



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LAS MOLÉCULAS UM171 Y OAC-1 EN
EL CULTIVO *in vitro* DE CÉLULAS TRONCALES Y
PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS HUMANAS DE
SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ARANXA TORRES CABALLERO

TUTOR

DR. HÉCTOR MAYANI VIVEROS



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. Mx., 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Biblioteca Central

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Aranxa Torres Caballero

Correo electrónico: aranxa_tc@ciencias.unam.mx

Teléfono: 55 34 52 37 56

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

Número de cuenta: 31258659-1

2. Datos del tutor

Dr.Héctor Mayani Viveros

3. Datos del sinodal 1

Dra. Patricia Rivas Manzano

4. Datos del sinodal 2

Dra. María Antonieta Chávez González

5. Datos del sinodal 3

Dr.Genaro Vázquez Victorio

6. Datos del sinodal 4

Dra. Rosario Ortiz Hernández

7. Datos de la tesis

Efecto de las moléculas UM171 y OAC-1 en el cultivo *in vitro* de células troncales y progenitoras hematopoyéticas humanas de sangre de cordón umbilical.

96 p.

2021

Agradecimientos

A mis padres, por todo el apoyo que me dan siempre, por siempre impulsarme a seguir mis sueños y que sin ustedes no hubiera podido llegar hasta donde estoy ahora. Los amo siempre.

A mi asesor y profesor favorito durante la carrera, Dr. Héctor Mayani, una gran inspiración para mí. Gracias a usted encontré mi pasión por las células troncales y por creer en mí desde el inicio. Siempre me daba mucha emoción entrar a sus clases e imaginarme que algún día iba a trabajar en un laboratorio de investigación de células troncales, gracias por darme la oportunidad de trabajar con usted.

A la Dra. Patricia Flores por todas sus enseñanzas en el laboratorio, sin usted no hubiera podido llevar a cabo mis experimentos. A Nachito y Luis por su disposición para ayudar y apoyar en el laboratorio.

A la Dra. Rosario Ortiz por su apoyo y por siempre estar dispuesta a ayudarme y escucharme a lo largo de la carrera, por darme consejos y por escucharme cuando tenía días malos.

A la Dra. Patricia Ramos por sus clases, enseñanzas y por su valioso apoyo y revisión de esta tesis, recuerdo con mucho cariño sus clases.

A la Dra. María Antonieta Chávez, por su disposición en hacerme correcciones y comentarios para este trabajo y por siempre estar dispuesta a ayudarme en la unidad.

Al Dr. Genaro Vázquez por ser un gran profesor y siempre darme la oportunidad de acercarme a la biología celular desde los primeros semestres de la carrera.

A mis amigas Marisol Navarro, Karina Díaz y Andrea Alfaro, mis primeras amigas de la carrera que siempre estuvieron para apoyarme y escucharme cuando más lo necesitaba y porque con ustedes viví momentos muy inolvidables.

A Samantha Ordoñez y Carolina Bobadilla amigas que llegaron a la mitad del camino

pero que se quedaron conmigo al final de la carrera. Gracias por estar. Las quiero.

A Edgar Abarca, por tu ayuda cuando inicié la carrera y porque te recuerdo con cariño y admiración.

A mis amigos de toda la vida Andrés, Almu, Joshua, Germán, Julia, Regina que siempre han estado conmigo en las buenas y en las malas. Gracias por siempre estar para escucharme y apoyarme. Los quiero.

Resumen

Desde el descubrimiento y la implementación de las células troncales hematopoyéticas humanas (CTH) como estrategia terapéutica central para el tratamiento de varios trastornos hematológicos, la producción y extracción de estas células ha generado un gran interés, estableciendo el trasplante hematopoyético, a partir de sangre cordón umbilical humana (SCU) como fuente alternativa de células troncales y progenitoras hematopoyéticas (CTyPH). Sin embargo, debido al rendimiento marginal de las células extraídas en este procedimiento, se han desarrollado varios protocolos de expansión *ex vivo* de CTyPH derivadas de SCU, mediante el proceso de cultivo de dichas células en diferentes condiciones *in vitro*, como la adición de citocinas hematopoyéticas.

Debido a varios desarrollos en el campo, y además de las citocinas de expansión, recientemente se ha investigado el uso de dos moléculas pequeñas: UM171 (un derivado de pirimido-indol) y OAC-1 (un activador de OCT4), pero no se habían evaluado en conjunto.

En este trabajo, se estudiaron sus efectos sobre la expansión, la proliferación y el inmunofenotipo de en 4 poblaciones diferentes de SCU: cultivos de células mononucleares (CMN), células enriquecidas (Lin-CD34 +) y células purificadas (Lin-CD34 + y Lin-CD34-). Después de la experimentación, no se observó ningún efecto sobre la proliferación ni la expansión en las células mononucleares mientras estaba en presencia de UM171, OAC-1 o la combinación de ambos.

No obstante, la presencia de UM171 en cultivos de células enriquecidas (Lin-CD34+) y células purificadas (CD34+) , proporcionó un incremento en el número total de células sobre todos los demás tratamientos. Además, la presencia de este fármaco favoreció la expansión de los progenitores totales, específicamente de los progenitores mieloides. Asimismo, esta molécula permitió el mantenimiento de la expresión del marcador CD34 después del día 10 en cultivo y presentó mayores números de LTC-IC.

En las células purificadas, hubo una tendencia a presentar mayor expansión en aquellos cultivos con ambas moléculas independientemente de que no se observaran diferencias significativas.

Los resultados proporcionados sugieren que incluir a la molécula UM171 en cultivos para fines de expansión *in vitro*, podría proporcionar una alternativa para un protocolo de expansión con moléculas pequeñas y citocinas a partir de células derivadas de SCU, enriquecidas o purificadas CD34+ en nuestro laboratorio.

Abstract

Since the discovery and implementation of human hematopoietic stem cells (HSCs) as a core therapeutic strategy for the treatment of several hematological disorders, the production and extraction of these cells has generated great interest – establishing the hematopoietic transplant, by use of the human umbilical cord blood (UCB), as an alternative source of hematopoietic stem and hematopoietic progenitor cells (HSC and HPC respectively). However, due to the marginal yield of extracted cells in this procedure, several *ex vivo* expansion protocols of UCB-derived HSCs and HPCs have been developed, by process of culturing such cells within different in vitro conditions, like hematopoietic cytokines. Due to several developments in the field, and in addition to expansion cytokines, the use of two small-molecules will be presently proposed as alternative: UM171 (a pyrimido-indole derivative) and OAC-1 (an OCT4 activator), of which their effects during expansion, proliferation, and immunophenotype were analyzed across 4 different UCB populations: mononuclear cells (MNC), enriched HPC (Lin-CD34+), purified (Lin-CD34+), and purified (Lin-CD34-) cultures. After experimentation, no effect was noticed over proliferation nor expansion in mononuclear cells while in tandem with UM171, OAC1, or the combination of both.

Whereas, the presence of UM171 in cultures of enriched (Lin-CD34+), and purified CD34+, provided an increment in the total cell numbers over all other treatments. Moreover, the presence of UM171 favored the expansion of total progenitors specifically myeloid progenitors. Also, UM171 allowed the maintenance of the CD34 expression after day 10 in culture and presented higher numbers of LTC-IC.

In purified cells, there was a tendency to present more expansion on those cultures with both molecules regardless no significant differences were observed.

The provided results suggest UM171 as a potential candidate for *in vitro* conditions for expansion, over OAC-1 leading to the perception of a new small-molecule and cytokine protocol alternative within the scope of culturing UCB-derived cells in our

laboratory.

Abreviaturas

BFU-E- Unidad formadora de brote eritroide
CD- Grupos de diferenciación
CFC- Células formadoras de colonias
CFU-E- Unidad formadora de colonias eritroides
CFU-G- Unidad formadora de colonias de granulocitos
CFU-GM- Unidad formadora de colonias de granulo-monocíticas
CFU-M- Unidad formadora de colonias de mieloides
CFU-Mix- Unidad formadora de colonias de mixtas
CMN- Células mononucleares
CNT- Células nucleadas totales
CPH- Célula progenitora hematopoyética
CTH- Célula troncal hematopoyéticas
CTyPH- Células troncales y progenitoras hematopoyéticas
FACS- Separación de células por activación de fluorescencia
Flt3-l- Ligando de FLT-3
IL- Interleucina
Lin- Linaje
LTC-IC- Célula iniciadora de cultivo a largo plazo
MO- Médula ósea
PBS- Buffer salino de fosfatos
SCF- Factor de células troncales
SCU- Sangre de cordón umbilical
SFB- Suero fetal bovino
SPM- Sangre periférica movilizada
TPO- Trombopoyetina
UFC- Unidades formadoras de colonias

Índice general

Agradecimientos	II
Resumen	IV
Abstract	VI
Abreviaturas	VIII
1. Introducción	1
1.1. Sangre y hematopoyesis	2
1.1.1. Primeros estudios de la hematopoyesis	3
1.1.2. ¿Qué es la hematopoyesis?	4
1.1.3. Organización del sistema hematopoyético y características de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas	4
1.1.4. Inmunofenotipo	7
1.2. Regulación de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas . .	11
1.3. Estudio de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas . . .	12
1.4. Fuentes de obtención de células troncales y progenitoras hematopoyéticas	14
1.4.1. Médula ósea y sangre periférica movilizada	15
1.4.2. Una fuente alternativa: sangre de cordón umbilical	16
1.4.3. Ventajas y desventajas del uso de la sangre de cordón umbilical para trasplantes hematopoyéticos	17
2. Antecedentes	21
2.1. Expansión <i>ex vivo</i> de células troncales y progenitoras hematopoyéticas	21
2.1.1. Enfoques experimentales	22
2.2. Moléculas pequeñas	27
2.2.1. UM171	29

2.2.2. OAC-1	31
3. Planteamiento, justificación e hipótesis	33
3.1. Planteamiento	33
3.2. Justificación	34
3.3. Hipótesis	34
4. Objetivos	35
4.1. Objetivo general	35
4.2. Objetivos particulares	35
5. Materiales y métodos	36
5.1. Obtención de muestras de SCU	36
5.2. Aislamiento de células mononucleares	36
5.3. Obtención de población enriquecida CD34+ Lin-	37
5.4. Obtención de células purificadas CD34+ y CD34- mediante citometría de flujo:	
<i>Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS)</i>	38
5.5. Ensayos de proliferación: cultivos líquidos	39
5.6. Seguimiento de los cultivos celulares	40
5.7. Ensayos de colonias: contenido de progenitores	40
5.8. Cultivos para evaluar la presencia de células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC)	41
5.9. Citometría de flujo	42
5.10. Análisis estadístico	43
6. Resultados	45
6.1. Características de las poblaciones celulares en el día cero (células sin cultivar)	45
6.2. Contenido de progenitores y células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC) al día cero	49
6.3. Proliferación y expansión de las 4 poblaciones celulares con citocinas (Condición control)	51
6.4. Cinéticas de proliferación de las 4 poblaciones celulares en presencia de moléculas pequeñas.	53
6.5. Inmunofenotipo	55
6.6. Contenido de LTC-IC al día 10 de cultivo	59

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	XI
6.7. Cinéticas de expansión	61
7. Discusión	70
8. Conclusiones y perspectivas	79
8.1. Conclusiones	79
8.2. Perspectivas	80
Bibliografía	80

Capítulo 1

Introducción

Uno de los campos de mayor relevancia en la biomedicina actual es el referente al de las células troncales. Una célula troncal es aquella capaz de generar a todos los diferentes tipos de células del tejido u órgano en el que se encuentran debido a que poseen características como autorrenovación y diferenciación. Sin embargo, ¿qué es lo que las hace tan especiales y distintas a las demás células para su aplicación en la medicina? Estas células tienen una función esencial en la producción celular durante el desarrollo, durante condiciones de homeostasis tisular y durante la regeneración de órganos y tejidos en respuesta a una lesión o enfermedad. Las células troncales por lo tanto, representan la base de la terapia celular.

El objetivo del Laboratorio de Células Troncales y Progenitoras Hematopoyéticas (LCTyPH) en el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, es entender la biología de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas obtenidas a partir de la sangre de cordón umbilical, con el fin de desarrollar sistemas de cultivo para la expansión *ex vivo* y la manipulación de dichas células, para que en un futuro, puedan ser empleadas en la clínica, y de esta manera contribuir al impulso y desarrollo de la medicina regenerativa en el IMSS y México.

1.1. Sangre y hematopoyesis

La sangre de los mamíferos, es un fluido corporal y un tejido especializado que está compuesto por plasma y por distintos tipos celulares. El plasma, es una solución que contiene más de 90 % de agua, la cual se intercambia libremente con la de las células y otros fluidos extracelulares y está disponible para mantener el estado normal de hidratación de todos los tejidos. También contiene iones minerales (sodio, potasio, calcio), moléculas orgánicas (aminoácidos, ácidos grasos y glucosa) y proteínas. Las proteínas del plasma constituyen el 7-9 % del plasma (6-8 g/100 ml), y se destacan tres grandes grupos de proteínas: albúminas, globulinas y factores de la coagulación como el fibrinógeno y la protrombina. Los principales tipos celulares que componen a la sangre son: glóbulos rojos (eritrocitos), plaquetas (trombocitos) y glóbulos blancos (leucocitos). Dentro de sus funciones principales están el transporte, protección y regulación y cada tipo celular tiene una función especializada: los glóbulos rojos transportan oxígeno y lo llevan a los tejidos; las plaquetas participan en la formación de coágulos sanguíneos; los linfocitos están involucrados con la respuesta inmune. La sangre en circulación lleva los diversos tipos de células a las regiones del cuerpo en las que se necesitan: glóbulos rojos a los tejidos que requieren oxígeno, plaquetas a los sitios de la lesión, linfocitos a las áreas de infección, etc. [1]

Las células de la sangre se dividen en dos grupos o linajes: mieloides y linfoides. El linaje linfoide incluye a las células T, B y Natural killer (*NK*) , que llevan a cabo respuestas inmunes adaptativas e innatas. El linaje mieloides por otra parte, está subdividido en dos grupos, linaje megacariocítico - eritroide que da origen a eritrocitos y plaquetas y el linaje granulo-monotico, que genera granulocitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos) monocitos y a macrófagos. [2]

Pero, ¿cómo se producen estas células? En un organismo adulto, se produce una gran cantidad de células sanguíneas a diario. Por ejemplo, en un adulto de 70 kg de peso, se producen 2×10^{11} eritrocitos, 2×10^{11} plaquetas y 7×10^{10} granulocitos, lo anterior compensa la pérdida diaria de dichas células de tal manera que, en condiciones normales, los niveles en circulación de las células sanguíneas se mantienen constantes gracias a las células troncales hematopoyéticas (CTH) [3]. Cada CTH está programada para permitir la producción eficiente de los componentes sanguíneos celulares cuyas funciones han sido moldeadas por la evolución: glóbulos rojos que permiten el transporte eficiente de oxígeno, megacariocitos y su progenie de plaquetas que interactúan con los vasos sanguíneos y los factores de coagulación solubles para regular coagulación,

células del sistema inmune innato y adquirido que actúan contra el ataque de algún patógeno [4].

1.1.1. Primeros estudios de la hematopoyesis

Para el ámbito científico, el siglo XIX representó grandes descubrimientos y hallazgos en el campo de la biología y medicina, patólogos y médicos como Virchow¹, Neumann² y Ehrlich³, por mencionar algunos, contribuyeron a realizar nuevas aportaciones y la descripción de enfermedades desconocidas para la época. Sin duda, estos nuevos hallazgos en el campo de la hematología, llevaron a realizarse más preguntas y por ende, la curiosidad de llevar a cabo más investigaciones en el área. Ya en el siglo XX, tanto médicos como científicos buscaron descifrar el origen de las células sanguíneas, que, aunque ya se sabía que la sangre se producía en el interior de los huesos; en la médula ósea, el mecanismo de cómo se generaban los distintos tipos celulares que la componen, aún se desconocía.

Algunos anatomistas al examinar la médula ósea, notaban la presencia de distintas formas en las células, las cuales en realidad correspondían a los distintos linajes y a diferentes etapas de la diferenciación de las células sanguíneas.

Para explicar esta diversidad, el científico ruso Alexander Maximow estableció una teoría unitaria y elaboró los primeros mapas jerárquicos en donde sugería que todas las células sanguíneas maduras provenían de una célula precursora.[8] Posteriormente, algunos patólogos propusieron también la existencia de una célula común que daba origen a las demás, la llamaron *hematocito* o *hemocitoblasto*, sin embargo, no existían pruebas de que esa célula realmente existiera, por lo que fue hasta 1961 que de observaciones se pasó a la realización de estudios funcionales que demostraron el potencial de regeneración de estas células “iniciales” al demostrar que esto podría hacerse con ensayos de reconstitución *in vivo*. Lo anterior, estimuló a otros a desarrollar ensayos clonales y cultivos *in vitro* que, combinados con el advenimiento de una vasta gama

¹Rudolf Virchow: médico-patólogo alemán propuso que las enfermedades surgen a partir de células individuales y que es precisamente, esta división la que hace que la enfermedad progrese, así postuló el tercer principio de la teoría celular: *omnis cellula e cellula* (toda célula proviene de otra célula)[5]

²Ernst Neumann: patólogo alemán, alumno de Virchow, realizó observaciones muy precisas del interior de los huesos y presentó las primeras descripciones sobre su morfología y organización. Estos análisis morfológicos lo llevaron a postular que los glóbulos rojos y blancos se originan de la médula ósea. Él acuñó el término *leucemia mieloide* para referirse al crecimiento maligno de los glóbulos provenientes de la médula ósea[6]

³Paul Ehrlich: médico-bacteriólogo, él desarrolló las primeras tinciones que permitieron colorear a las células sanguíneas y así poder clasificarlas.[7]

de anticuerpos de superficie celular y el uso de la citometría de flujo, han permitido establecer una visión detallada y actual del sistema sanguíneo como una jerarquía de desarrollo con células primitivas al inicio y células diferenciadas en la parte final.

1.1.2. ¿Qué es la hematopoyesis?

La hematopoyesis (del griego *haima* "**sangre**" y *poiēsis* "**hacer**") es el proceso de producción de células sanguíneas que ocurre continuamente durante la vida de un organismo y que da origen a los distintos linajes que componen a la sangre; debido a que las células sanguíneas maduras son generalmente de corta duración, se requiere de unas células especializadas que inicien este proceso para reponer a los progenitores multilíneaje y a los precursores comprometidos con linajes hematopoyéticos y así generar a todas las células sanguíneas; estas células especializadas son las células troncales hematopoyéticas (CTH)[9, 2]

Durante la etapa fetal en mamíferos, la hematopoyesis inicia en el saco vitelino a partir de la tercera o cuarta semana de gestación. Posteriormente se traslada al hígado fetal, bazo y timo fetal, para que durante el segundo trimestre de gestación, comience a establecerse en la médula ósea (MO) de huesos largos como el fémur, tibia, pelvis, etc. La hematopoyesis en mamíferos adultos se produce principalmente en la MO, dentro de lugares anatómicos específicos conocidos como nichos hematopoyéticos [10].

