue muy similar al de las células tratadas con hidroxiurea, cultivadas en las condiciones mixtas, sobre todo al día cero y ocho de cultivo. Sorprendentemente, la fracción G2/M presenta una mayor tendencia a formar colonias eritroides que la G0/G1, igualmente tanto al día cero como al día ocho (Figura 16).

Esto quiere decir que las poblaciones sin separar por ciclo, probablemente por comunicación celular, son capaces de diferenciar más progenitores mieloides, particularmente la población G0/G1, separada mediante cualquiera de los dos métodos, forma menos colonias mieloides que en combinación con las S/G2/M, pero no tantas colonias eritroides como la población G2/M. Al parecer esta población está fuertemente predeterminada para diferenciarse al linaje eritroide.

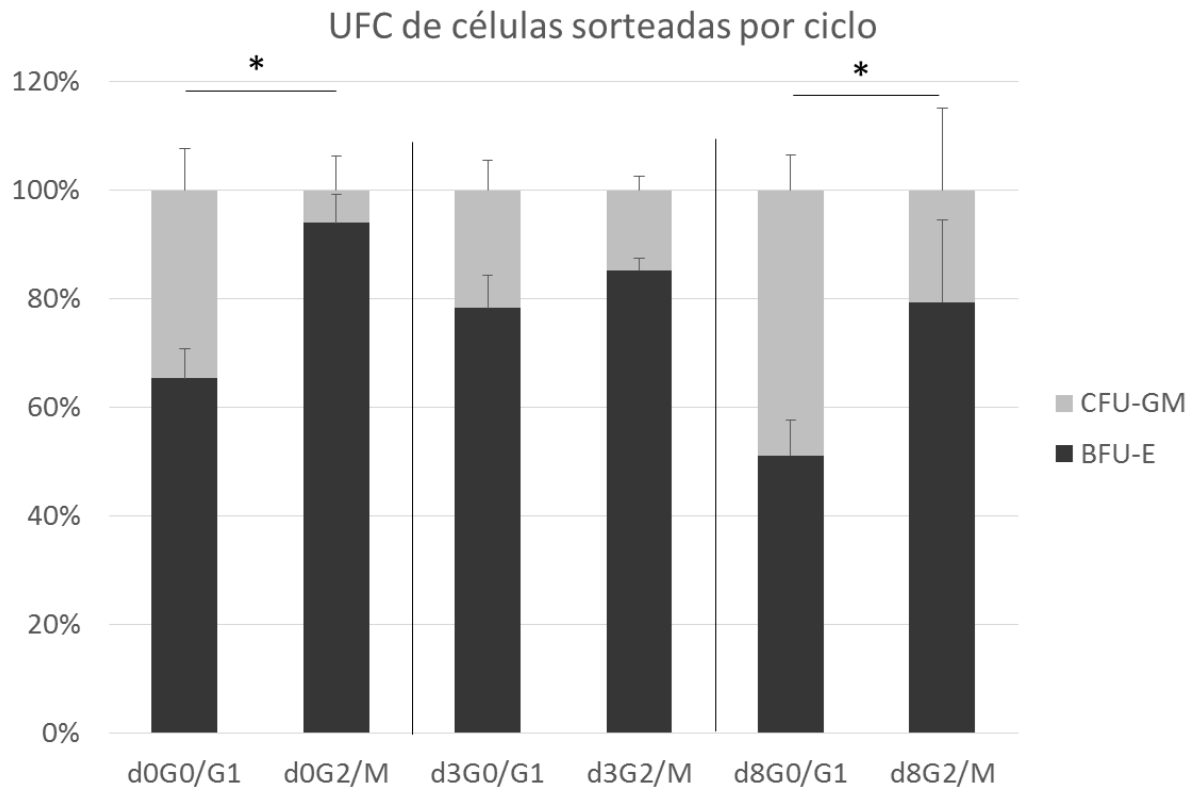


Figura 16. Porcentaje de UFC de células sorteadas por ciclo al día cero. D0: día cero; d3: día tres; d8: día ocho. CFU-GM: colonias mieloides; BFU-E: colonias eritroides. G0/G1: células separadas por cell sorting por fase de ciclo G0/G1 al día cero; G2/M: células separadas por cell sorting por fase de ciclo G2/M al día cero. (*= diferencia significativa cuando $p < 0.05$, en prueba post ANOVA Sidak y prueba T de Student; células tratadas con HU versus no tratadas). (n=3).

8. Cinética de proliferación de las células separadas por su fase de ciclo celular

Las células que se encontraban en las fases G0/G1 y G2/M se separaron por Cell Sorting y se cultivaron en las condiciones de cultivo mixto para realizar los experimentos de ensayos de colonias descritos anteriormente.

Durante el cultivo, se observó la cinética de proliferación y encontramos que las células que se encuentran inicialmente en las primeras fases del ciclo (G0/G1) tienen un potencial proliferativo más alto que las que se encontraban en G2/M (Figura 17).

Esto sugiere que, al estar separadas del resto de la población, las células terminan el ciclo, pero no todas reinician uno nuevo, ya sea porque permanezcan en G0 o porque se vayan a muerte celular. Cabe mencionar que las células en estas fases son más sensibles a cualquier tóxico, y la separación mediante Dye Cycle no es la excepción, ya que la viabilidad de las células no se encontraba por arriba del 40%, a pesar de que al momento de realizar el Cell Sorting se descartaron a las células muertas o en proceso de muerte.

Por lo tanto, es posible que las células más activas tengan menor potencial de proliferación por su naturaleza, o sea de manera indirecta por una entrada constante a muerte celular por parte de las mismas.

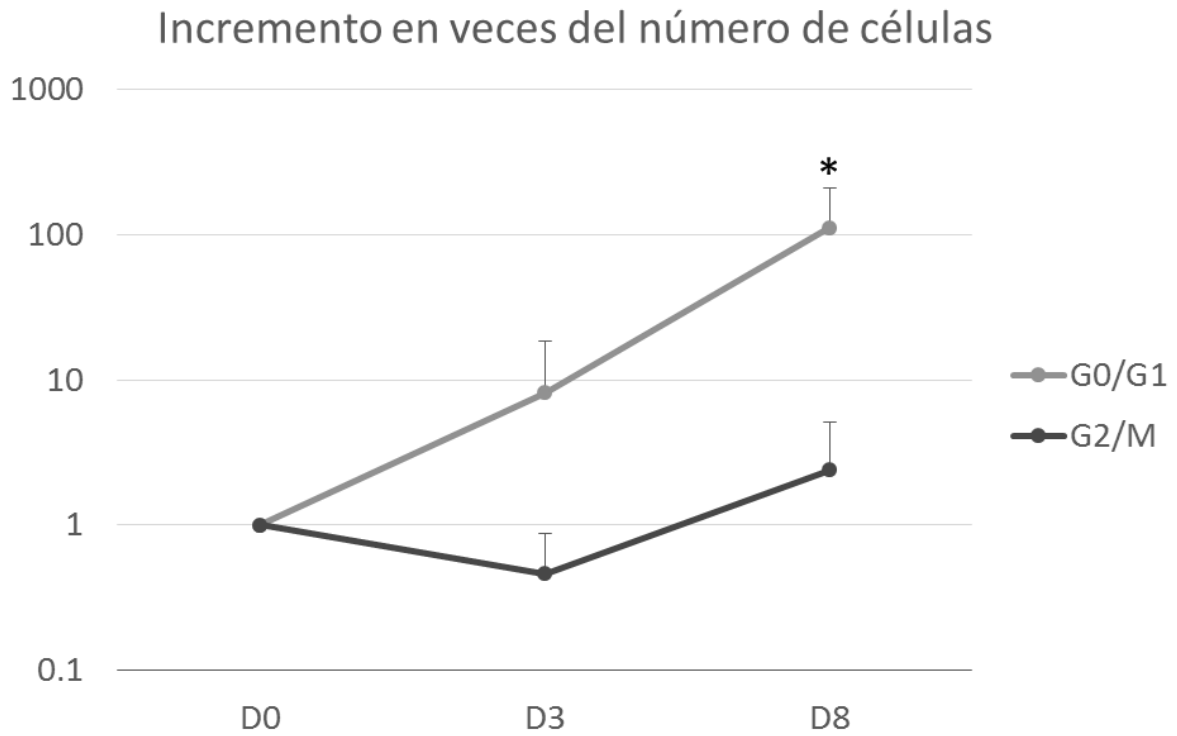


Figura 17. Cinética de proliferación de las células separadas por su fase en el ciclo celular. D0: día cero de cultivo; D3: día tres de cultivo; D8: día ocho de cultivo. (*=diferencia significativa cuando $p < 0.05$. Prueba post ANOVA Sidak. G0/G1 vs G2/M) ($n=3$).

9. Citometría de flujo

Para las células tratadas y no tratadas con hidroxiaurea, se midió el aumento de dos marcadores de linaje después de ocho días de cultivo en las tres condiciones de citocinas. Se midieron el receptor de eritropoyetina (EPO-R) y el receptor de G-CSF (CD114), el primero es característico de la diferenciación eritroide y el segundo de la diferenciación mielóide, particularmente de granulocitos. Se buscó si las células presentaban estos marcadores de diferenciación hematopoyética de manera preferente en alguna condición.

Para EPO-R, se encontró que solamente en las células que no fueron tratadas con hidroxiaurea, es decir, la población de células que incluye a todas las fases del ciclo celular, la expresión de EPO-R si fue preferente en un medio de diferenciación eritroide. En las células tratadas con hidroxiaurea, es decir las que están enriquecidas en células en fases G0/G1, la expresión de EPO-R se presenta al mismo nivel en las tres condiciones (Figuras 18 y 19). Esto nos indica que el tratamiento con hidroxiaurea predispone a las células a la diferenciación eritroide, como lo vimos en los ensayos de colonias, ya sea porque las células en G0/G1 tienen esa naturaleza o porque exista otro mecanismo de selección eritroide indirecto por parte de la hidroxiaurea.