Las células troncales hematopoyéticas son necesarias para la producción de sangre durante toda la vida y se definen por su capacidad para autorrenovarse y diferenciarse. A medida que se diferencian, las CTH dan lugar a células progenitoras que sufren una restricción gradual de diferenciación para al final asumir la identidad de una célula sanguínea madura. Las relaciones de linaje entre las células troncales, los progenitores y las células maduras forman una ruta compleja y gracias a ensayos clonales *in vitro* y a distintas estrategias de clasificación, se ha logrado un progreso significativo para establecer su jerarquía.

1.1.3. Organización del sistema hematopoyético y características de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas

Ernst Haeckel fue el primero en utilizar el término célula troncal (*Stammzelle*) en 1868, lo usó para referirse al organismo unicelular primordial del que descendía toda

la vida multicelular. Por lo tanto, esta célula troncal se colocó de manera esquemática en la raíz de un árbol ramificado, al cual llamó "árbol madre" (*Stammbaum: árbol que muestra de dónde provienen las cosas*). La ley biogenética de Haeckel (*la ontogenia recapitula la filogenia*) poco después lo impulsó a usar el término de células troncales [11].

Desde el principio, el concepto de células troncales se ha enmarcado en un modelo similar al de un árbol, en donde las células troncales son colocadas al inicio o ápice y posteriormente van dando lugar a su progenie a través de una serie ordenada de pasos simulando una ramificación. De esta manera, el sistema hematopoyético está compuesto por una serie de compartimentos organizados con base al grado de madurez de las células que lo conforman y a los distintos linajes celulares que se generan, por lo que su clasificación depende de: **1.** las características funcionales que poseen, **2.** su grado de maduración y **3.** su inmunofenotipo⁴, pues, a medida que las células se van diferenciando, van expresando o dejando de expresar marcadores de superficie también conocidos como antígenos. Estas moléculas han recibido un número que va después del prefijo **CD** (*cluster of differentiation*) de esta manera cada población celular posee un inmunofenotipo específico que facilita su identificación [12, 13]. De acuerdo al grado de maduración celular, se han identificado cuatro compartimentos, los cuales constituyen al esquema clásico de la organización jerárquica del sistema hematopoyético [13, 14]. Las CTH son, las encargadas de la hematopoyesis definitiva, son células inmaduras e indiferenciadas que residen en la médula ósea en mamíferos adultos y representan aproximadamente al 0.01 % del total de células nucleadas presentes en la médula ósea, lo cual representa una limitante para su estudio [15, 16].

Las células troncales hematopoyéticas fueron descritas a partir del trabajo de Ernest McCulloch y James Till en 1961, en donde demostraron que las células de médula ósea inyectadas por vía intravenosa podían rescatar a ratones irradiados letalmente reestableciendo la producción de células sanguíneas. En los ratones receptores, 1 a 2 semanas después del trasplante hallaron nódulos en el bazo y encontraron una correlación entre el número de nódulos y células inyectadas. Una vez examinadas, resultaron ser colonias que fueron denominadas unidades formadoras de colonias del bazo (*CFU-S*), las cuales tenían una baja frecuencia en médula ósea (<0.5 %), cada una de estas colonias podía generar una nueva CFU-S y al ser retransplantadas,

⁴El inmunofenotipo se refiere a las moléculas (proteínas) de superficie que se expresan en la membrana de las células que van a funcionar como marcadores para su identificación y clasificación a partir de su detección por citometría de flujo y mediante el uso de anticuerpos.

podían reconstituir la hematopoyesis [17].

Estos experimentos demostraron, por primera vez de manera funcional, la presencia de células hematopoyéticas muy inmaduras capaces de reconstituir el sistema hematopoyético en la médula ósea de ratones y además permitieron describir características fundamentales de estas células.

Las características que definen a una CTH son su capacidad de autorrenovación, es decir, la capacidad de formar una célula igual a la original a partir de la división celular, y diferenciación (multipotencialidad) que es la capacidad de generar a los distintos linajes celulares pertenecientes a un mismo órgano o tejido [18].

Otra característica de estas células es su capacidad de permanecer por largos periodos de tiempo en la fase G0, es decir, son quiescentes; esta inactividad, se ha propuesto como una propiedad fundamental de las células troncales hematopoyéticas, pues de esta manera se evita su agotamiento funcional y también las protege del daño al ADN que podría presentarse debido a una proliferación excesiva, dando como resultado un mal funcionamiento o cáncer [19, 20].

No obstante, las señales intrínsecas y extrínsecas celulares inducidas en respuesta a diversas tensiones, como la inflamación o la pérdida de sangre, permiten que las CTH inactivas vuelvan a entrar a ciclo celular, proliferen y se diferencien [21].

Este primer compartimento a su vez, representa a una población heterogénea de CTH, pues existe evidencia que indica que lo conforman poblaciones con potencial de injerto⁵ y de proliferación distinto.

En cuanto a su potencial de injerto, se ha sugerido que hay dos clases de CTH, con potencial de injerto a largo (*long-term*) y de corto plazo (*short-term*). Y respecto su capacidad de diferenciación, se ha demostrado que algunas CTH pueden dar origen a progenie mieloide y linfoide, mientras que otras solamente a mieloide [22, 23].

Cabe mencionar que estas células no expresan ningún antígeno de linaje restringido, por lo que se les conoce como células de linaje negativo (Lin-) [12, 24].

Las CTH dan origen a células progenitoras hematopoyéticas (CPH), que constituyen al segundo compartimento, tienen el potencial de ser unidades formadoras de colonias (UFC) y son células inmaduras que han perdido su capacidad de autorrenovación, pero cuentan con un gran potencial proliferativo que está restringido a linajes

⁵El tiempo que tarda en reconstituir a la hematopoyesis.

específicos. Éstas pueden ser multipotenciales, o bien, pueden estar restringidas a dos (bipotenciales) o a un solo linaje (monopotenciales). La maduración posterior en cada uno de los linajes hematopoyéticos está definida por dos procesos fundamentales: la pérdida definitiva del potencial de auto-renovación y la adquisición de una identidad específica. Estas células corresponden a menos del 0.5 % del total de células de la médula ósea y en su mayoría se definen como linaje negativo (Lin-) [15].

Las CPH, posteriormente dan lugar a células precursoras que ya son reconocibles por su morfología las cuales, a pesar de ser inmaduras, pueden ser identificadas en frotis de médula ósea a través de microscopía de luz. Las células precursoras están en el tercer compartimento del esquema jerárquico de la hematopoyesis y constituyen la gran mayoría de las células de la médula ósea (>90 % de las células hematopoyéticas residentes de la MO). Finalmente, los precursores hematopoyéticos al madurar, generan a las células sanguíneas circulantes las cuales se encuentran en el cuarto compartimento. [13]

1.1.4. Inmunofenotipo

Para poder responder a las señales externas o permitirse el reconocimiento entre ellas, las células poseen receptores en la membrana llamados antígenos, que también sirven como marcadores para su clasificación e identificación.

El marcador CD34, fue el primer marcador de superficie celular identificado para enriquecer células troncales y progenitoras humanas, el cual está expresado en menos del 3 % de todas las células sanguíneas. Este marcador es el que se utiliza para marcar a las CTyPH para estudios clínicos pues se ha demostrado que las células CD34+ mantienen el potencial de formación de colonias a largo plazo en cultivos *in vitro* y permiten la expresión y diferenciación de células sanguíneas de diferentes linajes hematopoyéticos en modelos *in vivo* [25, 26]. Las CTH expresan CD34, CD49f, CD90, CD117 y CD133 y no expresan CD38 ni ningún linaje restringido, por lo tanto se definen como CD34 + CD45RA - CD49f + CD90 + CD38 - Lin - [15].

CD34 es una glicoproteína transmembranal cuya función aún no está del todo clara, además de servir como un marcador de CTyPH un estudio reportó que las células CD34+ se encuentran unidas a selectinas⁶ de las células endoteliales en la médula ósea y mediante un análisis proteómico se indicó que el antígeno CD34 es un ligando

⁶Las selectinas, designadas como L, P y E-selectina representan una familia de receptores expresados en los leucocitos (L), plaquetas y células endoteliales (P) o sólo en el endotelio (E). [27]

exclusivo de selectina vascular E y P [28, 29]. La expresión de este marcador se va perdiendo a medida que los progenitores comprometidos con algún linaje comienzan a diferenciarse.

Cabe mencionar que dentro del conjunto de CTH también se ha identificado una población CD34 negativa (CD34 - CD38 - Lin-), cuyo estado dentro del ciclo celular (latencia) sugiere que se encuentra en el ápice del compartimento de las células troncales y se ha descrito que esta población, puede volver a expresar al marcador CD34 justo antes de la división celular, sugiriendo que su expresión puede ser reversible [30, 31].

Otros estudios introdujeron a CD38 como marcador de progenitores más comprometidos que enriquecen negativamente a las CTH, por lo que la expresión de CD38 se adquiere gradualmente mediante la diferenciación de las células.[12]

El mapa clásico de jerarquía del sistema hematopoyético y los marcadores que expresan o van dejando de expresar las células dependiendo del compartimento en el que se encuentren, están ilustrados en la figura 1.1.

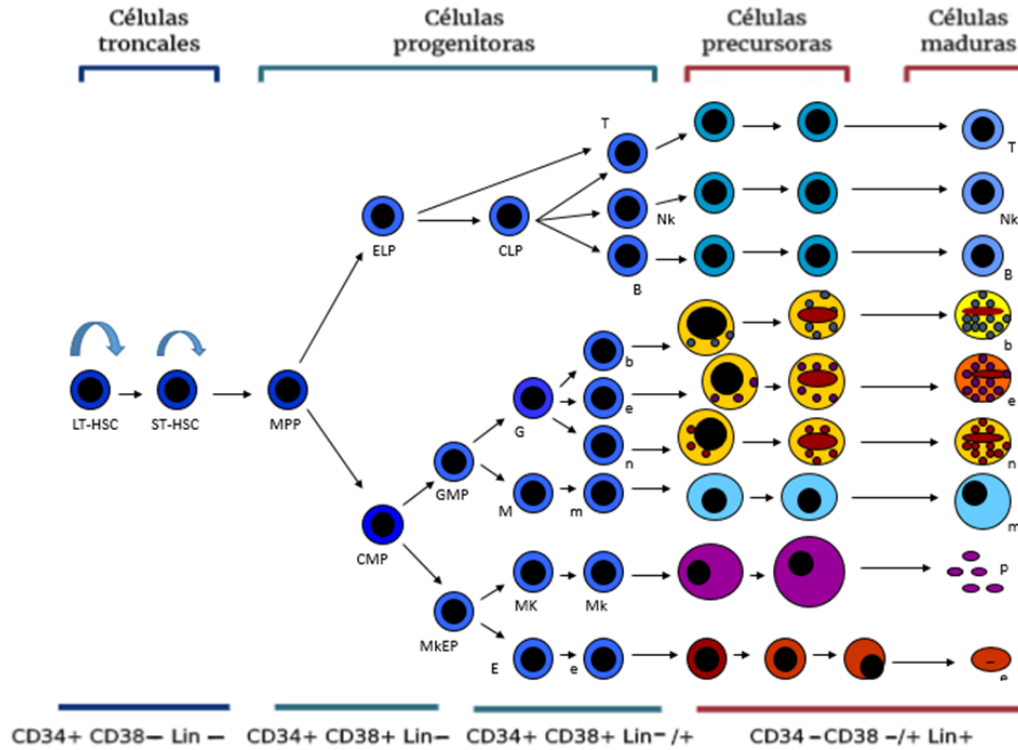


Figura 1.1: Esquema de la organización jerárquica de la hematopoyesis. El sistema hematopoyético se ha dividido en compartimentos para su estudio, el esquema clásico incluye al menos cuatro compartimentos. El primero corresponde al de las células troncales con capacidad de autorrenovación (*flechas azules*) y multipotencia; el segundo a las células progenitoras, el tercero a los precusores y el cuarto al de las células maduras.

Cada compartimento tiene marcadores de superficie que permite distinguirlos entre ellos (se muestra si es positivo a CD34 y CD38 respectivamente).

LT-HSC, célula troncal de largo plazo; *ST-HSC*, célula troncal de corto plazo; *MPP*, progenitor multipotente; *ELP*, progenitor linfóide temprano; *CLP*, progenitor linfóide común; *CMP*, progenitor mieloide común; *GMP*, progenitor de granulocitos y macrófagos; *MkEP*, progenitor megacariocítico eritroide; *T*, linfocito T; *NK*, linfocito natural killer; *B*, linfocito B; *b*, basófilo; *e*, eosinófilo; *n*, neutrófilo; *m*, monocito; *p*, plaquetas; *e*, eritrocito. Modificado de [13]

Sin embargo, las nuevas tecnologías de secuenciación (RNA-seq o scRNAseq) permitieron ilustrar una visión distinta a la clásica jerarquía hematopoyética que tenía una estructura compartimentalizada y estable. La imagen emergente es de una colección de poblaciones heterogéneas organizadas jerárquicamente, con progresión gradual de una a otra y que sigue siendo muy flexible para satisfacer las necesidades de demanda de sangre. Es así que a partir de ensayos funcionales, rastreos de linaje no invasivos y análisis ómicos en resolución de célula única, demostraron que la hematopoyesis es

un proceso continuo. Además, la imagen es aún más complicada porque el grupo de CTH y el de los progenitores son funcional y molecularmente heterogéneos.[32, 33, 23]

De esta manera surgieron nuevas representaciones de la hematopoyesis las cuales ilustran a un nuevo modelo de autorrenovación, de sesgo de linaje y de diferenciación, como se ilustra en la figura 1.2.

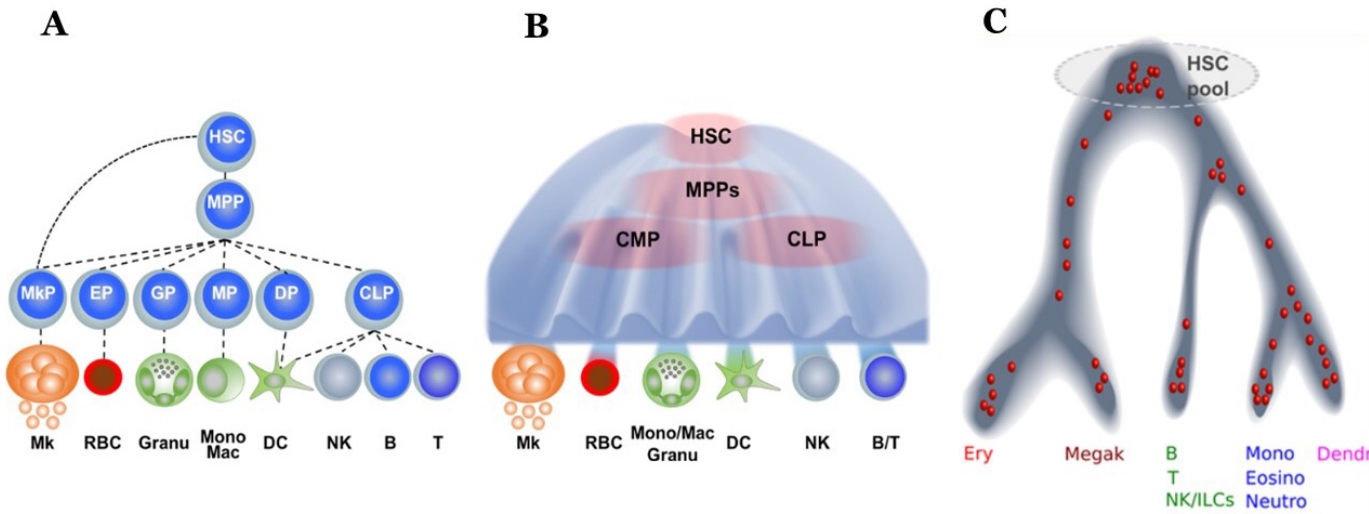


Figura 1.2: Nuevas representaciones de la hematopoyesis.

A Modelo de división anticipada. La separación de linaje aparece antes en comparación con modelos anteriores. **B** Modelo continuo tipo Waddington. En este modelo las CTH no atraviesan estados intermedios discretos y estables, sino que adquieren gradualmente un programa transcripcional y el compromiso con un linaje de manera continua. Aquí, las etapas de desarrollo posteriores a las CTH, como las MPP o CMP, no representan tipos de células discretas, sino más bien estados transitorios dentro del continuo de CTyPH. **C** A partir del 2016, los análisis transcriptómicos de células individuales indican un modelo continuo de diferenciación. Cada punto rojo representa una sola célula y su localización a lo largo de una trayectoria de diferenciación. En la parte superior de este mapa se ilustra la heterogeneidad del compartimento de células troncales.

HSC, célula troncal; *MPP*, progenitor multipotente; *ELP*, progenitor linfoide temprano; *CLP*, progenitor linfoide común; *CMP*, progenitor mieloide común; *GP*, *MP*, progenitor de granulocitos y macrófagos; *MkP*, progenitor megacariocítico; *EP*, progenitor eritroide, *T*, linfocito T; *NK*, linfocito natural killer; *B*, linfocito B.

Modificado de [32, 33]

1.2. Regulación de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas

La capacidad del sistema hematopoyético para mantener las proporciones adecuadas de células de todos los linajes hematopoyéticos a lo largo de la vida de un individuo, depende de las redes de comunicación intercelular. Las CTH deben responder e integrar señales del microambiente para garantizar la producción sostenida de todos los linajes hematopoyéticos. Es decir, características como la viabilidad, la autorrenovación, la proliferación, el compromiso y la diferenciación dependen de elementos intrínsecos y extrínsecos.[34] Algunos elementos intrínsecos incluyen una variedad de moléculas reguladoras presentes dentro de la célula, como factores de transcripción, RNAs no codificantes o modificadores epigenéticos, los cuales son modulados por señales externas como algunas citocinas y moléculas de la matriz extracelular, las cuales son clave para su mantenimiento en cultivo pues simulan el microambiente hematopoyético.[22, 34] Los factores extrínsecos comprenden diferentes tipos de células y sus productos, los cuales, en conjunto, proporcionan señales que controlan el comportamiento de las CTyPH modulando la expresión y actividad de los elementos intrínsecos presentes en una célula. Como mencioné previamente, en la vida posnatal, la formación de células sanguíneas tiene lugar principalmente en la MO. Aquí, las células troncales están rodeadas de diferentes tipos de células, incluidas las células del estroma, osteoblastos, fibroblastos, adipocitos, macrófagos, células endoteliales y células accesorias, por ejemplo, los linfocitos. Todos estos diferentes tipos de células forman un entorno único, conocido como *nicho hematopoyético*, que es responsable de proporcionar a las CTyPH las condiciones adecuadas para su crecimiento. La evidencia reciente indica que, hay varios nichos hematopoyéticos dentro el microambiente de la MO, incluidos los nichos endosteales, vasculares y el mesenquimal, que ejercen distintos efectos sobre las CTyPH.[35]

Las células del nicho secretan una amplia gama de proteínas, incluidas citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que regulan la autorrenovación y diferenciación de las CTyPH *in vivo*, las cuales ejercen sus efectos a través de moléculas específicas (receptores) ubicadas en la superficie celular.[34]

1.3. Estudio de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas

Al estudiar el crecimiento *in vitro* de las CTyPH, se deben considerar dos procesos fundamentales: su capacidad de proliferar y su capacidad de expansión. La proliferación se ha definido como la capacidad que tienen para dividir y generar nuevas células hijas, independientemente del linaje y etapa de maduración de las células que se producen; mientras que la expansión se ha definido como la capacidad de células primitivas para dividirse y generar más células primitivas que retienen características biológicas de las células originales. [13]

Estos conceptos los ilustro en la figura 1.3.