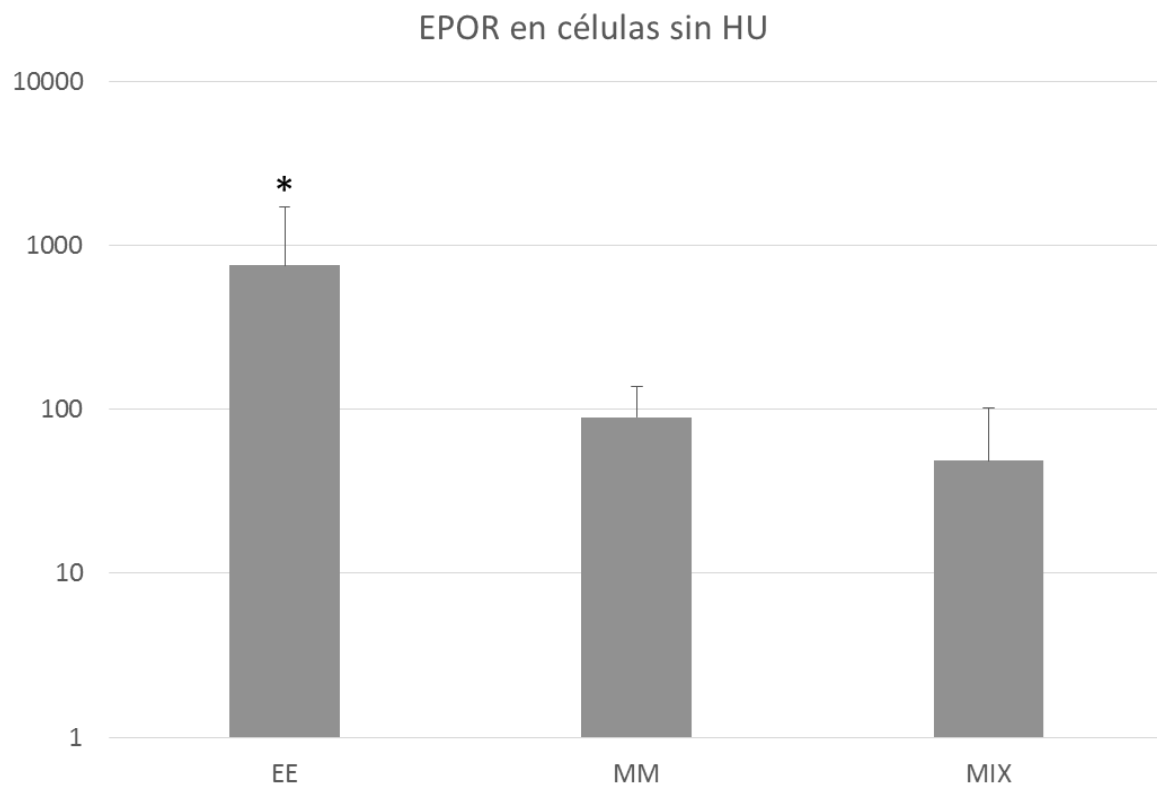


Figura 18. Incremento en veces de células que presentan EPO-R después de ocho días de cultivo en cada condición en células que no fueron previamente tratadas con hidroxiurea. EE: condición eritroide; MM: condición mieloide; MIX: Condición mixta. (*=diferencia significativa cuando $p < 0.05$. Prueba post ANOVA Sidak. EE vs MM y EE vs MIX) (n=3).

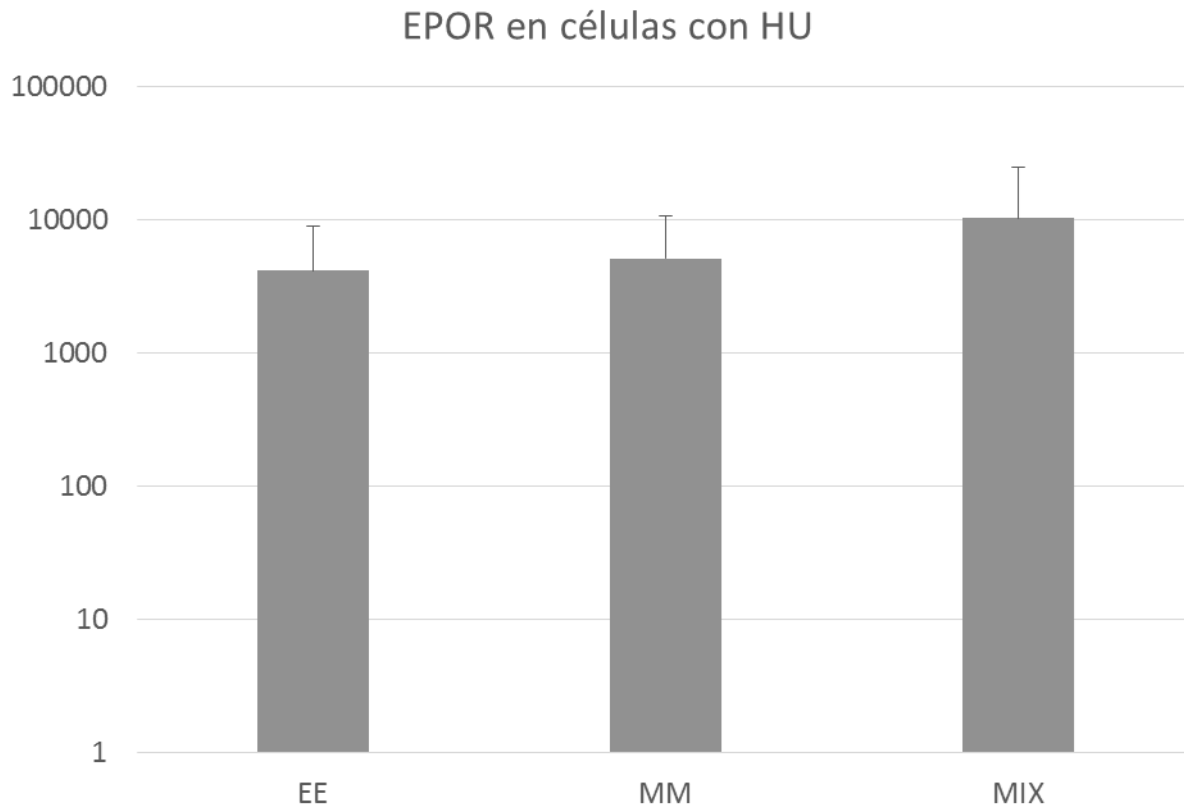


Figura 19. Incremento en veces de células que presentan EPO-R después de ocho días de cultivo en cada condición en células que fueron previamente tratadas con hidroxiurea. EE: condición eritroide; MM: condición mieloid; MIX: Condición mixta. (*=diferencia significativa cuando $p < 0.05$. Prueba post ANOVA Sidak. EE vs MM y EE vs MIX) (n=5).

Para las células positivas a CD114, después de ocho días de cultivo, un incremento similar en cualquiera de las tres condiciones, sin haber ninguna diferencia significativa. Las células previamente tratadas con hidroxiurea o no tratadas, tuvieron ese mismo comportamiento (Figuras 20 y 21). Esto nos sugiere que el papel de ciclo celular en la diferenciación hacia un linaje u otro, influye de manera más importante en el linaje eritroide, a través de EPO-R.

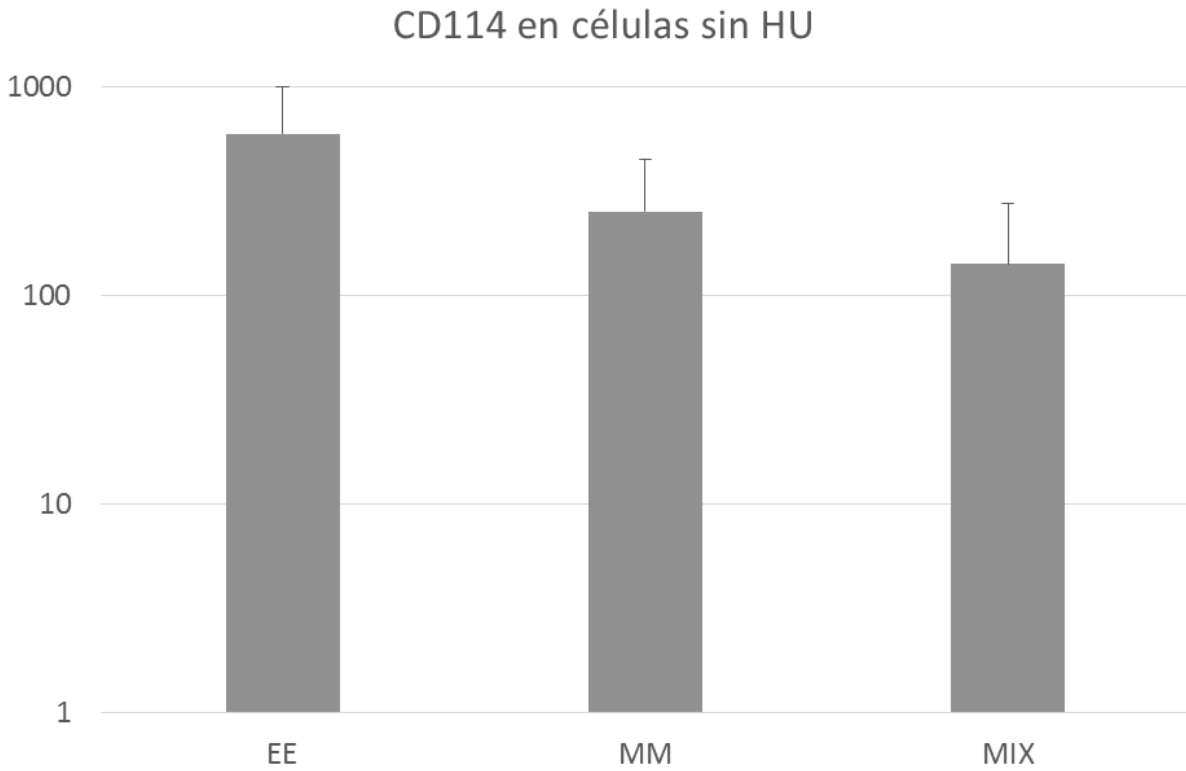


Figura 20. Incremento en veces de células que presentan CD114 después de ocho días de cultivo en cada condición en células que no fueron previamente tratadas con hidroxiurea. EE: condición eritroide; MM: condición mieloide; MIX: Condición mixta. (*=diferencia significativa cuando $p < 0.05$. Prueba post ANOVA Sidak. EE vs MM y EE vs MIX) (n=3).