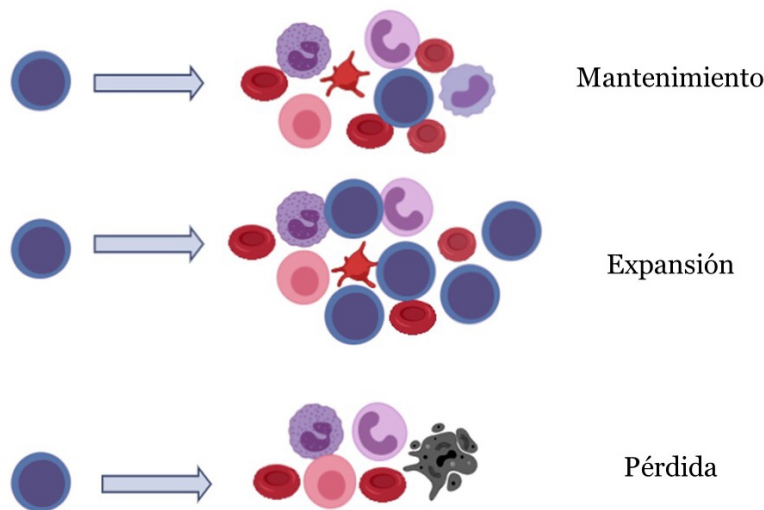


Figura 1.3: Esquemas de los conceptos de expansión, mantenimiento y pérdida celular. En todos los casos hay proliferación (incremento en el número celular); en la primera ilustración existe un mantenimiento de la población celular que le dio origen. En el segundo esquema, la población inicial se incrementó, es decir, hubo expansión; o también puede darse el caso de que células con características de la población inicial ya no se encuentren entre las células generadas y esto implica una pérdida, ilustrada en el tercer esquema.

Modificado de [36]

A nivel celular, la autorrenovación de las CTH ocurre durante la división celular. De manera conceptual, las CTH pueden someterse a 3 tipos de eventos de división celular: **1)** la autorrenovación simétrica generando dos CTH, **2)** la diferenciación simétrica que genera dos células progenitoras hematopoyéticas y **3)** la autorrenovación asimétrica que genera una CTH y una CPH. [37]

Debido a que las CTyPH no pueden identificarse por criterios morfológicos y tomando en cuenta que las divisiones celulares de autorrenovación son difíciles de rastrear directamente en tiempo real, se han utilizado y evaluado mediante ensayos funcionales y análisis inmunofenotípicos.

La inmunofenotipificación es el análisis de poblaciones celulares heterogéneas que permite identificar la presencia y la proporción de las diversas poblaciones de interés. Para ello se utilizan anticuerpos que identifican a las células mediante la detección de antígenos específicos (marcadores) expresados en la membrana de estas células. Las estrategias de tinción de citometría de flujo han llevado a métodos en donde se utilizan dos o más anticuerpos simultáneamente cada uno junto con un fluorocromo asociado diferente para poder así identificar y cuantificar una población celular determinada.[38]

Los ensayos funcionales para determinar el número y la integridad funcional de las CTyPH se pueden realizar en sistemas *in vivo* en donde se introducen CTH en animales irradiados para así determinar su capacidad para reconstituir al sistema hematopoyético después de varias semanas después del trasplante. Para esto, el receptor debe ser un animal inmunodeficiente, por ejemplo, ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) o ratones NSG, los cuales tienen mutaciones específicas que producen una deficiencia de linfocitos evitando que se rechacen tejidos que no son propios, de esta manera no habrá rechazo mediado por las células inmunes del huésped [39]; y ensayos *in vitro*. Para este trabajo nos enfocamos en los siguientes ensayos funcionales *in vitro*:

- Ensayos de formación de colonias

El potencial de formación de colonias hematopoyéticas en medios semisólidos ha sido ampliamente utilizado para estudiar a las CTyPH *in vitro*. Estos ensayos determinan la presencia de unidades formadoras de colonias (UFC), es decir, la proliferación y capacidad de diferenciación de los progenitores hacia el linaje mieloide, eritroide o megacariocítico y no refleja la actividad de las células troncales realmente. Los hallazgos de los primeros experimentos funcionales también sirvieron para establecer la importancia de los ensayos clonogénicos⁷ para detectar y cuantificar células que no son morfológicamente identificables y surgió la necesidad de asignarles nuevos nombres funcionales para conferirles especificidad: CFU-G, CFU-M, CFU-GM, BFU-E,

⁷Un ensayo clonogénico o ensayo de formación de colonias es un ensayo de supervivencia celular *in vitro* basado en la capacidad de una sola célula de formar una colonia. Para que se defina como colonia debe constar de al menos 50 células.[40]

CFU-E, etc.[41].

- Ensayo de LTC-IC

Para evaluar la presencia de CTH, este ensayo se basa en la capacidad de las CTH para iniciar y mantener la producción de células hematopoyéticas durante varias semanas en cultivos que incluyen una capa alimentadora de células del estroma en presencia o en ausencia de citocinas exógenas [42].

Los ensayos de cultivo a largo plazo (LTC) se realizan cultivando células hematopoyéticas sobre una monocapa adherente de células estromales primarias o de líneas celulares. Se utilizan medios de cultivo especializados para asegurar la supervivencia, autorrenovación, proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas primitivas, incluidas las CTH de largo plazo, durante muchas semanas. Las células que se detectan en los ensayos de LTC se denominan células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC; por sus siglas en inglés: *long term culture-initiating cells*).

Estas células se detectan por su capacidad para generar colonias después de 5 semanas al menos. Este período asegura que estas células que estaban presentes en la muestra de células original se puedan diferenciar terminalmente. De esta manera, las colonias que pueden detectarse después de 4-5 semanas deben haberse generado a partir de LTC-IC más primitivas [43].

Es de precisar, que este método no necesariamente prueba que las células que sostienen la hematopoyesis *in vitro* son CTH reales; pues, hasta la fecha, el ensayo de repoblación *in vivo* es el único método validado para detectar y medir la función real de las CTH.

1.4. Fuentes de obtención de células troncales y progenitoras hematopoyéticas

Cuando el sistema hematopoyético de un individuo se vuelve anormal y por lo tanto la producción de células sanguíneas no es el óptimo debido a alteraciones genéticas hereditarias o adquiridas, se necesita un trasplante de células hematopoyéticas, es decir, las células de la médula ósea deben ser reemplazadas por células hematopoyéticas funcionales sanas [15, 16].

Los primeros trasplantes en humanos se realizaron a mediados de la década de 1950, pero fue hasta la década de 1970 que los trasplantes de células troncales y progenitoras

se volvieron relevantes para el tratamiento de trastornos hematológicos convirtiéndose en una de las principales estrategias terapéuticas y para el desarrollo de nuevas terapias celulares. [44, 45]

Actualmente se utilizan tres fuentes celulares diferentes para el trasplante hematopoyético: la médula ósea, la sangre periférica movilizada y la sangre de cordón umbilical (SCU), asimismo, se pueden obtener para fines de investigación, con el fin de estudiar a fondo las condiciones idóneas de cultivo celular para mantener y expandir a las CTyPH sin perder sus características biológicas originales. El conocimiento adquirido a partir de la investigación básica ha permitido ampliar el uso de la CTyPH provenientes de SCU en la clínica además de ampliar el conocimiento acerca de la biología de estas células [46].

1.4.1. Médula ósea y sangre periférica movilizada

La MO, es el sitio donde se lleva a cabo la hematopoyesis y es donde residen las células troncales y progenitoras hematopoyéticas. Para la extracción de estas células, el paciente debe estar bajo anestesia general y se realizan aspirados en múltiples sitios a lo largo de la cresta ilíaca posterior, usando agujas de biopsia de calibre 8 a 11 gauges. Se aspira a la vez más de 20 ml de médula por kilogramo de peso de donante y se pueden obtener hasta 1.5 litros de una sola colección en general. Todo el procedimiento puede durar hasta 2.5 horas por lo que es bastante invasivo. Estas células, posteriormente, se transfieren de una médula ósea sana (donador) al paciente (receptor) con el fin de repoblar la médula ósea que no funciona y reestablecer la producción y las funciones de todos los linajes hematopoyéticos. Sin embargo, hay que considerar algunos riesgos que pueden ocurrir como sangrado, infección, dolor local y el desarrollo de la enfermedad de injerto contra hospedero (*EICH*) ocasionada por el rechazo inmune por parte del receptor, por lo que una de las cosas a considerar es que el donador sea lo más parecido posible inmunológicamente al receptor; esto se realiza con base a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (*HLA clase I y II*) las cuales difieren dependiendo del parentesco [46, 47].

También se pueden realizar trasplantes de CTH y CPH a partir de la sangre de un donador sano, como es el caso de la sangre periférica movilizada, en donde se requiere el uso de algunos agentes como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o Plerixafor los cuales permiten que las células primitivas salgan a circulación a través de un mecanismo que involucra la interrupción del eje SDF-1 / CXCR4.

El eje SDF-1 / CXCR4 desempeña un papel fundamental en la retención o salida de las células troncales del nicho. SDF-1 es una quimiocina secretada por osteoblastos de MO y células del estroma. Es un potente quimioatrayente, que causa la inactividad y retención de las CTH de la médula a través de su interacción con el receptor CXCR4 en la membrana de las CTH. G-CSF provoca la movilización de las CTyPH indirectamente al expandir los granulocitos que activan las elastasas de neutrófilos y otras metaloproteinasas de matriz. Estas enzimas causan la interrupción del eje SDF-1 / CXCR4, promoviendo la “salida” de estas células a circulación. Plerixafor, por otra parte, es un antagonista reversible del CXCR4, inhibe SDF-1 promoviendo la movilización de CTyPH, sin embargo resulta ineficaz como agente independiente por lo que puede administrarse al final de un período de 4 a 5 días de haber administrado G-CSF, asimismo, estos agentes movilizadores pueden provocar algunos efectos adversos en el paciente [48, 49].

Es importante resaltar que obtener CTyPH de ambas fuentes presenta desventajas clínicas y biológicas; en primera instancia, se necesita encontrar a un donador compatible y el grado de coincidencia de moléculas de histocompatibilidad debe ser alta para asegurar el injerto. Asimismo, el paciente debe pasar por procedimientos quirúrgicos o químicos, lo cual implica una menor disponibilidad de fuentes para obtener estas células.

1.4.2. Una fuente alternativa: sangre de cordón umbilical

La tercer fuente es la sangre de cordón umbilical, la cual fue utilizada por primera vez en 1988 cuando Broxmeyer y colaboradores exploraron el potencial de las células troncales y progenitoras de sangre de cordón umbilical (SCU) para su uso en la clínica. Tomaron como base el antecedente de que éstas células podían mantenerse en cultivos de largo plazo durante muchas semanas, con potencial de autorrenovación y de proliferación de células progenitoras *in vitro*, por lo que, en cantidades suficientes podían ser utilizadas en trasplantes hematopoyéticos. Como resultado y en colaboración con diversas instituciones, se llevó a cabo el primer trasplante exitoso de SCU realizado por la doctora Eliane Gluckman para el tratamiento de anemia de Fanconi en 1988 en el Hospital Saint Louis de París[50, 51].

Desde entonces, se han reportado logros significativos en términos de nuestra comprensión de la biología de células troncales y progenitoras hematopoyéticas derivadas de SCU. Más de 45,000 trasplantes de células troncales y progenitoras obtenidas a

partir de esta fuente se han realizado, tanto en niños como en adultos, para el tratamiento de enfermedades incluidas las hematológicas, inmunológicas y neoplasias. Además, se han establecido bancos de sangre de cordón umbilical en donde se almacenan unidades de SCU en bancos públicos y privados en todo el mundo.[52]

En México, el Banco de Células Troncales del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) ubicado en el Centro Médico Nacional de La Raza, el cual fue inaugurado en 2005, está entre los primeros cinco mejores del mundo por su productividad en la recolección y almacenamiento de células troncales para trasplante.[53]

1.4.3. Ventajas y desventajas del uso de la sangre de cordón umbilical para trasplantes hematopoyéticos

Durante los últimos 30 años, la SCU ha demostrado ser una excelente fuente de obtención células hematopoyéticas ya que posee varias ventajas sobre las dos fuentes anteriores.

La recolección de SCU implica una venopunción del cordón umbilical cortado, seguido de drenaje por gravedad en una bolsa de sangre estéril con anticoagulante usando un sistema cerrado similar al utilizado para la extracción de sangre completa. Esta técnica permite la recolección de aproximadamente 80 a 160 ml de sangre de cordón umbilical, por lo tanto, en términos prácticos, esta recolección es un procedimiento relativamente simple sin riesgo para la madre o el bebé.[54, 46]

El contenido relativo de células troncales hematopoyéticas y progenitoras en una unidad SCU es mayor que en una colección de MO o de SPM, sin embargo no solo existen diferencias cuantitativas entre las células de estas fuentes, sino que también, las poblaciones celulares son intrínsecamente distintas en términos funcionales. Varios estudios han confirmado algunas ventajas biológicas de CTyPH provenientes de SCU a partir de diversos estudios en cultivos *in vitro*. [13]

En primera instancia, los potenciales de proliferación y expansión ⁸ de las células troncales y progenitoras provenientes de SCU son significativamente más altos que los potenciales observados en células derivadas de las otras fuentes. A manera de ejemplo, nuestro grupo también ha realizado distintos estudios, en donde se reportan las cinéticas de proliferación y expansión *in vitro* de las fracciones celulares hematopoyéticas enriquecidas para células Lin⁻ CD34⁺, que se obtuvieron de las 3 fuentes y

⁸Evaluada por la presencia de células formadoras de colonias, es decir, progenitores capaces de dar lugar a colonias hematopoyéticas de diferentes linajes en un medio semisólido.

se observó que, en efecto, cuando se cultivaba en medios líquidos con una combinación de citocinas, las células de SCU mostraron un potencial de proliferación y expansión significativamente mayor que las células adultas, como se muestra en la figura 1.4. [55, 56, 57]

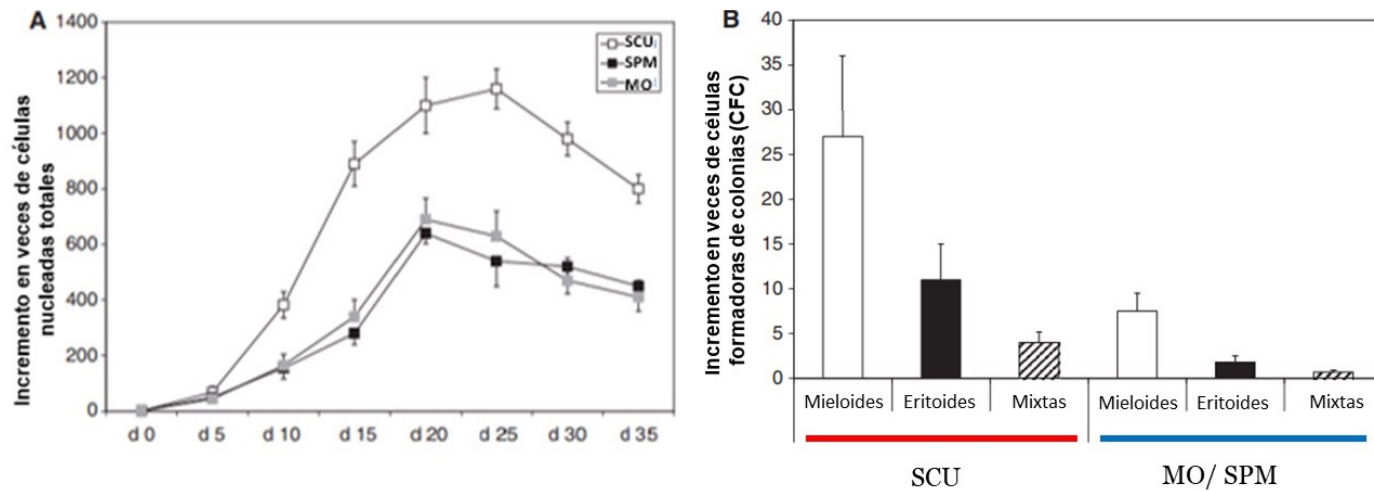


Figura 1.4: Cinética de proliferación y expansión de células Lin- CD34+ de sangre del cordón umbilical (SCU), médula ósea adulta (MO) y sangre periférica movilizada (SPM) en cultivos libres de suero y con citocinas. Se determinó la generación de células nucleadas totales (**A**) y células formadoras de colonias o CFC (**B**) durante todo el cultivo (la línea roja corresponde a las colonias de SCU y la línea azul a las de SPM y MO.)

Los resultados en **A** representan la media $\pm$ DE ($n = 14 - 21$) y corresponden al incremento en veces observado en diferentes puntos de tiempo, en comparación con el día 0. Los valores de SCU son significativamente más altos ($p < 0.05$) que los valores de MO y SPM. Los resultados en **B** corresponden al día 20 de cultivo (día de aumento máximo). Los valores de SCU son significativamente más altos ($P < 0.05$) que los valores de MO y SPM. Modificado de [13]

Asimismo, se ha encontrado que el nivel de expresión (número de moléculas por célula) del antígeno CD34 en las células provenientes de SCU es significativamente mayor que en las células de fuentes adultas, así como la incidencia de células iniciadoras de cultivo a largo plazo (*LTC-IC*) [58, 59, 60].

Estas diferencias, entre las CTyPH provenientes de SCU en comparación con las otras fuentes se deben a sus características biológicas, por ejemplo, poseen telómeros significativamente más largos que sus homólogos de fuentes adultas, lo cual les otorga un potencial de proliferación mayor; en la regulación de su ciclo celular, la mayoría de las CTH está en un estado inactivo (G0) y por el contrario, la proporción de células que están en ciclo aumenta significativamente en el compartimento de células progenitoras. Algunos estudios (*in vitro*) demostraron el 97,5 % de las células CD34+ de SCU están en la fase G0 / G1 del ciclo celular, mientras que esta proporción es más baja (88 %) en poblaciones de células similares en fuentes como MO. Asimismo, al evaluar estas células en cultivos líquidos suplementados con plasma de SCU, con o sin citocinas, las células salen de la fase G0 / G1 más rápidamente que las células adultas. Por lo que la salida rápida de la fase G0 / G1 del ciclo celular, en respuesta a citocinas particulares, confiere a las CTyPH una ventaja funcional sobre sus contrapartes adultas.[61] En conjunto, estos resultados sugieren que las células CD34+ provenientes de SCU son más sensibles a la estimulación de citocinas, y por lo tanto son candidatos más adecuados para la expansión (*ex vivo*) que las células de fuentes adultas.

Otra diferencia es la expresión de algunos genes evaluados a partir de análisis de transcriptómicos, que contribuyen a la activación de vías de señalización de ciertos factores de transcripción, por ejemplo, se ha reportado que algunos se expresan en niveles más altos en células provenientes de SCU, factores como *GATA-2*, *Id1*, *c-Fos*, *FosB* y *jun-B*. Asimismo, en un estudio se reporta que la elevada expresión de los genes *GATA* e *Id* probablemente juega un papel en el mantenimiento de un fenotipo primitivo, y que los factores de transcripción *Fos* y *jun* conducen a una mayor proliferación de las células provenientes de SCU en comparación con las células adultas [62, 13]. En cuanto a la producción de citocinas, también se han reportado diferencias entre las células provenientes de SCU y MO. Las células hematopoyéticas neonatales y adultas poseen diferentes requisitos de citocinas hematopoyéticas; al respecto, es de destacar, que las células de adultos parecen requerir concentraciones más altas de citocinas para lograr respuestas similares a las de las células neonatales [13, 63, 64].

Por ejemplo, en un estudio se observó que en ausencia total de citocinas exógenas, las células CD34+ de MO no pudieron producir colonias, mientras que, en cultivos de células CD34+ de SCU, se produjo un número reducido de colonias. A partir de estos resultados, los autores especularon que aunque las células CD34+, provenientes de ambas fuentes pudieran producir GM-CSF e IL-3; los autores, evaluaron por RT-

qPCR que las células provenientes de SCU producen estas citocinas en mayor cantidad [65].

En cuanto a ventajas clínicas, dadas las características celulares, la coincidencia de moléculas de histocompatibilidad es menos restrictivo, pues la tasa de desarrollar EICH es la más baja en estas 3 fuentes. Debido a la inmadurez de algunas de las poblaciones de células inmunes en SCU, los criterios de coincidencia de HLA son 4–6/6, lo cual es menos estricto que para las fuentes adultas. Además, hay una mayor disponibilidad de muestras de SCU pues son más fáciles de obtener [52].

Como mencioné anteriormente, en comparación con las otras dos fuentes, la SCU posee una mayor frecuencia de células hematopoyéticas primitivas, incluyendo CTH, así como progenitores mieloides bipotentes, eritroides primitivos y multipotentes. Sin embargo, según la experiencia clínica informada hasta ahora, utilizar células de SCU en la clínica es complicado debido al hecho de que el volumen de una unidad de MO o SPM recolectado de un sujeto adulto es varias veces mayor que el volumen recolectado de una unidad de SCU; en consecuencia, el número real de células CD34+ presentes en una unidad de médula ósea o de sangre periférica movilizada, siempre será significativamente mayor que el número de células CD34+ en cualquier unidad de sangre de cordón umbilical [66].

Por lo tanto, el contenido relativamente bajo de células nucleadas totales, en donde estarían incluidas las CTyPH en una unidad de SCU se ha reconocido como la razón principal de la recuperación hematopoyética tardía, un injerto⁹ más pobre y en algunos casos una menor tasa de supervivencia. En la clínica, se ha establecido la aplicación de una dosis celular de $2.5\text{--}3.0 \times 10^7$ células nucleadas totales por kg del peso corporal del paciente como el número mínimo de células necesario para el injerto de SCU. Esta es una dosis celular que generalmente se puede lograr con una sola unidad de SCU si el paciente es un niño, sin embargo, una sola unidad no es suficiente para adultos de más de 60 kg de peso. Por lo tanto, uno de los principales desafíos con la SCU es encontrar formas de aumentar el número de CTyPH o bien, mejorar la proporción de CTH sin alterar el número absoluto de células infundidas[67].

⁹El injerto se define con mayor frecuencia como un recuento absoluto de neutrófilos > 500 células por μl durante tres días consecutivos. Cuando hay injerto significa que las nuevas células están funcionando correctamente y están comenzando a reconstruir la hematopoyesis por lo que marca el inicio del proceso de recuperación.

Capítulo 2

Antecedentes

El uso de la SCU como una fuente alternativa de células hematopoyéticas representa un tratamiento fundamental para enfermedades hematológicas y no hematológicas, sin embargo, como ya mencioné anteriormente, la principal limitación de la SCU es el bajo número de CTyPH, lo que conduce a tiempos de injerto prolongados y/ o riesgo de infecciones. Se han desarrollado diferentes enfoques como estrategias para aumentar el número absoluto de células de SCU trasplantadas. Estos incluyen la coinfección de dos unidades diferentes de SCU no manipuladas en un solo paciente; la coinfección de células de SCU junto con sangre periférica haploideéntica con un empobrecimiento en células T y la coinfección de células de SCU junto con CTyPH de una unidad de SCU diferente que se ha expandido previamente *ex vivo* [15].

Dada su importancia clínica, algunos laboratorios han intentado desarrollar condiciones que estimulen la autorrenovación de CTH *ex vivo*, extrapolando el conocimiento que se tiene acerca de los factores internos y externos que regulan las funciones de estas células y así simular o aplicar éstas condiciones en cultivos *in vitro*.

2.1. Expansión *ex vivo* de células troncales y progenitoras hematopoyéticas

Actualmente, existen dos fuentes biológicas principales para la generación *in vitro* de CTyPH humanas: células frescas obtenidas de la MO, sangre periférica o SCU y células troncales pluripotentes¹; éstas últimas, son células inmaduras e indiferencia-

¹Hasta ahora se han caracterizado dos tipos de células troncales pluripotentes: aquellas obtenidas de la masa celular interna del blastocisto, también conocidas como células troncales embrionarias,

das capaces de autorrenovarse y de dar lugar a células de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo), y que, bajo condiciones especiales de cultivo *in vitro*, tienen el potencial de formar cualquier célula completamente diferenciada [69].

Generación de CTH y células sanguíneas maduras a partir de células troncales pluripotentes se ha abordado utilizando tres métodos diferentes: a través de la formación de cuerpos embrioides; a través de co-cultivos con capas alimentadoras; y a través de un plato recubierto de matriz extracelular que promueve la diferenciación, sin embargo, hasta la fecha no existen datos sobre el uso clínico de CTH derivadas de células troncales pluripotentes humanas [15, 70].

Los esfuerzos de expansión *ex vivo* de CTyPH se basan principalmente en protocolos para expandir células CD34+ humanas. Por lo tanto, el crecimiento *ex vivo* de las células hematopoyéticas requiere que algunos de los elementos y condiciones de nicho se reproduzcan en cultivo, de modo que las CTyPH puedan funcionar en escenarios similares a los encontrados *in vivo*. En consecuencia, la proliferación, expansión y diferenciación de células hematopoyéticas puede tener lugar en cultivo cuando las condiciones adecuadas están presentes. La proliferación celular se define como la producción de nuevas células a partir de una población celular particular, independientemente del linaje y la etapa de maduración de las células que se producen. Por lo tanto, la proliferación *ex vivo* de una población celular puede determinarse simplemente cuantificando el número total de células generadas en cultivo [71].

El potencial de expansión de una población celular particular se puede definir como su capacidad para generar nuevas células que poseen características inmunofenotípicas y/ o funcionales presentes en la población inicial; por ejemplo, la expansión de las células progenitoras se puede determinar evaluando la generación de nuevas células CD34 o CFCs; mientras que la expansión de células troncales puede determinarse evaluando la generación de LTC-IC [71].

2.1.1. Enfoques experimentales

Dos puntos importantes a considerar en protocolos de expansión son: **a)** la población de células iniciales (con las que se empieza el cultivo) y **b)** las condiciones particulares de cultivo, esto incluye: el tipo de medio de cultivo, la frecuencia de cambio de medio,

y las generadas experimentalmente mediante la reprogramación de células somáticas a través de introducción de genes específicos, por ejemplo, *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Klf4*, *c-Myc*, estas células son conocidas como células troncales pluripotentes inducidas (iPSC, por sus siglas en inglés) [68].

la temperatura, la densidad celular, la presencia o ausencia de suero, la presencia o ausencia de células estromales y la combinación de citocinas, entre otras [72]. Respecto al primer punto, la selección de la población de células para iniciar el cultivo es un aspecto clave en los protocolos de expansión *ex vivo*, ya que se ha demostrado que la etapa de desarrollo de una célula hematopoyética dicta su comportamiento biológico. Por ejemplo, las poblaciones más primitivas de células CD34+ poseen un mayor potencial de expansión a comparación de células maduras [71]. Tanto las CMN como las fracciones celulares particulares, ya sea enriquecidas para células primitivas o purificadas, han sido utilizadas por varios grupos. Aunque se ha observado cierta expansión al cultivar CMN, el consenso actual sugiere que se obtienen mejores resultados cuando la población de células iniciales contiene cierto grado de enriquecimiento para las células hematopoyéticas primitivas (CD34 o CD133), esto también se reportó en un estudio realizado en nuestro laboratorio [73]. Tomando en cuenta lo anterior, nuestro laboratorio ha realizado estudios y probado distintas estrategias de expansión a partir de poblaciones celulares diferentes y con distintas condiciones de cultivo, las cuales incluyen:

- Citocinas hematopoyéticas.

En términos de las condiciones de cultivo, el común denominador en todos los protocolos de expansión hasta ahora ha sido la presencia de citocinas de acción temprana y tardía. Los esfuerzos iniciales para expandir las células hematopoyéticas primitivas de SCU se basaron en el uso de diferentes combinaciones de citocinas hematopoyéticas recombinantes y se centraron en la expansión de progenitores, al evaluar los incrementos en los números de células en el número de células formadoras de colonias y el marcador CD34.[74, 75, 76]

Estos estudios demostraron incrementos significativos en el número de CPH; sin embargo, los incrementos reales en el número de células troncales no fueron concluyentes. [71, 77]

De este modo, los protocolos actuales destinados a expandir las células hematopoyéticas primitivas de SCU incluyen citocinas recombinantes como parte de las condiciones de cultivo, independientemente de la presencia de otras moléculas y / o de células adyuvantes. Entre las diferentes citocinas que participan en la hematopoyesis, las de acción temprana inducen la autorrenovación, por ejemplo el *stem cell factor* (SCF) o factor *steel*, el ligando para Flt3 (Flt3-L) y la trombopoyetina (TPO) las cuales son esenciales para favorecer la expansión *in vitro* [78, 79].

La adición de citocinas de acción intermedia, como la interleucina-3 (IL-3) y el factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), tienen un efecto positivo en la generación de progenitores comprometidos. Asimismo, se ha encontrado que combinaciones particulares de citocinas de acción intermedia y tardía inducen selectivamente la generación de progenitores comprometidos hacia linajes específicos. Cabe mencionar que el tipo y número de colonias varía según la fuente celular, la población celular con la que se inició el cultivo y las citocinas utilizadas, sin embargo todavía existe cierta controversia con respecto a la forma en que las citocinas favorecen selectivamente un linaje celular particular sobre los demás; aunque algunos modelos de diferenciación en torno a esto ya se han propuesto.[80]

En el laboratorio se han probado diferentes combinaciones de citocinas hematopoyéticas, las cuales han permitido obtener incrementos en veces mayores de células positivas a CD34 al añadir citocinas de acción temprana, intermedia y tardía.[55, 36, 73] Muestro un ejemplo de estos estudios en la figura

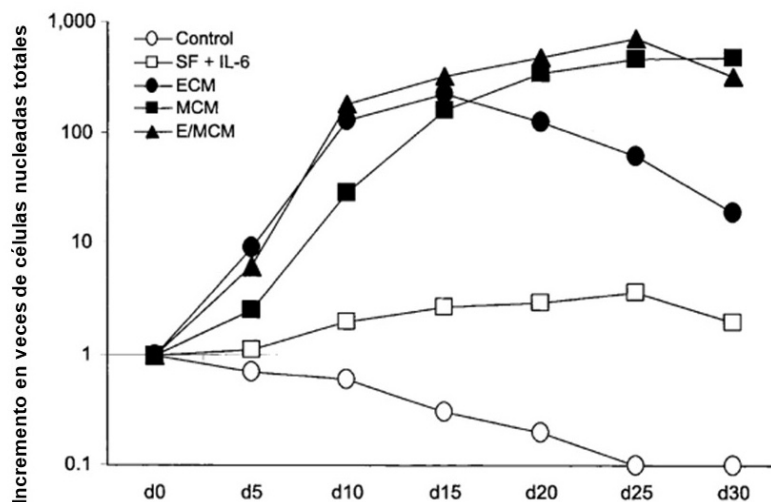


Figura 2.1: Cinética de proliferación de células enriquecidas CD34+ en cultivos líquidos con las siguientes condiciones: sin citocinas (control); SF + IL-6; SF + IL-6 + IL-3 + EPO (ECM); SF + IL-6 + GM-CSF + G-CSF+ (MCM), o SF + IL-6 + IL-3 + EPO + GM-CSF + G-CSF (E / MCM). Los resultados representan la media de 8 a 12 experimentos y corresponden al incremento en veces en comparación con el día cero. La condición seis citocinas (SF, IL-6, IL-3, EPO, GM-CSF y G-CSF) fue en donde se observó un mayor incremento en veces (incrementa 750 veces en el día 25.) Modificado de [36]

■ Co-cultivos con células estromales.

Tomando en cuenta que el desarrollo *in vivo* de las CTyPH se lleva a cabo en estrecha

asociación con las células del microambiente, se han establecido cultivos *ex vivo* en los que las células del estroma se utilizan como capas alimentadoras. Para este fin, se han evaluado diferentes tipos de células del estroma, incluidos el estroma primario de médula ósea, células endoteliales, líneas celulares de estroma y especialmente células troncales mesenquimales, las cuales pueden diferenciarse en células mesenquimales de médula ósea que constituyen al nicho hematopoyético. [71]

El co-cultivo de CTyPH con una capa alimentadora busca imitar las redes celulares que existen en el nicho de las CTyPH. Los efectos que se buscan son generar un contacto directo célula- célula que proporcionan no solo soporte físico sino también señales reguladoras y la producción de proteínas reguladoras solubles como citocinas, quimiocinas y otros factores secretados por las células del estroma, pues éstas regulan la autorrenovación, la proliferación y diferenciación. Sin embargo, el microambiente hematopoyético es un sistema tan complejo que es difícil de replicar con precisión *in vitro*. [81] No obstante, con estas condiciones de cultivo, se obtienen resultados favorables cuando se permite el contacto directo entre células estromales y las células CD34, lo que sugiere que la participación de las moléculas asociadas a las células y las citocinas unidas a la membrana también es importante. Un estudio de nuestro laboratorio reportó incrementos significativamente mayores en el número total de células y la expansión de CPH en cultivos de células CD34 con células mesenquimales humanas y adicionando citocinas en comparación con las condiciones sin contacto y sin capa alimentadora. [82]

Cabe mencionar que cuando los cultivos se complementan con citocinas de acción temprana, intermedia y tardía, la presencia de una capa alimentadora de células mesenquimales no es necesaria para la producción de progenitores comprometidos o células maduras. Sin embargo, sí se requieren para la generación *ex vivo* de CTH.

Una limitación importante cuando se cultivan células hematopoyéticas primitivas es el hecho de que las células se van diferenciando, las cuales, a su vez, producen y secretan moléculas, que pueden ejercer señales inhibitorias que afectan el crecimiento de las CTyPH. Tomando en cuenta lo anterior, nuestro laboratorio aplicó un enfoque experimental en donde se realizaba una eliminación continua de células maduras del cultivo para así evitar la acumulación de reguladores negativos. Las células Lin-, por otro lado, se seleccionan se vuelven a cultivar durante varios días manteniendo la densidad de células primitivas en el cultivo [83]. Estos resultados se reportaron en [84].

- Ligandos de la vía de señalización Notch en el cultivo.

La autorrenovación y la diferenciación multilínea dependen de la expresión y la actividad de vías de señalización, incluidas las que involucran moléculas clave como Wnt, β -catenina y Notch. Entre ellos, la vía de Notch es de particular importancia. En mamíferos, existen cuatro receptores Notch (Notch 1-4) y se han descrito 5 ligandos (Delta 1, 3 y 4 y Jagged 1 y 2). Dentro del sistema hematopoyético, se ha demostrado que la señalización de Notch regula el desarrollo de algunas células del sistema hematopoyético y su activación en las CTH en la médula ósea tiene un papel definitivo en su mantenimiento y diferenciación.[85, 86] A partir de lo anterior, nuestro laboratorio estableció un enfoque experimental en donde se cultivaron células CD34+ CD38- Lin- con las citocinas SCF, FL, TPO, IL-3, IL-6, GM-CSF y G-CSF en presencia de la línea celular *OP9* transducida con el gen Delta 1. En estas condiciones, reportaron un incremento de 21 veces en la población celular CD34+ CD38- Lin-, mientras que en cultivos establecidos en presencia de citocinas y otros células mesenquimales, o solo en presencia de citocinas, el número de estas células aumentó 2.4 y 0.9 veces respectivamente con respecto al control.

Algunos de estos enfoques de expansión ya se han llevado a la clínica por otros grupos, sin embargo en la mayoría de los estudios informados hasta la fecha, las células expandidas se han infundido en pacientes junto con células no manipuladas. Esto porque los investigadores temen que los protocolos de expansión puedan inducir incrementos en los números de progenitores a expensas de los niveles de células troncales o que las condiciones de expansión *ex vivo* utilizadas, induzcan algunos cambios en la biología de las células expandidas, de modo que no puedan persistir a largo plazo después del trasplante. Con respecto a este último punto, un estudio reciente de nuestro laboratorio mostró que las células que se generan *in vitro* difieren significativamente en términos de patrones transcripcionales y capacidades de crecimiento en comparación con las células obtenidas directamente de unidades de SCU frescas. En este estudio se reportó que las células generadas en cultivo mostraron un contenido deficiente de células iniciadoras de cultivo a largo plazo y un marcado sesgo de diferenciación hacia el linaje mieloide.[87]

Con el progreso en la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares que regulan el mantenimiento y la expansión de CTyPH, también se han desarrollado enfoques *in vitro* que incluyen la regulación de factores de transcripción, regulación del ciclo celular, regulación de la telomerasa y la adición de agentes modificadores de cromatina.[81] Por lo tanto, la expansión *ex vivo* requiere enfoques que den como

resultado divisiones simétricas de CTyPH y por lo tanto, autorrenovación de CTH sin diferenciación y/o apoptosis.