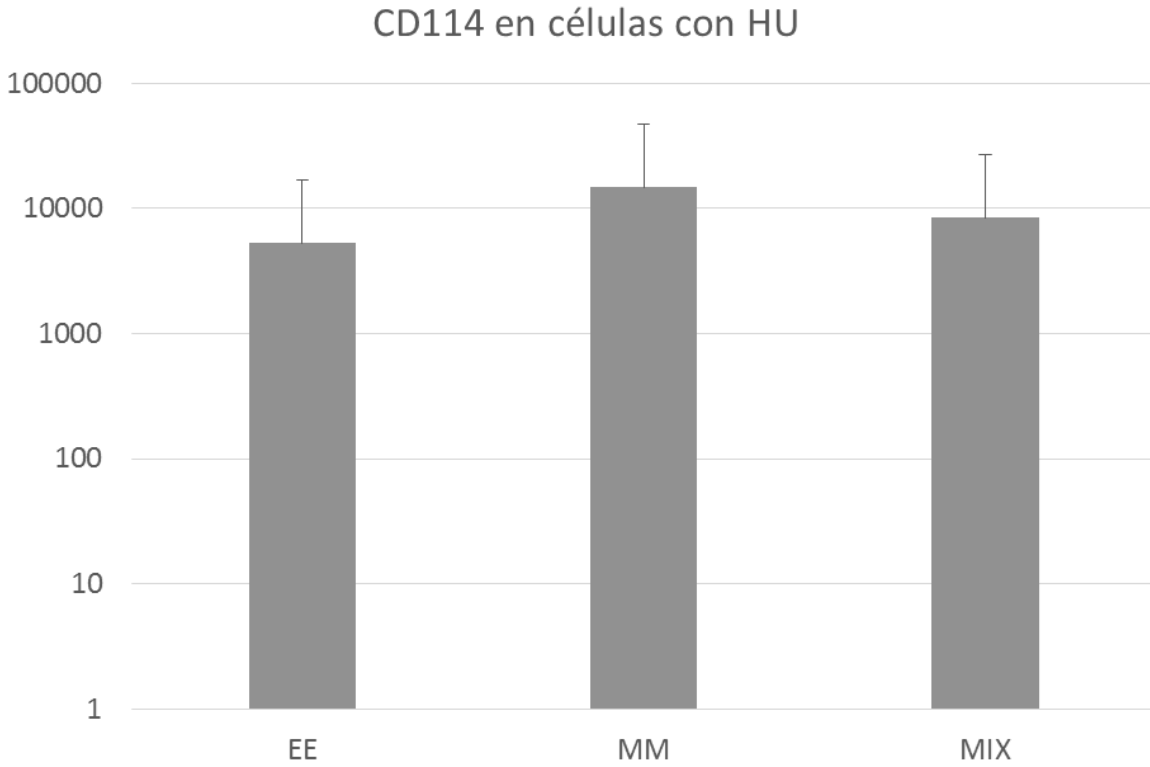


Figura 21. Incremento en veces de células que presentan CD114 después de ocho días de cultivo en cada condición en células que fueron previamente tratadas con hidroxurea. EE: condición eritroide; MM: condición mieloide; MIX: Condición mixta. (*=diferencia significativa cuando $p < 0.05$. Prueba post ANOVA Sidak. EE vs MM y EE vs MIX) (n=5).

DISCUSIÓN

En este trabajo se muestra que al menos en sangre de cordón umbilical, el ciclo celular tiene un papel importante en la diferenciación hacia los linajes mieloide y eritroide, de las células primitivas hematopoyéticas. Esto se suma a la evidencia postulada por el grupo del Dr. Peter Quesenberry de que en este tipo celular en ratón también es importante la fase del ciclo celular en que se encuentran para diferenciarse hacia un linaje u otro (Colvin G.A. *et al.* 2007).

El mecanismo principal de los efectos causados por la hidroxiurea es la disrupción de la enzima ribonucleótido-reductasa, inhibiendo así la progresión a través de la fase S y provocando que las células en esa fase mueran, evitando así también la presencia de células en G2/M y obteniendo una población enriquecida en las fases G0/G1. Sin embargo, se conocen otros mecanismos alternos al primero, por ejemplo, el tratamiento con hidroxiurea aumenta el estrés oxidativo en la célula a través de la mayor producción del radical hidroxil (Davies BW *et al.* 2009). Es por esto que no se descarta la posibilidad de que dichos mecanismos alternos, puedan estar ayudando a los efectos vistos en este trabajo, por ejemplo, si existiera una mayor muerte celular de los progenitores comprometidos al linaje mieloide. Sin embargo, los efectos vistos en este trabajo están presentes también al día ocho de cultivo, cuando las células ya no están en presencia de la hidroxiurea y que iniciaron siendo enriquecidas en G0/G1. Por otra parte, al separar las poblaciones por su estado en el ciclo celular, se observa que la población G0/G1 presenta el mismo comportamiento de diferenciación en los progenitores que las células previamente tratadas con hidroxiurea.