2.2. Moléculas pequeñas

A partir del año 2013, se empezaron a utilizar moléculas pequeñas que han demostrado ser herramientas relevantes para investigar sistemas biológicos y para el desarrollo de estrategias de reprogramación celular y expansión de células troncales para su posible aplicación en medicina regenerativa.[88]

El término “molécula pequeña” se refiere a compuestos orgánicos (que pueden ser naturales o sintéticos) con pesos moleculares de entre 500 y 1,000 g/mol. La identificación de moléculas pequeñas (*screening molecular*) se ha convertido en un método común para identificar compuestos que producen fenotipos biológicos terapéuticamente deseables o modular un proceso biológico particular, pueden ser: orientadas a producir algún fenotipo; alterando la división celular, metabolismo, adhesión, viabilidad o localización de proteínas; o basadas en macromoléculas como objetivos, por ejemplo, se puede purificar una proteína y luego identificar compuestos que puedan modificar la función de ésta. Las moléculas pequeñas también pueden tener como objetivo a las vías de transducción de señales (por ejemplo, algunos receptores) o afectar la replicación del ADN, la diferenciación celular, la apoptosis y/o pueden ser modificadores epigenéticos. [89, 90]

Normalmente, los *screenings* moleculares son de alto rendimiento, lo que significa que están optimizados para analizar rápidamente miles de compuestos en paralelo y de manera automatizada². Posteriormente se recopilan grandes cantidades de datos con la ayuda de sistemas robóticos y software de procesamiento produciendo colecciones de miles de moléculas pequeñas conocidas como "bibliotecas".[89]

De manera reciente, se han examinado bibliotecas de moléculas pequeñas para determinar, las capacidades de autorenovación y diferenciación de células troncales con enfoques potenciales a medicina regenerativa.[91] La reprogramación química, así como el establecimiento de condiciones de cultivo para expansión con moléculas pequeñas ya se ha probado y aplicado en células troncales de distintos sistemas; por ejemplo:

²La identificación de moléculas pequeñas se realizan con lectores de placas estándar que detectan cambios en absorbancia, fluorescencia o electroquimioluminiscencia, pues algunos ensayos involucran genes reporteros. Los ensayos *in vitro* incluyen transferencia de energía enzimática o ensayos biofísicos.[89]

Células del sistema nervioso:

- Reprogramación de células somáticas a células troncales neurales usando combinaciones de moléculas pequeñas.[21, 92, 93]
- Producción de células neuronales mediante inducción química.[94, 95]

Células cardíacas:

- Conversión directa de fibroblastos a cardiomiocitos funcionales mediante la combinación de moléculas pequeñas.[96, 97, 98]

Células hepáticas:

- Conversión de hepatocitos de rata y ratón a células progenitoras hepáticas bipotentes. [99]
- Conversión de hepatocitos humanos a células progenitoras hepáticas bipotentes. [100, 101, 102, 103]

Asimismo, se han empleado moléculas pequeñas para reprogramar células somáticas a células troncales pluripotentes inducidas.[104, 105]

El uso de moléculas pequeñas para reprogramación celular es una opción atractiva para aplicaciones clínicas, pues es económica y fácil de controlar en función de la concentración y el tiempo. Además presentan otras ventajas; son permeables a las células, no son inmunogénicas (otros métodos de reprogramación son inapropiados para aplicaciones clínicas porque conllevan el riesgo de integrar factores genéticos exógenos o utilizar oncogenes), más rentables y más fáciles de sintetizar, preservar y estandarizar. Además, sus efectos sobre la inhibición y/o activación de la función de proteínas específicas son a menudo reversibles y pueden ajustarse con precisión variando las concentraciones.[88, 104]

Se han presentado datos similares en el contexto de las CTyPH humanas, en donde se han utilizado moléculas pequeñas diferentes en combinación con citocinas recombinantes que han demostrado efectos significativos sobre la expansión *ex vivo* de células de SCU inmaduras (CTH y diferentes tipos de progenitores), dando lugar a nuevas moléculas pequeñas para la expansión *ex vivo* de CTyPH. [37]

Sin embargo, falta por evaluar las combinaciones de algunas moléculas pequeñas en cultivo.

2.2.1. UM171

En el 2014, un grupo de la universidad de Montreal, Canadá dirigido por el Dr. Guy Sauvageau examinó una biblioteca de 5280 compuestos de bajo peso molecular por su capacidad para expandir células de sangre periférica movilizadas CD34 + CD45RA-humanas, que están enriquecidas en CTH de largo plazo, de las cuales se identificó a una familia de moléculas pequeñas que estimulan la expansión *ex vivo* de CTH de SCU capaces de reconstituir la hematopoyesis durante al menos 6 meses en ratones inmunosuprimidos dentro de las cuales se encontraba UM171.[106, 107] Las propiedades de UM171 lo convierten en un candidato potencial para el trasplante hematopoyético pues en combinación con citocinas hematopoyéticas y un medio libre de suero, tiene la capacidad de facilitar el mantenimiento y la expansión de de CTyPH *in vivo*.

UM171 es un derivado pirimidoindol³ y es un inductor de autorrenovación, por lo que estimula la expansión *ex vivo* de las CTH estableciendo un equilibrio crítico entre los mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios claves para la autorrenovación.[109] Su estructura química está ilustrada en la figura 2.2.

En cuanto a su mecanismo de acción, se sabe que UM171 induce una fuerte señalización proinflamatoria dependiente de NF- κ β junto con una respuesta antiinflamatoria mediada por EPCR (receptor de la superficie celular para la proteína C activada y es esencial para la anticoagulación y para mediar las señales antiinflamatorias) conduciendo a la autorrenovación de las CTH. Es decir, UM171 coordina estas 2 vías distintas.

Anteriormente se reportó la dosis-respuesta óptima de UM171 para la expansión de las CTH que es de 35 nM. [107, 110] Cuando la concentración es alta eventualmente conducen a una proliferación celular reducida y a una inflamación elevada (mayor a 0.125 μ M.) Estas células primitivas que presentaron “inflamación alta / proliferación baja” no lograron expandirse *ex vivo*.

Los análisis de transcriptoma revelan que la exposición a UM171 induce una firma genética inflamatoria, sobretodo de NF- κ β concluyendo que la señalización proinflamatoria es esencial para la expansión de CTyPH inducida por UM171.[109] Además de esta respuesta proinflamatoria, UM171 también desencadena un ciclo de retroalimentación negativa mediado por EPCR el cual protege a las células de la citotoxicidad

³Derivado de pirimidinas, que son aminas heterocíclicas que, a diferencia de las purinas, cuentan únicamente con un anillo en su estructura, por otro lado el indol es un compuesto orgánico heterocíclico, con estructura bicíclica que consiste en un anillo (benceno) unido a otro (pirrol). [108]

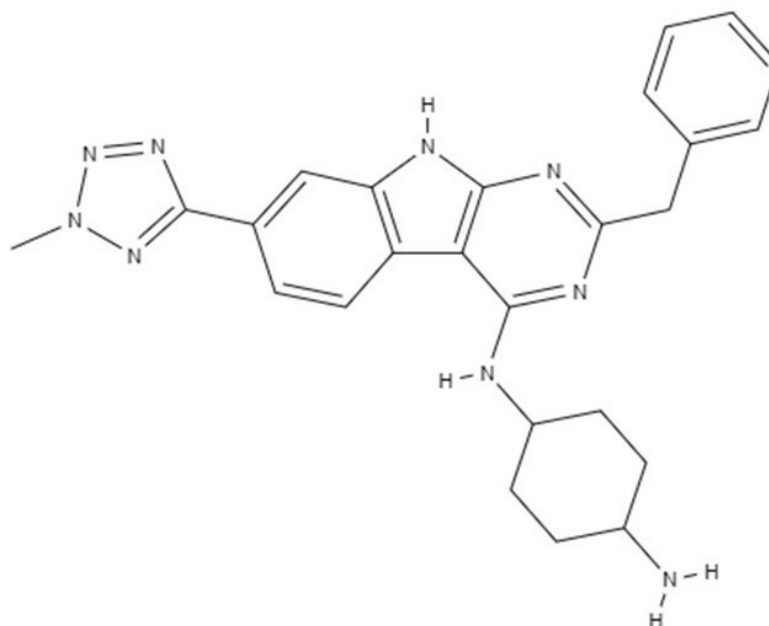


Figura 2.2: Estructura química de UM171, (1r,4r)-N1-(2-benzil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-yl)-9H-pirimido [4,5-b]indol-4-yl) ciclohexano-1,4-diamina.

Tomado de: <https://molview.org>

transmitida por la inflamación, activando un programa de desintoxicación de especies reactivas a través de EPCR. [109]

Los anterior sustenta un análisis previo de RNA-seq de células cultivadas con UM171, en donde los genes más regulados al alza codificaban para moléculas de superficie. Estos genes incluían a EPCR (CD201). [107]

Otra publicación indicó que EPCR es un marcador confiable para CTH de SCU expandidas con UM171. Recientemente, se demostró que UM171, regula positivamente la expresión de EPCR en CTH de SCU y que la fracción EPCR + contenía las CTH injertables. Posteriormente, se identificó a la integrina- $\alpha 3$ (ITGA3) como un marcador funcional de CTH humanas cultivadas con UM171 y mostraron que la expresión de ITGA3 es suficiente para separar la población primitiva de EPCR + CD90 + CD133 + CD34 + CD45RA en dos fracciones funcionalmente distintas: a corto plazo (ITGA3) y potencial de injerto tanto a corto como a largo plazo (ITGA3 +). Por lo que la expresión de ITGA3 se requiere funcionalmente para el injerto a largo plazo de CTH de SCU cultivadas. [111]

2.2.2. OAC-1

En 2012, un grupo del Beckman Research Institute en California, realizó un *screening* de moléculas pequeñas con el fin de evaluar la eficiencia de reprogramación del factor de transcripción *Oct4*, e identificó al compuesto activador 1 de Oct4⁴ (OAC-1) como una molécula para aumentar la expresión de este factor de transcripción. A partir de este estudio, se reportó que OAC-1 facilitaba la reprogramación de células troncales pluripotentes inducidas mejorando la eficiencia y acortando el tiempo de reprogramación. [112] Su estructura química se ilustra en la figura 2.3.

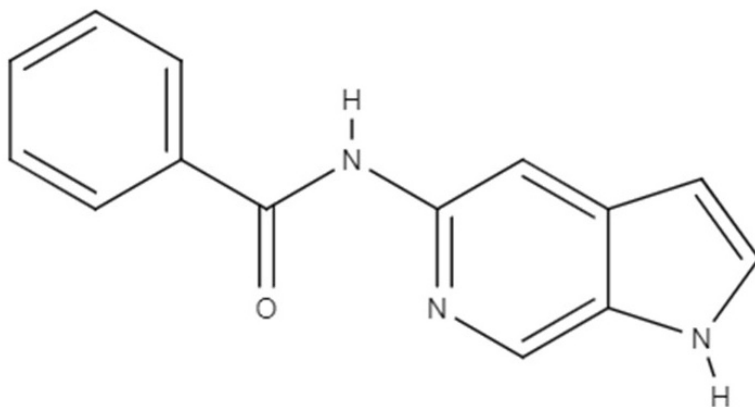


Figura 2.3: Estructura química de OAC-1, N-1H-pirrólo [2,3-c] piridin-5-il-benzamida. Tomado de: <https://molview.org>

Asimismo, en otro estudio se demostró que la expresión ectópica⁵ de OCT4 (POU5F1), junto con una combinación de citocinas, permitía la generación de células progenitoras hematopoyéticas humanas a partir de fibroblastos, lo que sugirió que OCT4 tenía un papel importante durante la diferenciación hematopoyética. [113]

Tomando esto como antecedente, el grupo del Dr. Hal Broxmeyer en el 2015, realizó un estudio en donde planteaban la hipótesis de que *Oct4* podría estar involucrado en la función y expansión de las CTH, por lo tanto, evaluaron los efectos de OAC-1 en el cultivo *ex vivo* de células de SCU CD34 + en presencia de un cóctel de citocinas. Encontraron que las células CD34+ tratadas con OAC-1 mostraron un aumento significativo con respecto a los controles que solo tenían citocinas. Identificaron a

⁴OCT4 (POU5F1) es un factor de transcripción que participa de manera crítica en la autorrenovación de las células troncales pluripotentes y su expresión se usa comúnmente como marcador de pluripotencia.

⁵La expresión ectópica es la expresión de un gen en un tejido o un tipo celular donde no se expresa normalmente.

*HOXB4*⁶ como un gen objetivo de *OCT4* y demostraron que el eje OCT4-HOXB4 es esencial para la expansión de CTH mediada por OAC-1, además determinaron que la concentración de 500 nM fue óptima para la expansión *ex vivo* de CTyPH. Así, estos datos mostraron, por primera vez, que la sobreexpresión de *OCT4* mejora la expansión *ex vivo* de las CTyPH y sugieren que OCT4 juega un papel esencial en la autorrenovación. Por lo que la sobreexpresión de *OCT4* por OAC-1 promueve la expansión regulando la expresión de HOXB4. [58]

⁶En un estudio previo ya se habían identificado a este gen como un regulador importante de la proliferación de células hematopoyéticas primitivas. Si se sobreexpresa a *HOXB4*, puede aumentar selectivamente el potencial proliferativo de las células hematopoyéticas primitivas [114].

Capítulo 3

Planteamiento, justificación e hipótesis

3.1. Planteamiento

Se han identificado moléculas pequeñas que pueden colaborar con citocinas de acción temprana para promover la expansión de las CTyPH, por lo que la comprensión de su mecanismo de acción junto con la evaluación funcional de las células generadas *in vitro* debería mejorar considerablemente nuestra comprensión de las vías reguladoras que rigen la autorrenovación de las CTH y su capacidad de diferenciación.

Toda vez que el trasplante hematopoyético requiere de grandes cantidades de células para su uso clínico, algunas moléculas pequeñas se han utilizado como fármacos para dirigir activamente la diferenciación y la autorrenovación de las células troncales proporcionando algunas de las expansiones más importantes de CTyPH humanas hasta la fecha.

Además, la caracterización del potencial de actividades aditivas y sinérgicas entre estos agonistas merece ser investigada, ya que esto podría conducir al desarrollo de plataformas superiores de expansión de CTyPH.

La identificación de condiciones de cultivo eficaces para mantener y posiblemente expandir a las CTyPH humanas *ex vivo* es un objetivo importante para las investigaciones hematológicas y para el grupo de investigación. Asimismo, gracias a algunos estudios previos del laboratorio lograron optimizar las condiciones de cultivo para mantener y expandir las CTyPH .

El presente trabajo explora un nuevo enfoque para mantener y posiblemente expandir las células CD34+, además de que ambas moléculas (UM171 y OAC-1) no han sido probadas en conjunto anteriormente en ningún estudio, por lo que resulta importante realizar una caracterización funcional en distintas poblaciones celulares relevantes.

3.2. Justificación

Varias décadas de trasplantes exitosos de médula ósea han demostrado la importancia clínica de las CTyPH, sin embargo, el uso de estas células provenientes de sangre de cordón umbilical, proporciona muchas ventajas, incluida una mayor recuperación inmunológica a largo plazo y una disminución de la enfermedad injerto contra hospedero. Sin embargo, los estudios clínicos han indicado que el factor más importante para la supervivencia del paciente después del trasplante de SCU es la infusión de una dosis de celular por encima de un umbral mínimo de 3×10^7 células / kg, por lo que el bajo número de células en unidades de SCU individuales ha limitado la idoneidad del trasplante en pacientes adultos.

Las estrategias para expandir los números de CTyPH *in vitro* utilizando moléculas pequeñas es un enfoque prometedor para generar células clínicamente relevantes para la medicina regenerativa, por las diversas ventajas que ofrecen.

La modulación extrínseca de las CTyPH resulta ser más práctica para la aplicación clínica en comparación los enfoques *in vivo* que utilizan vectores virales, debido a la falta de inmunogenicidad. Entre los múltiples reguladores extrínsecos, las moléculas pequeñas químicamente bien definidas se pueden utilizar para regular los procedimientos intracelulares de forma rápida y reversible mediante el ajuste de su concentración.

Por estas razones, elegimos esta estrategia para nuestro protocolo de expansión *ex vivo* de CTyPH.

3.3. Hipótesis

La adición de moléculas pequeñas en cultivo, tendrá un efecto positivo en torno a la proliferación en los cultivos con aquellas poblaciones que cuenten con un mayor porcentaje de células CD34+. Asimismo, aquellos cultivos con ambas moléculas, serán los que presenten una mayor capacidad de expansión en comparación con los cultivos control y los que cuentan con la presencia de una sola molécula pequeña.

Capítulo 4

Objetivos

4.1. Objetivo general

- Analizar el efecto de las moléculas UM171 y OAC-1 solas y en combinación en el cultivo de células progenitoras y troncales de sangre de cordón umbilical humana.

4.2. Objetivos particulares

- Caracterizar las cinéticas de proliferación de células mononucleares, células Lin- y células purificadas CD34+ y CD34- en presencia de las moléculas UM171 y OAC-1 solas y en combinación.
- Caracterizar las cinéticas de expansión de células mononucleares, células Lin- y células purificadas CD34+ y CD34- en presencia de las moléculas UM171 y OAC-1 solas y en combinación.
- Evaluar mediante análisis de citometría de flujo si existe expansión y/o mantenimiento de poblaciones CD34+.
- Conocer si la presencia de la molécula UM171, OAC-1 o en combinación influye en el mantenimiento de células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC) mediante ensayos funcionales.

Capítulo 5

Materiales y métodos

5.1. Obtención de muestras de SCU

Las muestras de SCU fueron recolectadas en dos hospitales que corresponden al Instituto Mexicano del Seguro Social: del área de Tococirugía del Hospital zona No.2-A Troncoso y del Banco de Células de SCU del Centro Médico Nacional La Raza. La SCU de fue obtenida mediante punción de la vena umbilical y vaciada por gravedad en bolsas de colecta de sangre por el personal del hospital correspondiente y de acuerdo a la Normas Institucionales y al Comité de bioética de Centro Médico Nacional S.XXI. Las muestras de sangre correspondían a embarazos normales a término de mujeres sanas que no reportaron problemas infecciosos o problemas propios del embarazo. Cada muestra fue entregada en una bolsa de recolección de sangre con anticoagulante CPD (citrato 3.27 g/L, dextrosa 25.5 g/L, fosfato sódico monobásico 2.22 g/L) o anticoagulante ACD y con un volumen total de entre 30 y 100 ml. Todas las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Células Troncales y Progenitoras Hematopoyéticas de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas en el hospital de Oncología del Centro Médico Nacional S.XXI en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.

5.2. Aislamiento de células mononucleares

Como paso previo para la obtención de CMN y dependiendo del volumen de la muestra, se realizó una centrifugación a 1100 rpm durante 9 minutos para recuperar el concentrado leucocitario (*buffy coat*) y descartar los eritrocitos y el plasma, este paso

se realizó en tubos de centrifuga (Falcon) de 50 mL. Se realizaron los pasos siguientes para cada una de las muestras utilizadas en este trabajo: Después de la centrifugación, se recuperó la fase intermedia del tubo y se hizo una dilución 1:1 con PBS, para después hacer un gradiente de densidad con Ficoll (LymphoprepTM).

Para ello, se prepararon tubos Falcon de 50 ml con Ficoll en una relación 3:4, este último que corresponde a la muestra previamente diluida con PBS. Con cuidado y con ayuda de una pipeta Pasteur de 10 ml, se depositó en el tubo la muestra sin mezclar para que quedara por encima del Ficoll y así se formaran dos fases: en la parte inferior el Ficoll y en la superior la sangre de cordón umbilical. Los tubos se cerraron y se centrifugaron durante 30 minutos a 1500 rpm. Se recuperó la capa intermedia que corresponde a donde están las CMN y se pasó a un tubo Falcon de 50 ml limpio para lavarse con PBS en dilución 1:1 y centrifugación de 1100 rpm por 9 minutos. Se desechó el sobrenadante y el botón que quedó en el fondo se resuspendió en Medio RPMI+SFB 5 % y 4 antibióticos (eritromicina 1mg/ml, vancomicina 1mg/ml, gentamicina 5 mg/ml, ciprofloxacino 1mg/ml).

Se realizó el conteo celular y se evaluó la viabilidad en una cámara de Neubauer con Azul de tripano (.4 %) y con diluyente de Turk en dilución 1:20 respectivamente y se sembraron en una caja Petri de poliestireno con medio RPMI Advanced (GibcoTM) con 2 % de SFB y antibióticos, esto para favorecer que células adherentes y células de linajes no hematopoyéticos como fibroblastos o células endoteliales que pudieran haber sido desprendidas durante el procedimiento de obtención, queden en el fondo de la caja. Se dejaron en la incubadora a 37°C toda la noche.

5.3. Obtención de población enriquecida CD34+ Lin-

Para obtener a la población enriquecida se siguió un protocolo de inmunoselección negativa con el kit EasySepTM Human Progenitor Cell Enrichment Kit. Para ello, después de obtener las CMN, se colocaron en un tubo estéril de poliestireno de 12x 75 mm un máximo de 60×10^6 células por mL en PBS con SFB al 2 % y EDTA [1mM]. A cada ml de suspensión celular, se añaden 50 μ L del cóctel de anticuerpos para quitar a las células no deseadas (CD2, CD3, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD61, CD66b, glicoforina A) se mezcla suavemente y se deja incubando por 15 min a temperatura ambiente.

Pasado el tiempo de incubación, se añadieron 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ del coloide que contiene partículas magnéticas y se dejó incubando por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el tubo con la suspensión celular se llevó a un volumen de 2.5 mL con PBS + SFB al 2 % y EDTA [1mM] resuspendiendo por pipeteo, se colocó en el magneto que viene con el kit y se dejó incubando por 10 minutos. Pasado este tiempo, se inclinó el tubo y con un solo movimiento se pasó a otro tubo de poliestireno estéril para recuperar las células no marcadas, este nuevo tubo se colocó en el magneto y se dejó incubando por 10 minutos. Como paso final, después de la última incubación, se volteó el tubo y las células no marcadas se colocaron en un tubo Falcon de 15 mL, se centrifugaron por 9 minutos a 1100 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de PBS PBS con SFB al 2 % y EDTA [1mM]. Se realizó el conteo celular y se evaluó la viabilidad en una cámara de Neubauer con Azul de tripano (.4 %) y con diluyente de Turk en dilución 1:10 respectivamente.

5.4. Obtención de células purificadas CD34+ y CD34- mediante citometría de flujo:

Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS)

A partir de las poblaciones enriquecidas se realizó una tinción sencilla para citometría de flujo (Fluorescent Activated Cell Sorting) con 1 μL de anticuerpo CD34 APC (Mouse Anti-Human mAB clona 581 BD PharmingenTM), para cada muestra utilizada con el fin de separar poblaciones CD34 positivas y CD34 negativas.

Para ello la muestra se resuspendió en PBS con SFB al 2 % y EDTA [1mM] y se separaron al menos 50 mil células para la autofluorescencia. Posteriormente en un tubo estéril de poliestireno se colocó el anticuerpo y la muestra en un volumen no mayor a 200 μL y se dejó incubando durante 20 minutos. Durante este tiempo, se prepararon dos tubos de poliestireno estéril con 500 μL de medio StemSpan en los cuales se recolectarán a las células purificadas. Pasado el tiempo de incubación, se añadieron 250 μL de PBS-EDTA y se centrifugó durante 5 minutos a 2500 rpm. Se decantó el sobrenadante y la muestra al fondo del tubo se resuspendió en 500 μL de PBS-EDTA estéril y se filtró antes de ser llevadas al FACS Aria II (BD; San José, California).

5.5. Ensayos de proliferación: cultivos líquidos

Las células correspondientes a las 4 poblaciones celulares, ilustradas en la figura 5.1 fueron cultivadas en medio StemSpan™ (Stem Cell Technologies™) al cual se le añadió penicilina 10,000 U/mL, estreptomicina 1mg/mL y gentamicina 5mg/L. La densidad celular inicial a la que se sembraron se indica a continuación:

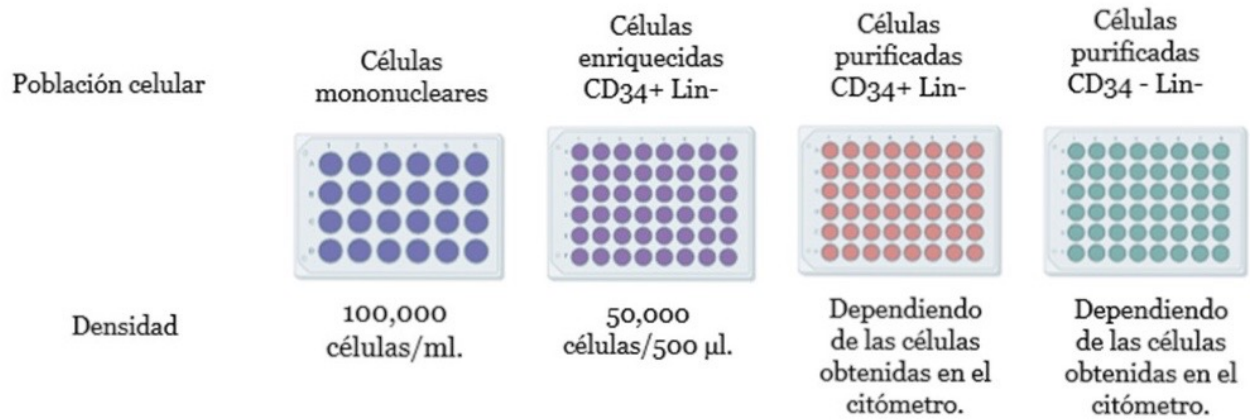


Figura 5.1: Densidad celular que se sembró al día cero para cada una de las 4 poblaciones celulares. Para las poblaciones purificadas, el número total de células obtenidas después de su selección por citometría fue entre 25,000 y 9,000 células por pozo para la población positiva y entre 10,000 y 1,500 células por pozo para la población negativa.

Se sembraron 10 condiciones iniciales para cada una de las 4 poblaciones celulares como se indica a continuación:

Condiciones sin citocinas:

- Condición control
- Con UM171 [35 nM]
- Con OAC-1 [500 nM]
- Con UM171 [35 nM] + OAC-1 [500 nM]
- Condición con el vehículo (DMSO al .01 %)

Condiciones con las citocinas: SCF, Tpo, Flt3-l, IL-3, IL6 cada una a [10ng/ml]:

- Condición control (solo citocinas)
- Con UM171 [35 nM]
- Con OAC-1 [500 nM]

- Con UM171 [35 nM] + OAC-1 [500 nM]
- Condición con el vehículo (DMSO al .01 %)

Para determinar el potencial de proliferación se cuantificaron las células nucleadas totales en los días correspondientes.

5.6. Seguimiento de los cultivos celulares

La duración de los cultivos fue de 20 días.¹ Se realizaron cambios de medio completos cada 5 días, en donde se evaluó el número total de células nucleadas, el contenido de progenitores mediante ensayos de colonias, tinción para análisis por citometría de flujo (día 0,10 y 15) y ensayos de LTC-IC (día 0,10 y 15).

5.7. Ensayos de colonias: contenido de progenitores

Después de haber realizado el conteo celular, se tomó un determinado número de células como se indica en la tabla 5.1 y se sembraron en 500 μ l de MethoCultTM, Stem Cell TechnologiesTM, que es un medio semisólido y comúnmente conocido como metilcelulosa, la cual contiene una mezcla de citocinas que permite la formación de colonias eritroides, mieloides y/o mixtas.

El tubo Eppendorf que contiene el medio y las células, se pasó por el vórtex unos 5 segundos para permitir la distribución homogénea de las células. Cada tubo, se sembró en un pozo de una placa con 24 pozos verificando que no se formaran burbujas en el cultivo. Se dejaron en la incubadora a 37°C durante 14 días y posteriormente se contabilizaron las colonias resultantes de cada ensayo. (Ver figura 5.2.)

Para ello, se utilizó un microscopio óptico invertido, se identificaron colonias mieloides o "blancas" (CFU-G, CFU-M y CFU-GM), colonias eritroides o rojas" (CFU-E y BFU-E) y en algunos casos también se contabilizaron colonias mixtas.

El número total de colonias 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 funcionales de células progenitores a lo largo del cultivo y en cada condición.

¹Algunos cultivos fueron de menor duración ya que en ciertos días no había células suficientes para hacer una resiembra, como fue el caso de algunas condiciones para las CMN y para las células purificadas CD34 negativas.

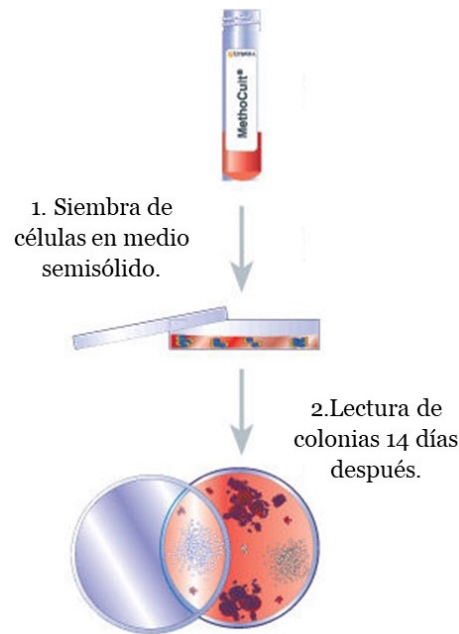


Figura 5.2: Esquema de trabajo para la siembra de los ensayos de colonias. Obtenido en: www.stemcell.com

Día	CMN	Enriquecidas Lin-	Purificadas CD34+	Purificadas CD34-
0	10,000	500	300	300
5	10,000	800	500	1,000
10	12,000	1,000	800	1,200
15	15,000	1,200	1,000	1,500
20	18,000	1,500	1,200	1,800

Tabla 5.1: Número de células utilizadas para la siembra de los ensayos de colonias. Los números corresponden a las 4 poblaciones celulares que se utilizaron. El número de células va en aumento cada día tomando en cuenta que la proporción de progenitores va disminuyendo con el tiempo.

5.8. Cultivos para evaluar la presencia de células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC)

■ Siembra de la capa alimentadora:

Primero, se prepararon las placas en donde se hicieron los cocultivos. Para ello, se utilizaron placas de 24 pozos en las cuales se cultivó la línea celular M2-10B4 (ATCC®CRL-1972™) derivadas de células estromales de médula ósea de ratón con medio RPMI Advanced (Gibco™).

Se sembraron 2,000 células por pozo (se usaron los 8 pozos centrales) y se incubaron

hasta llegar a una confluencia de 60-70 %.

Posteriormente para inhibir la proliferación de estas células adherentes, se añadió mitomicina C [$2\mu\text{g}/\text{ml}$] y se incubaron durante 18-24 horas.

Pasado este tiempo, cada pozo se lavó 3 veces con PBS + 4 antibióticos (eritromicina $1\text{mg}/\text{ml}$, vancomicina $1\text{mg}/\text{ml}$, gentamicina $5\text{mg}/\text{ml}$, ciprofloxacino $1\text{mg}/\text{ml}$) cuidando que no se despegara la capa de células que se formó. Después de los lavados, se añadieron con cuidado $500\mu\text{l}$ de medio RPMI Advanced (Gibco™ y se dejaron en la incubadora listas para su uso.

- Siembra de los cultivos para evaluar LTC-IC:

Se utilizaron las placas que contenían a las células M2-10B4 (ATCC®CRL-1972™) y se verificó que no se hayan despegado del fondo para poder realizar los cocultivos. No se utilizaron aquellas placas que tenían más de 5 días en la incubadora.

En los días 0 y 10 se tomó un determinado número de células dependiendo de la población celular, como se indica en la tabla 5.2.

Día	CMN	Enriquecidas Lin-	Purificadas CD34+	Purificadas CD34-
0	10,000	1,000	500	500
10	50,000	10,000	2,000	2,000

Tabla 5.2: Número de células utilizadas para la siembra de los ensayos de LTC-IC. Los números corresponden a las 4 poblaciones celulares que se utilizaron. El número de células va en aumento cada día tomando en cuenta que la proporción de CTH a largo plazo va disminuyendo con el tiempo.

Después de sembrar las células hematopoyéticas, se añadieron $500\mu\text{l}$ de medio MyeloCult™ H5100, Stem Cell Technologies™ para conseguir un volumen final de 1 ml. Se realizaron cambios de medio durante 5 semanas, una vez cada 7 días, en donde se reemplazaba la mitad del volumen del cultivo celular con medio MyeloCult™ H5100 fresco. Después de las 5 semanas, se despegó la capa con la micropipeta (pipeteo continuo) y se cuentan las células hematopoyéticas. Por último se sembraron ensayos de colonias dependiendo de cuántas células vivas finalizaron el cultivo y después de pasados 14 días se cuantifiquen las colonias resultantes.

5.9. Citometría de flujo

Para evaluar la expresión de marcadores hematopoyéticos se marcaron al menos 50,000 células para cada condición y para las poblaciones celulares. Se realizó una tinción

doble para cada población celular al día cero, es decir cuando recién se obtuvieron las CMN y las células enriquecidas CD34+ Lin-. Asimismo, se marcó un mínimo de 50,000 células los días 10 y 15 para las poblaciones enriquecidas CD34+ Lin- y purificadas CD34+ después de haber realizado el conteo de células nucleadas totales. En cada tubo (uno para cada condición) se realizó la tinción doble con los siguientes anticuerpos a una concentración previamente estandarizada:

- 1 μ l de CD34 FITC (BD Bioscience)
- 1 μ l de CD38 PE (BD Bioscience)

Se separaron al menos 10,000 células de todas las condiciones y se pusieron en el mismo tubo el cuál se utilizó como autofluorescencia.²

Las muestras se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Pasado este tiempo, se agregaron 250 μ l de solución de lisis BD FACS™ *Lysing Solution* (BD Biosciences, San José, CA) al 10 % a cada tubo, esto con el fin de lisar eritrocitos y fijar las muestras. Se dejaron incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se lavaron posteriormente con 250 μ l de PBS-EDTA [1mM] y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos. Se decantó el PBS y se añadieron 200 μ l de PBS-EDTA [1mM] y se guardaron a 4°C hasta su lectura.

Para la lectura de las muestras se utilizó un equipo BD FACS Canto™ II, la calibración del equipo y el establecimiento de los parámetros se ajustaron con las poblaciones autofluorescentes. Fueron adquiridos un mínimo de 10,000 eventos para cada condición y se guardaron para su análisis en el *software FlowJo*. Para la evaluación de CD34 y CD38 se analizó la región que corresponde a la región total de linfocitos tomando en cuenta los parámetros de tamaño y complejidad.

5.10. Análisis estadístico

Se utilizó el lenguaje de programación R tanto para el análisis estadístico como para hacer las gráficas. Se aplicó un modelo lineal de efectos mixtos tomando en cuenta que el diseño experimental fue un modelo de dos niveles, donde tenemos medidas repetidas de distintas muestras en diferentes grupos de tratamiento. Este modelo se aplicó en los datos de proliferación y expansión en cada una de las poblaciones celulares.

Se realizó una ANOVA de 2 vías para comparar los datos de inmunofenotipo entre los

²Este tubo se utilizó como control negativo pues no se le añadieron anticuerpos.

diferentes tratamientos, el número de progenitores entre tratamientos y poblaciones celulares.

Se realizó una ANOVA de 1 vías para comparar los datos de LTC-IC al día cero.

Se realizó la prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples en todos los casos. Los datos significativos se consideraron a una $p < 0.05$.

Capítulo 6

Resultados

"The best part of science is
knowing,for a moment, something
that nobody else in the world
knows." - Jason McDermott
@redpenblackpen

6.1. Características de las poblaciones celulares en el día cero (células sin cultivar)

Los resultados de esta tesis se obtuvieron a partir de 21 muestras de SCU trabajadas por separado. De cada una de estas muestras, se obtuvieron las CMN a partir de las cuales se hicieron los cultivos correspondientes y se obtuvieron las poblaciones de interés. Como se mencionó previamente, se utilizó un mínimo de 60×10^6 y un máximo de 120×10^6 de CMN para pasarlas por la columna de inmunoselección y obtener a la población enriquecida en células CD34+ Lin-. Posteriormente, las células enriquecidas además fueron marcadas con el anticuerpo CD34 APC para obtener una población purificada CD34+ y la fracción negativa. En la tabla 6.1 se muestran las características de las muestras y las poblaciones celulares obtenidas:

Características	Media $\pm$ Desv.Est (Núm. de células $\times 10^6$)
Volumen promedio por unidad de SCU (ml) n=19	64 ± 22
Células nucleadas obtenidas después del gra- diente de Ficoll (1-5 ml) n=19	240.75 ± 131
CMN totales por ml de muestra	54.6 ± 29
Número total de células Lin- recuperadas después de la inmunoselección n=20	1.3 ± 1.1
Número total de células CD34+ purificadas mediante selección positiva por citometría n=9	0.113 ± 0.096
Número total de células CD34- purificadas obtenidas mediante selección negativa por ci- tometría n=9	0.052 ± 0.037

Tabla 6.1: Resumen de las características de las muestras utilizadas y poblaciones celulares obtenidas al día cero.

En promedio, se pasaron 106×10^6 por la columna magnética para obtener a la población enriquecida CD34+ Lin-, el porcentaje de recuperación fue de $1.2\% \pm 0.9$, es decir, aproximadamente 1.3×10^6 células. A partir de éstas muestras, 9 fueron utilizadas para realizar los cultivos celulares y ensayos correspondientes para esta población. Las otras muestras enriquecidas fueron marcadas con el anticuerpo CD34 APC para obtener a las poblaciones purificadas y además se separó la cantidad establecida para hacer los ensayos funcionales al día cero. Se hizo además, un *pool* de dos muestras enriquecidas para tener la cantidad suficiente de células para llevarlas al citómetro. Se obtuvieron al final 9 muestras de células purificadas CD34+ y CD34- para trabajar, de las cuales las células CD34+ equivalen al $9.21\% \pm 6.8$ del total de células enriquecidas que se llevaron al citómetro, mientras que se obtuvo un $5.5\% \pm 6.2$ de células CD34-, y si tomamos en cuenta a la población total de CMN estaríamos hablando de que se recuperó el $.10\% \pm .08$ de células CD34+ y un $.04\% \pm .03$ de células CD34-.

Después de haber obtenido a las 4 poblaciones celulares para este estudio, se realizaron ensayos de colonias para determinar el contenido de progenitores al día cero, asimismo, cada población se analizó mediante citometría de flujo para poder determinar el

porcentaje relativo de las poblaciones que se indican en la siguiente tabla:

	CMN	Lin-	CD34+	CD34-
% UFC totales	0.70 ± 0.6	20.6 ± 8.8	50.3 ± 22.5	7.7 ± 6.1
% UFC mieloides	0.26 ± 0.1	6.0 ± 2.8	14.4 ± 6.9	0.6 ± 0.7
% UFC eritroides	0.44 ± 0.4	14.3 ± 6.5	35.6 ± 16.4	7.1 ± 5.8
% UFC mixtas	0	0.2 ± 0.3	0.2 ± 0.3	0
% relativo de células CD34+	1.7 ± 1	62 ± 2.5	99.7 ± 0.5	0
% relativo de células CD34+ CD38+	1.5 ± 0.9	58 ± 2	94.6 ± 2.2	0
% relativo de células CD34+ CD38-	0.19 ± 0.2	4 ± 4	5.3 ± 2.2	0

Tabla 6.1: Caracterización inicial de cada una de las poblaciones celulares utilizadas en este estudio. UFC: Unidad formadora de colonias; CMN: células mononucleares; Lin-: células enriquecidas en CD34+ Lin- obtenidas mediante el *kit* de inmunoselección negativa EasySepTM; CD34+: células purificadas mediante citometría de flujo. Se muestra la media y la desviación estándar (D.E) de cada una de las poblaciones n= 3-5

Como se puede observar en la tabla 6.1, a medida en que la población obtenida es más pura, el porcentaje de formación de colonias aumenta. En la muestras utilizadas, el enriquecimiento en veces de CFC después de pasar las CMN por la columna inmunomagnética fue de 29 veces, y de la población purificada fue de 71 veces.