Existe además un mecanismo a través del cual se ha visto que es posible enriquecer a los progenitores BFU-E o eritroides y este es mediante el uso de glucocorticoides que sinergizan con HIF-1 α para esto (Fkygare J. *et al.* 2011). La hidroxiurea en cambio, tiene un papel importante en la disminución de HIF-1 α (da Guarda CC. *et al.* 2016). Entonces, la hidroxiurea no puede estar causando el enriquecimiento de BFU-Es mediante este mecanismo.

Así mismo, se conoce que las células hematopoyéticas más quiescentes, o en estado G0, se encuentran típicamente en microambientes más hipóxicos, dichas condiciones hacen que haya una expresión más alta de HIF1- α , por lo que puede ser mediante este mecanismo que las células en estos estados del ciclo sean más tendenciosas a formar colonias eritroides. Es importante realizar experimentos para comprobar esta hipótesis.

Por otro lado, es importante destacar que la diferenciación, como se observa, no es puramente hacia un solo linaje a pesar de las citocinas utilizadas. Es decir, en las condiciones eritroides también encontramos diferenciación mieloide y en la mieloide encontramos diferenciación eritroide. Esto es probable que sea debido a las citocinas que no son específicas hacia un linaje y que son utilizadas en estos cultivos: SCF, IL-6, IL-3 y TPO y a que las citocinas, aunque activan diferentes receptores, se mueven en general mediante la misma vía: la vía de Jak/Stat, por lo que las señales pueden entrecruzarse en la misma célula y generar distintos fenotipos (Staerk J and Constantinescu SN. 2012).

Poco se sabe sobre la influencia de la hidroxiurea en el linaje eritroide. Se ha demostrado que tiene un efecto en la producción de hemoglobina fetal en los eritrocitos, de tal modo que la hidroxiurea funciona como un potencial tratamiento para la anemia falciforme, ya que incrementa la producción de hemoglobina fetal en eritroblastos basofílicos, permitiendo una mejor absorción de oxígeno. Esto se ha explicado por distintos mecanismos, uno de ellos es mediante la producción de óxido nítrico (Cokic V.P. et al. 2003) y por otra parte por el incremento en la producción de gamma globina que hace que disminuya la expresión de genes como BCL11A, KLF1 y TAL1 (Grieco AJ et al. 2015).

La estimulación con citocinas eritroides y los progenitores eritroides causan y tienen una mayor tasa de proliferación que el estímulo con citocinas mieloides o los progenitores mieloides (Mayani H. Lansdorp PM. 1995). Sin embargo, como se observó en este trabajo, el tratamiento con hidroxiurea causa una mayor tasa de proliferación en las células estimuladas con citocinas mieloides que las células no tratadas previamente con hidroxiurea.

Esto puede explicarse en parte porque la hidroxiurea, según lo observado en este trabajo, ayuda a la expansión de células EPO-R+ en condiciones mieloides tanto como en las eritroides, resultando en una tendencia a formar más BFU-Es también en condiciones mieloides. Sin embargo, este dato no es significativo y además hay mayor proporción de colonias mieloides en estas condiciones, sugiriendo que hay un receptor además de EPO-R o un factor distinto que puede estar presente en células mieloides, eritroides o ambas en el tratamiento con hidroxiurea y que permita una mayor proliferación específicamente bajo estas condiciones. Puede ser que dicho factor sea activado por las citocinas presentes en la condición mioide y que active la vía de Jak/Stat, que como se mencionó previamente es la vía normalmente activada por las citocinas utilizadas en este estudio y que permite la proliferación celular.

Como se vio en nuestros resultados, el tipo de colonias formadas cuando las poblaciones G0/G1 y S/G2/M están juntas, es diferente que cuando están por separado. En este caso, la comunicación entre células y el tipo de moléculas que secretan al microambiente es crucial para determinar el porqué de esta diferencia.

En este sentido se ha visto, por ejemplo, que los progenitores hematopoyéticos en estado G1 del ciclo celular, influyen la movilidad y la capacidad de injerto de las células que se encuentran en G0 mediante la secreción de metaloproteinasas 2 y 9 de las células en G1 (Byk T, et al. 2005). La importancia de la comunicación celular para el ciclo se ha visto también en la clínica, donde las células primitivas de la médula ósea de los receptores, entran en un estrés replicativo, de tal forma que presentan cuatro veces más células en estados S/G2/M que las células primitivas de médula ósea de los donadores (Thornley I, et al. 2001).

En este trabajo también se observó que después de ocho días de cultivo, independientemente de las condiciones, había una mayor presencia de células en las últimas fases del ciclo. Esto sugiere que la fase S en este punto del cultivo es más larga que en los puntos anteriores y esto se ha visto que puede ser un marcador de que las células han perdido su primitividad y su potencialidad y han ganado características de maduración y diferenciación (Wang L, et al. 2017), lo cual cuadra con el hecho de que la morfología puede leerse únicamente a partir de ese día de cultivo.

El mecanismo a través del cual las células pueden estar más inclinadas a diferenciarse hacia un linaje u otro cuando están en una fase u otra del ciclo celular no está aún bien establecido. Puede explicarse por los cambios que presenta en el citoesqueleto durante las distintas fases resultado en la formación de diferentes clusters de receptores o en la sobre-expresión de diferentes genes como HIF-1 α , de cualquier modo, estos mecanismos aún necesitan exploración.