El porcentaje relativo de células CD34+ en las CMN previo a la inmunoselección por columna y el porcentaje de CD34+ de las células Lin- recuperadas, son consistentes con lo reportado por Wognum *et al* [24] en donde mencionan que el contenido de células CD34 + de la fracción enriquecida suele oscilar entre el 50 y el 75 % del total de las células. Asimismo, los porcentajes que presento en la tabla 6.1 de porcentaje de células formadoras de colonias y del porcentaje relativo de células CD34+ concuerdan con estudios previos realizados por nuestro grupo en donde también se utiliza un sistema de inmunoselección negativa [55, 87, 115, 116], estos porcentajes están dentro de los intervalos reportados.

En la figura 6.1 se muestran *plots* representativos del análisis de los porcentajes relativos de CD34 y CD38 en la población de CMN y de células enriquecidas Lin-. En la figura **a.** se muestra el *plot* de autofluorescencia (sin anticuerpos), posteriormente la figura **b.** que corresponde a las células mononucleares muestra un porcentaje bajo de células troncales y progenitoras en comparación con la figura **c.** correspondiente a las células enriquecidas en donde el porcentaje relativo de CD34+ y células dobles positivas (CD34+CD38+) aumenta, lo cual muestra que sí hubo un enriquecimiento de células primitivas a partir de las células mononucleares. La presencia de progeni-

tores funcionales para ambas poblaciones se corroboró mediante ensayos de colonias, estos resultados se reportan más adelante.

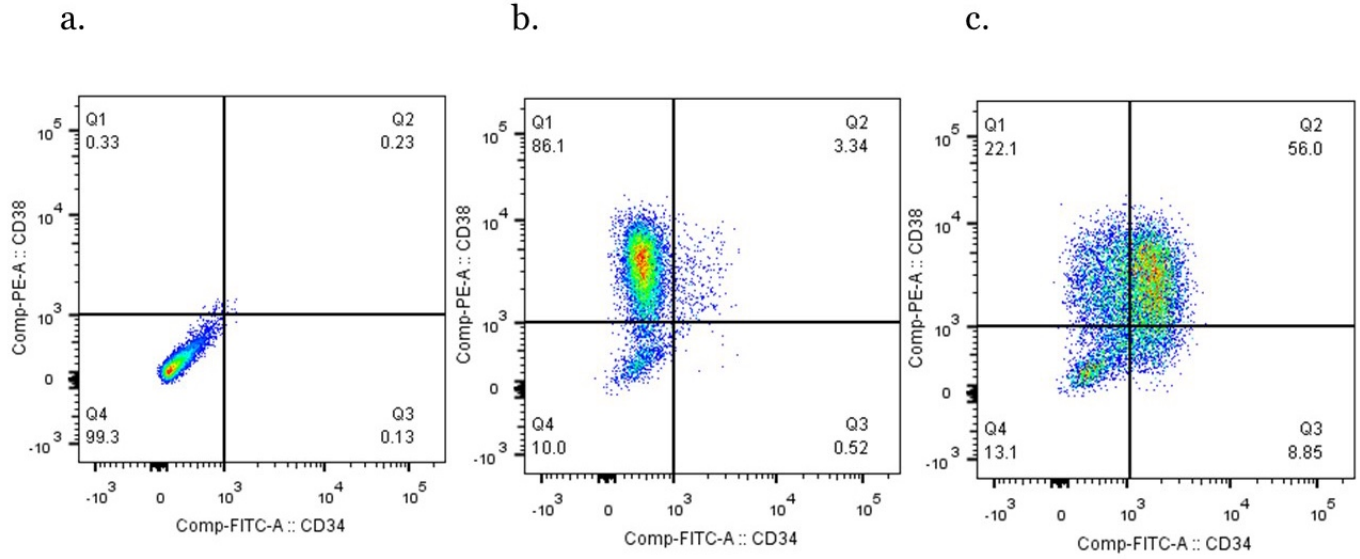


Figura 6.1: Enriquecimiento de las CMN. **a.**Plot de autofluorescencia. **b.** Células mononucleares previo al enriquecimiento por selección negativa (EasySep™). **c.** Población enriquecida Lin- recuperada después de la inmunoselección.

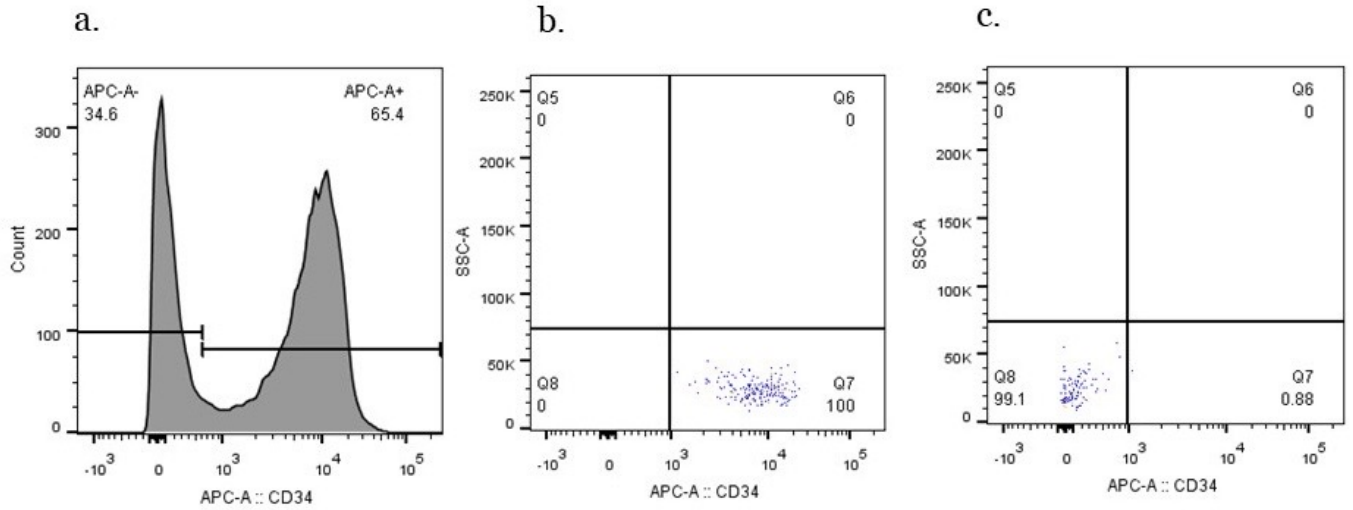


Figura 6.2: Obtención de las poblaciones purificadas mediante FACS. **a.** Porcentaje relativo de células CD34+ y negativas en la población enriquecida Lin-. **b.** Porcentaje de células purificadas CD34+ recuperadas después del sort. **c.** Porcentaje de células purificadas CD34- recuperadas después del sort.

En la figura 6.2 se muestran *plots* representativos de la purificación de células CD34+ mediante *cell sorting* a partir de células enriquecidas Lin-. En la figura **a.** se muestra

el plot correspondiente la selección de las poblaciones CD34+ y CD34- previo a su separación. Posteriormente la figura **b.** muestra el porcentaje de células CD34+ después del *sort* mientras que la figura **c.** corresponde al porcentaje de células que no presentan al antígeno CD34 (células CD34-).

6.2. Contenido de progenitores y células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC) al día cero

Con el fin de evaluar el contenido de progenitores al día cero, se realizaron los ensayos de colonias correspondientes como se indica en la tabla 5.2 para cada una de las poblaciones celulares y con cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	UFC en CMN	UFC en Lin-	UFC en CD34+	UFC en CD34-
Control	353.5 $\pm$ 302.1	11,444.4 $\pm$ 5,607.1	25,148.1 $\pm$ 11,289.6	3,888.8 $\pm$ 3,083.4
DMSO	274.4 $\pm$ 200.3	12,255.5 $\pm$ 6,447.1	22,166.7 $\pm$ 10,340.3	3,562.5 $\pm$ 3,666.5
UM171	308.3 $\pm$ 229	11,044.4 $\pm$ 6,678.5	25,703.6 $\pm$ 9,223.96	3,648.1 $\pm$ 3,541.8
OAC-1	271.1 $\pm$ 196.3	15,511.1 $\pm$ 12,791	25,425.6 $\pm$ 7595.7	6,119 $\pm$ 4,767.4
UM171 + OAC-1	175.5 $\pm$ 99.1	12,988.88 $\pm$ 8,418.7	19,981.3 $\pm$ 7,933.1	4,092.5 $\pm$ 3,346.9

Tabla 6.2: Contenido de progenitores al día cero de cada una de las poblaciones celulares utilizadas en este estudio. UFC: Unidad formadora de colonias; CMN: células mononucleares; Lin-: células enriquecidas en CD34+ Lin- obtenidas mediante el *kit* de inmunoselección negativa EasySepTM; CD34+ y CD34-: células purificadas mediante citometría de flujo. Los datos representan el potencial de formación de colonias por cada 50,000 células cultivadas. Se presenta la media y la desviación estándar (D.E) de 9 - 7 experimentos independientes. Se evaluaron estadísticamente con una ANOVA de dos vías y se consideraron diferencias significativas a partir de una $p < 0.05$.

La tabla 6.2 muestra el contenido de progenitores al día cero a partir de su potencial de formación de colonias en cultivos semisólidos por cada 50,000 células. No existen diferencias significativas entre cada tratamiento, sin embargo, si las hay entre cada población. Las células purificadas CD34- presentan diferencias significativas con respecto a las CMN, mientras que las células Lin- presentan diferencias respecto a las células purificadas CD34- y a las CMN. Por su parte, las células purificadas CD34+ presentan diferencias con respecto a las tres poblaciones celulares. Como se puede observar, la población purificada CD34+ presenta una mayor cantidad de progenitores.

Para evaluar la presencia de células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC) en cada población celular después de haberlas obtenido, se sembró la cantidad co-

respondiente como se indica en la tabla 5.2 sobre una capa alimentadora de células estromales como se describe en el capítulo de "Materiales y métodos".

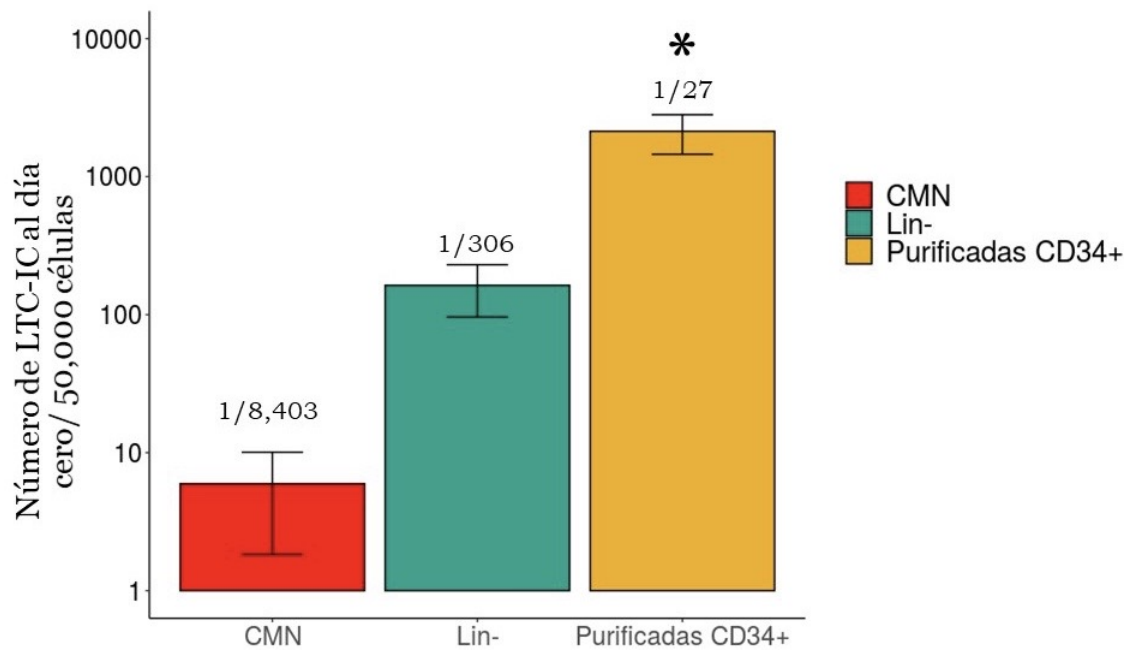


Figura 6.3: Contenido de células iniciadoras de cultivo a largo plazo al día cero. Se presenta la media y el error estándar de 6 - 5 experimentos independientes. Se evaluaron estadísticamente con una ANOVA de una vía y se consideraron diferencias significativas a partir de una $p < 0.05$.

En la figura 6.3 se presenta el número de células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC) de cada población celular, no se muestra la barra correspondiente a las células purificadas CD34- debido a que de los 6 experimentos que se hicieron ninguno presentó colonias después de finalizar el experimento por lo que no fueron consideradas para el análisis estadístico. Solamente la población purificada CD34+ presentó diferencias significativas con respecto a las otras poblaciones celulares. Aunque no existan diferencias significativas entre la población enriquecida Lin- y las CMN debido a la variación que se presentó en el número de LTC-IC, no obstante es notorio el hecho de que en promedio, existan más LTC-IC en la población Lin- lo cual va acorde a la expresión relativa del antígeno CD34 previamente reportado. Asimismo, a partir de estos datos obtenidos de manera experimental, se obtuvo la frecuencia que correspondería de encontrar 1 LTC-IC en cada población celular.

6.3. Proliferación y expansión de las 4 poblaciones celulares con citocinas (Condición control)

Con el fin de evaluar la capacidad funcional de las poblaciones celulares, se evaluó la proliferación (a partir del número de células nucleadas totales determinadas por conteo en cámara de Neubauer sin importar el linaje o el estado de maduración de las células que se generan) y la capacidad expansión (evaluada por la capacidad de formar colonias en cultivos semisólidos como se indica en la tabla 5.2.) Se realizaron estos ensayos para las 4 poblaciones celulares como se puede observar en las figuras 6.4 y 6.5.

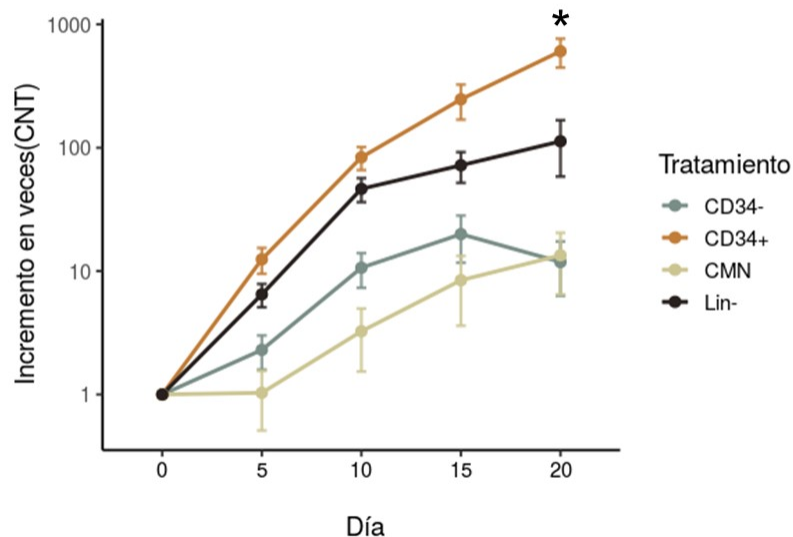


Figura 6.4: Cinética de proliferación de las 4 poblaciones celulares evaluadas en la condición control (5 citocinas). Los datos representan el incremento en veces del número total de células nucleadas comparadas contra el día cero. Se presenta la media y el error estándar de 9 - 7 experimentos independientes. Se evaluaron estadísticamente con un modelo lineal de efectos mixtos y se consideraron diferencias significativas a partir de una $p < 0.05$.

Al evaluar la capacidad de proliferación de las 4 poblaciones celulares se observó que la población purificada CD34+ presentó una mayor capacidad proliferativa en comparación con las demás poblaciones. Al día 20 se presentó el incremento máximo (605 veces) además de presentar diferencias significativas con respecto a las CMN, a

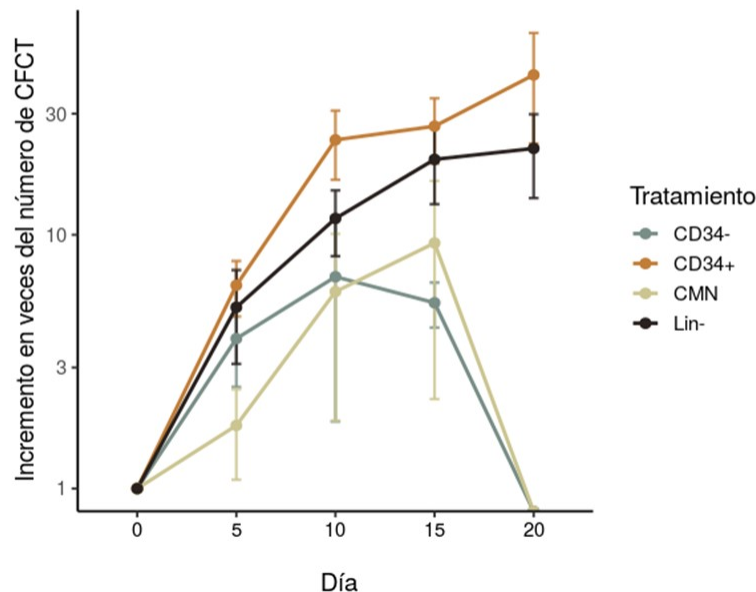


Figura 6.5: Cinética de expansión de las 4 poblaciones celulares evaluadas en la condición control (5 citocinas). Los datos representan el incremento en veces del número total de células formadoras de colonias totales (CFCT) comparadas con el día cero. Se presenta la media y el error estándar de 9 - 7 experimentos independientes. Se evaluaron estadísticamente con un modelo lineal de efectos mixtos y se consideraron diferencias significativas a partir de una $p < 0.05$.

las células enriquecidas Lin- y a las células CD34- con una $p < 0.0001$ en los 3 casos.

A lo largo de la cinética de los cultivos de las células CD34- y las CMN, el número de muestras fue reduciendo debido al agotamiento de las células en cultivo.