Para resumir, los datos mostrados en este trabajo, sugieren que hay diferencias importantes entre la tasa de proliferación dependiendo del estado de ciclo en que se encuentren las células y el estímulo que reciban. También que la población G0/G1 tiene una ligera sobre producción de células eritroides o progenitores BFU-E que se enmascara cuando se encuentra en conjunto con la población S/G2/M; sin embargo, la población G2/M sola, enriquece los progenitores eritroides de manera más importante, sugiriendo que la comunicación entre ambas poblaciones permite la mayor presencia de progenitores mieloides o CFU-GMs.

CONCLUSIONES

- El estado del ciclo celular en que se encuentra una población de progenitores hematopoyéticos es un factor influyente en la decisión de la diferenciación particularmente hacia el linaje eritroide, ya que una población en fase activa es respondiente a generar progenitores eritroides más que cualquier otra población (G0/G1 o población no separada ni tratada con HU), así mismo, la población no separada ni tratada con HU, tiene una tendencia a generar más progenitores mieloides.
- Cuando la población celular se encuentra separada por su estado en el ciclo, la tendencia a diferenciarse al linaje eritroide es mayor; esto sucede tanto en la población G0/G1 como en la G2/M, aunque es en esta última donde este fenómeno se ve exacerbado.
- En cambio, cuando la población no está sincronizada ni separada, sino que encontramos todas las fases del ciclo celular en ella, la tendencia de diferenciación es a formar ambos linajes (mieloide y eritroide) de forma equitativa.
- El tratamiento con hidroxurea enriquece las unidades formadoras de colonias, lo cual nos habla de que estas expresan su potencial de mejor manera cuando están en G0/G1
- Dicho tratamiento enriquece principalmente progenitores eritroides y mixtos, aunque, por otra parte, los progenitores mieloides en este tratamiento alcanzan potenciales de proliferación tan altos como los eritroides.
- Así mismo se observa que la población G0/G1 por separado tiene mayor capacidad proliferativa que la G2/M.

PERSPECTIVAS

- A partir de los resultados obtenidos se puede hacer la búsqueda de expresión de genes como por ejemplo HIF1 α , para ver si está más presente en algún estado de ciclo celular en particular. Así mismo observar si la sobreexpresión del mismo induce un aumento en las colonias eritroides las células primitivas humanas de sangre de cordón umbilical. Esto debido a que HIF1 α se expresa en condiciones de hipoxia, donde puede haber una tendencia de diferenciación hacia el linaje eritroide. Por otra parte, las células en condiciones hipóxicas tienen un mayor potencial de proliferación.
- Observar mediante ensayos de ELISA las moléculas que son secretadas por las células en cultivo en las diferentes condiciones utilizadas, cuando las células son tratadas con hidroxurea en comparación con las que no y con las separadas por su estado de ciclo. Esto con el fin de dilucidar qué parte de las interacciones entre las células influye en la tendencia de diferenciación o en los cambios en el potencial de diferenciación.
- Buscar la expresión de genes en todas las condiciones y observar cuáles son aquellos que se expresan o no y permiten así la tendencia de diferenciación distinta según el estado del ciclo celular.
- Separar poblaciones celulares por inmunofenotipo que es característico de los linajes eritroide y mieloide y observar la proporción de células en la población que se encuentran en los distintos estados del ciclo celular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts B, Bray D. 2006. Introducción a la Biología Celular. Editorial Médica Panamericana. 842 pp.
- Beutler E. *et al.* 2001. Hematología. Mc Graw Hill. 1040pp.
- Bojanic I. *et al.* 2009. Collection of hematopoietic progenitor cells from healthy donors. Acta Medic Croatica. Vol 63. No. 3. 237-244.
- Bowie MB. *et al.* 2006. Hematopoietic stem cells proliferate until after birth and show a reversible phase-specific engraftment defect. The Journal of Clinical Investigation. Vol. 116. No. 10. 2808-2816.
- Brown JA, Vassiliki A, Boussiotis, 2008. Umbilical cord blood transplantation: basic biology and clinical challenges to immune reconstitution. Clinical Immunology. Vol. 127. No. 3. 286-297.
- Byk T, *et al.* 2005. Cycling G1 CD34⁺/CD38⁺ cells potentiate the motility and engraftment of quiescent G0/CD34⁺/CD38^{-low} severe combined immunodeficiency repopulating cells. Stem Cells. Vol 23: 561-574.
- Cediél J.F. *et al.* 2009. Manual de histología: Tejidos fundamentales. Colección Lecciones de Medicina. Universidad del Rosario. Bogotá, Colombia. 256 pp.
- Cokic V.P. *et al.* 2003. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. Journal of clinical investigation. Vol 111. 231-239.
- Colvin G.A. *et al.* 2007. Stem cell continuum: Directed differentiation hotspots. Experimental Hematology. Vol. 35. 96-107 pp.

- Dalton S y Coverdell P.D. 2015. Linking the cell cycle to cell fate decisions. Trends in Cellular Biology. Vol 25. No. 10. 592-600 pp.
- Dexter TM *et al.* 1978. Stimulation of differentiation and proliferation of haematopoietic cells *in vitro*. Journal of Cell Physiology. Vol. 82. 461-470.
- Fkygare J. et al. 2011. HIF1 α synergizes with glucocorticoids to promote BFU-E progenitor self-renewal. Blood. Vol 117. No. 12. 3435-3444.
- Flores-Guzmán P, Gutiérrez-Rodríguez M y Mayani H. 2002. In vitro proliferation, expansión and differentiation of a CD34+ cell-enriched hematopoietic cell population from umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. Archives of Medical Research. Vol. 33. 107-114.
- Flores Guzmán P. 2006. Proliferación y expansión in vitro de células progenitoras hematopoyéticas humanas presentes en la sangre de cordón umbilical. Tesis para obtener el grado de Doctora en ciencias Biomédicas. 141 pp.
- Gal I.B. *et al.* 2007. Bases de la Fisiología. 2ª edición. Editorial Tébar. España. 626 pp.
- Gluckman E, *et al.* 1989. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. The New England Journal of Medicine. Vol 321. No. 17. 1174-1178.
- Grieco AJ *et al.* 2015. Variation in gamma-globin expression before and after induction with hydroxyurea associated with BCL11A, KLF1 and TAL1. PLOS one. DOI:10.1371/journal.pone.0129431.

- da Guarda CC. *et al.* 2016. Heme changes HIF α , e-NOS, and nitrite production in HUVECs after simvastatin, HU, and ascorbic therapies. *Microvascular Research*. Vol 106. 128-136.
- Habibian H.K. *et al.* 1998. The fluctuating phenotype of lymphohematopoietic stem cell with cell cycle Transit. *Journal of Experimental Medicine*. Vol 188. 393-398 pp.
- Hoffman R. *et al.* 1993. The *in vitro* and *in vivo* effects of stem cell factor on human hematopoiesis. *Stem Cells*. Vol 2. 76-82.
- Lodish H. 2005. *Biología celular y molecular*. Editorial Médica Panamericana. 973 pp.
- Madaan K. *et al.* 2014. Hydroxyurea: a key player in cáncer chemotherapy
- Marín Llera Jessica, Chimal Monroy Jesús. 2017. Conceptos básicos de la biología de las células troncales. En: Chávez González MA, et al. *Células troncales. Biología y aplicaciones en biomedicina*. (pp15-36) Ciudad de México, México: Editorial: Grupo Editorial Grañen Porrúa.
- Mayani H. Lansdorp PM. 1995. Proliferation of individual progenitors purified from umbilical cord blood. *Experimental Hematology*. Vol 23. No. 14. 1453-1462.
- Mayani H. 2003. A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Archives of Medical Research*. Vol 34. 3-15.
- Mayani H. *et al.* 2007. Hematopoyesis. *Cancerología* 2. 95-107.

- Mayani H. 2010. Biological differences between neonatal and adult human hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells and Development*. Vol 19. No. 3. 285-298.
- Mohty M y Ho AD. 2011. In and out of the niche: perspectives in mobilization of hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology*. Vol 39. 723-729.
- Novelo *et al.* 2008. Establishing a cord blood banking and transplantation program in Mexico: a single institution experience. *Transplantation and cellular engineering*. Vol. 48. 228-236 pp.
- Pelayo R y Vadillo E. 2011. El Sistema hematopoyético a partir de las células troncales. En: Pelayo R. et al. *Células Troncales y Medicina Regenerativa* (pp 143-170). Ciudad de México, México. Editorial: Programa Universitario de Investigación en Salud.
- Pietras EM. *et al.* 2011. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *Journal of Cell Biology*. Vol 195. No. 5. 709-720.
- Pietras E.M. *et al.* 2015. Functionally distinct subsets of lineage-biased multipotent progenitors control blood production in normal and regenerative conditions. *Cell Stem Cell*. Vol 17. 35-46.
- Pineault N y Khader AA. 2015. Advances in umbilical cord blood stem cell expansion and clinical translation. *Experimental Hematology*. Vol 43. 498-513.
- Quesenberry P.J. *et al.* 2010. Expression of cell cycle-related genes with cytokine-induced cell cycle progression of primitive hematopoietic stem cells. *Stem cells and development*. Vol 19. 453-460 pp.

- Rodak FB. 2005. Hematología: Fundamentos y aplicaciones clínicas. 2ª Edición. Montevideo, Uruguay. Editorial Médica Panamericana. 838pp.
- Ross MH, Pawlina W. 2007. Histología. Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular. Editorial Médica Panamericana. 5ª edición. 974P.
- Singh A y Xu Young-Jie. 2016. The killing mechanisms of hydroxyurea. Genes. 7, 99.
- Staerk J and Constantinescu SN. 2012. The JAK-STAT pathway and hematopoietic stem cells from the JAK2 V617F perspective. JAKSTAT. Vol 1. No. 3. 184-190.
- Till J.E., McCulloch E. A., Siminovich L, 1963. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells.
- Walkley CR y Orkin SH. 2006. Rb is dispensable for self-renewal and multilineage differentiation of adult hematopoietic stem cells. PNAS. Vol. 103. 9057-9062.
- Welsch U, Sobotta J. 2008. Histología. Editorial Médica Panamericana. 676 pp.