Se evaluó la capacidad de expansión en términos del incremento en veces del número de células formadoras de colonias totales (CFCT) con respecto al día cero. En la tabla 6.1 se muestra el contenido de progenitores en el día cero para todas las poblaciones celulares. Aunque la figura 6.5 no presenta diferencias estadísticamente significativas, se observa una tendencia en la población purificada CD34+ en presentar un mayor incremento en veces en términos del contenido de progenitores evaluado mediante ensayos de colonias, presentando el máximo de expansión al término del cultivo que fue de 42 veces. Asimismo, en los cultivos de CMN y de CD34- debido al bajo número de células en el día 15, fue evidente la pérdida de su capacidad de expansión, sin embargo, más adelante se discutirá cada caso en la población correspondiente

6.4. Cinéticas de proliferación de las 4 poblaciones celulares en presencia de moléculas pequeñas.

Como se mencionó anteriormente, se consideró la proliferación como el número total de células nucleadas en cultivo sin importar el linaje o estado de maduración. El parámetro que se utilizó para evaluarlo, fue un conteo total de células nucleadas en cada pozo con ayuda de la cámara de Neubauer y un microscopio óptico invertido. Este conteo se realizó cada 5 días.

Para evaluar los efectos de las moléculas pequeñas sobre la proliferación, se realizaron cultivos que contenían solamente a la molécula (sin citocinas en el medio), no obstante, las 4 poblaciones presentaron pérdida celular al día 5, por lo que no hubo el suficiente número de células para hacer resiembras, por tal motivo, la cinética no se siguió (datos no mostrados) 6.6.

Debido a lo anterior, en los siguientes experimentos, la proliferación de las 4 poblaciones celulares se determinó en presencia de la molécula pequeña correspondiente, junto con 5 citocinas: SCF, TPO, Flt3-l, IL-3, IL6 (cada una a una concentración de 10ng/ml). Los resultados se presentan en la figura 6.6.

En la gráfica **A** correspondiente a las CMN se inició con 9 cultivos provenientes de diferentes muestras, cada cultivo se inició como se indica en la figura 5.1 en el capítulo de "Materiales y Métodos", sin embargo, 4 de estos cultivos no proliferaron después del día 5, por lo que la cinética de proliferación se siguió con los cultivos restantes; no obstante, para el final de los cultivos solamente quedaron 2 para todas las condiciones excepto en la condición control, pues al día 20 se contaba con 3 cultivos. Como se puede observar en la gráfica, existe una tendencia de presentar una mayor proliferación en los días de cultivo en la condición control y fue en el día 20 cuando se presentó el incremento en veces máximo (13 veces), no obstante, no presenta diferencias significativas respecto a las condiciones con DMSO, OAC-1 y ambos fármacos pues, como se explica anteriormente, el número de cultivos de las demás condiciones es bajo. UM171, sin embargo, presentó un incremento en veces de 9 para el final del cultivo.

La cinética de proliferación de la población Lin- que se muestra en la gráfica **B**, se inició con 9 cultivos e indica que la condición con UM171 presenta diferencias significativas respecto a las condiciones con OAC-1, DMSO y la condición control, el incremento en veces para esta condición fue de 329 veces en el día 20 el incremento

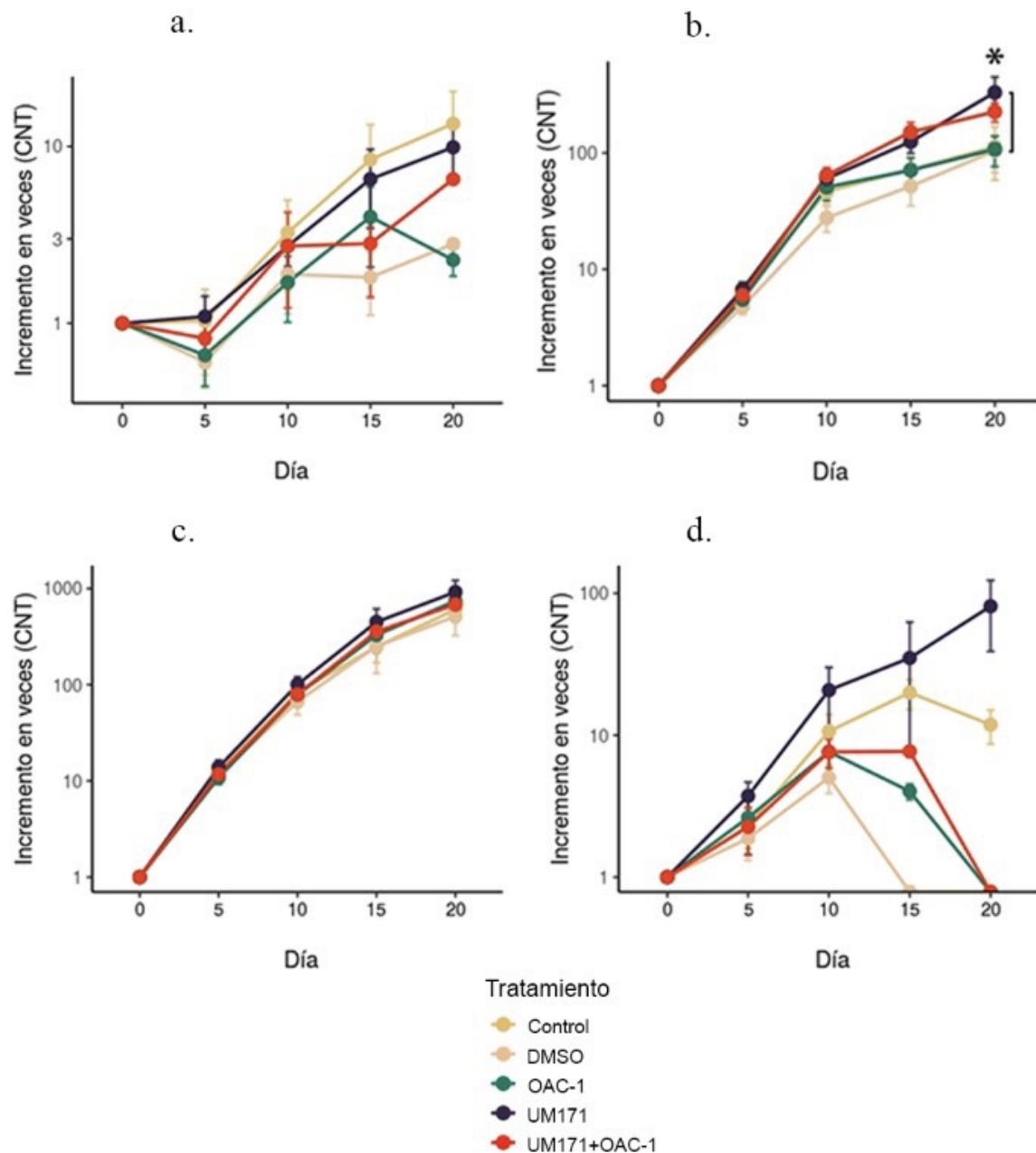


Figura 6.6: Cinética de proliferación de las 4 poblaciones celulares evaluadas en la condición control (5 citocinas). **A** Células mononucleares. **B** Células Lin-. **C** Células purificadas CD34+. **D** Células purificadas CD34-. Los datos representan el incremento en veces del número total de células nucleadas comparadas contra el día cero. Se presenta la media y el error estándar de 9 - 7 experimentos independientes. Se evaluaron estadísticamente con un modelo lineal de efectos mixtos y se consideraron diferencias significativas a partir de una $p < 0.05$.

en veces, seguido de la condición con ambos fármacos (225 veces) sin embargo este no presentó diferencias significativas con respecto a las demás condiciones.

La gráfica **C**, correspondiente a las células CD34+ purificadas muestran cinéticas similares entre sí en los 5 tratamientos, por lo que no hay diferencias significativas, sin embargo UM171 presentó el incremento máximo al día 20 (918 veces) seguido de OAC-1 (741 veces) y de ambos fármacos (681 veces).

La cinética de proliferación de las células purificadas CD34- que se muestra en la gráfica **D**, se inició con 9 cultivos a partir de las células recuperadas en el citómetro, no obstante, conforme fueron avanzando los días en cultivo, se fueron perdiendo muestras debido al agotamiento celular de los cultivos *in vitro*. Para la condición con DMSO al día 15 ya no presentó proliferación, mientras que la condición con ambos fármacos y OAC-1 presentó también pérdida celular, ambos a partir del día 15 y al día 20 ya no hubo proliferación. Por otro lado, las condiciones control y con UM171, sí presentaron proliferación de las muestras que quedaron (2 en cada condición). Como se puede observar la condición con UM171 presenta el incremento en veces máximo al día 20 (80 veces), sin embargo, el número de muestras es muy reducido para poder determinar si existen diferencias significativas con respecto al control el cual, presentó un incremento en veces de 11.

6.5. Inmunofenotipo

Se evaluó la presencia de los marcadores CD34 y CD38 para determinar si hubo o no expansión, es decir, la capacidad de que las células generadas *in vitro* conservaran características de la población original, en este caso la presencia o ausencia de los marcadores antes mencionados. Esto solamente se pudo evaluar en las poblaciones celulares enriquecidas Lin- y purificadas CD34+, pues fueron las poblaciones que presentaron mayor proliferación y contaban con el número suficiente de células para realizar los demás ensayos en los demás días.

En las figuras 6.7 y 6.8 se presenta la expresión relativa del marcador CD34+ evaluado mediante citometría de flujo en los días 0, 10 y 15. Como es de notar, la expresión de este marcador se va reduciendo a lo largo del cultivo pues a medida que aumenta el nivel de maduración de las células hematopoyéticas y se diferencian hacia un linaje este marcador no aparece en los estadios más maduros.

Si bien, en la figuras 6.7 y 6.8 no existen diferencias significativas entre los días 10

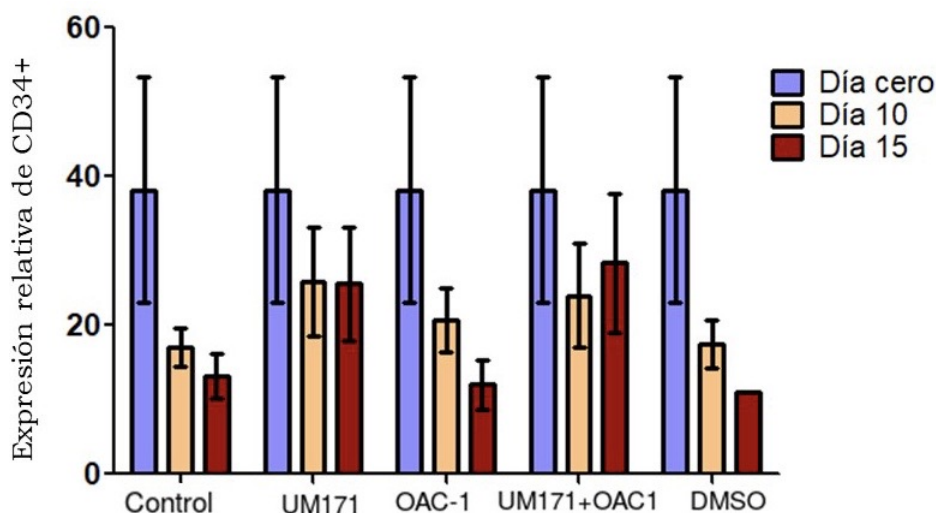


Figura 6.7: Los datos representan la expresión relativa del marcador CD34 de las células Lin-. Se presenta la media y el error estándar de 7- 3 experimentos independientes.

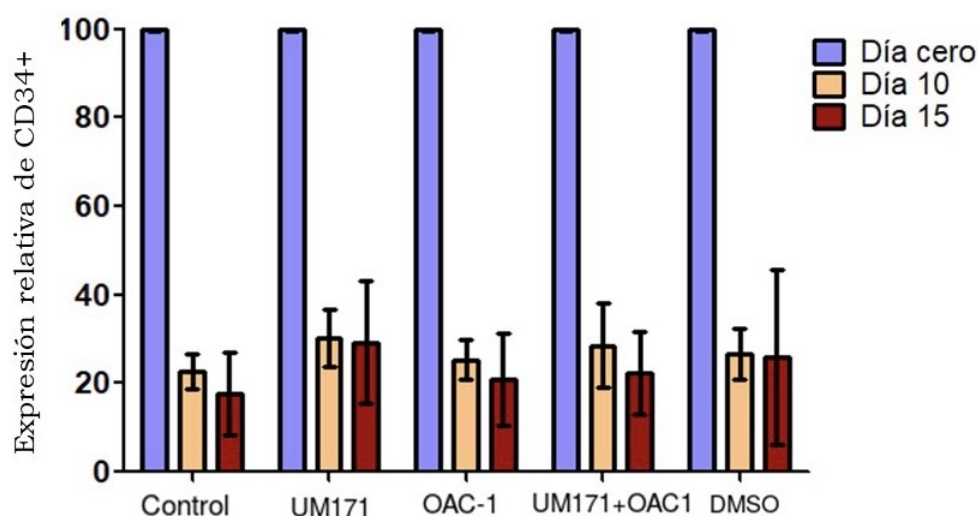


Figura 6.8: Los datos representan la expresión relativa del marcador CD34 de las células CD34+ purificadas. Se presenta la media y el error estándar de 7- 3 experimentos independientes.

y 15 en cada uno de los tratamientos, como previamente se mencionó , la expresión de CD34 disminuye a lo largo del cultivo, sin embargo, en las células Lin- en la condición con UM171 y ambos fármacos, se observa que no hay disminución de este marcador, lo cual es consistente con la descripción de UM171 como un atenuador de la diferenciación.[107]. Asimismo, este efecto se observa en las células purificadas cultivadas con UM171.

Asimismo, se evaluó la expresión del marcador CD38 para así poder determinar el número total de células en los días 10 y 15 con inmunofenotipo CD34+ CD38- y CD34+ CD38+ (dobles positivas).

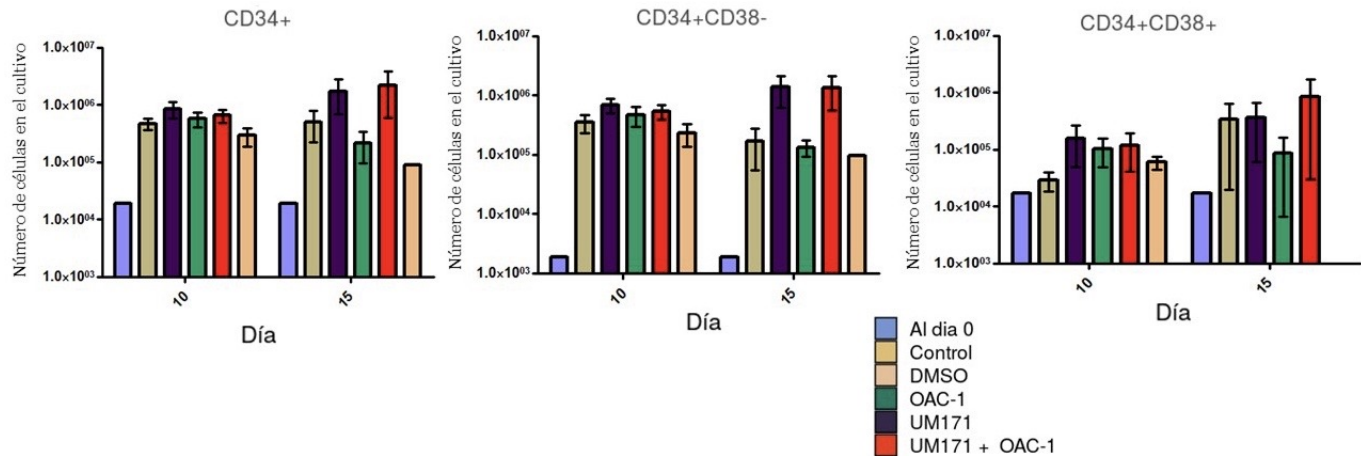


Figura 6.9: Evaluación del inmunofenotipo en los días 10 y 15 del cultivo de células Lin-. Los datos representan el número de células en el cultivo tomando en cuenta el incremento en veces del día correspondiente y separadas por cada población evaluada. Se presenta la media y el error estándar de 7 - 5 experimentos independientes. Se evaluaron estadísticamente con una ANOVA de dos vías y se consideraron diferencias significativas a partir de una $p < 0.05$.

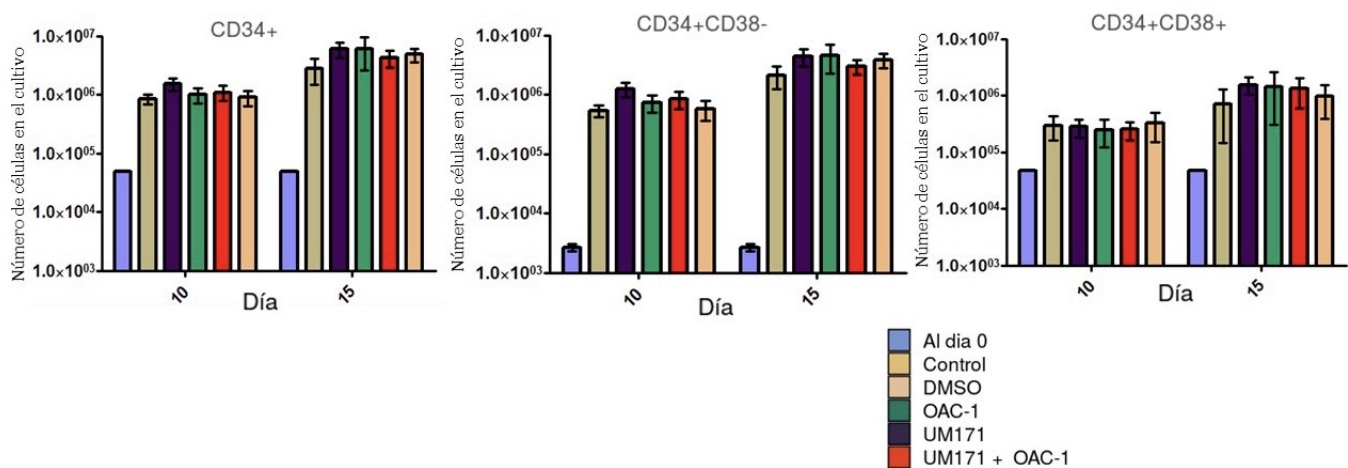


Figura 6.10: Evaluación del inmunofenotipo en los días 10 y 15 del cultivo de células purificadas CD34+. Los datos representan el número de células en el cultivo tomando en cuenta el incremento en veces del día correspondiente y separadas por cada población evaluada. Se presenta la media y el error estándar de 7 - 5 experimentos independientes. Se evaluaron estadísticamente con una ANOVA de dos vías y se consideraron diferencias significativas a partir de una $p < 0.05$.

Se hizo el análisis estadístico correspondiente y en cada una de las poblaciones celular-

res no existen diferencias significativas entre cada tratamiento, pero sí hay diferencias significativas entre las poblaciones celulares, es decir existe un mayor número de células con inmunofenotipo "troncal" (CD34+ CD38-) a comparación de los progenitores al día 10 en la población Lin-. También hay diferencias significativas en células CD34+ CD38- en comparación con las dobles positivas en el día 10 y 15 en las células purificadas CD34+.

6.6. Contenido de LTC-IC al día 10 de cultivo

Se evaluó el contenido neto de LTC-IC por cada 50,000 células para las poblaciones celulares enriquecidas Lin- y purificadas CD34+.

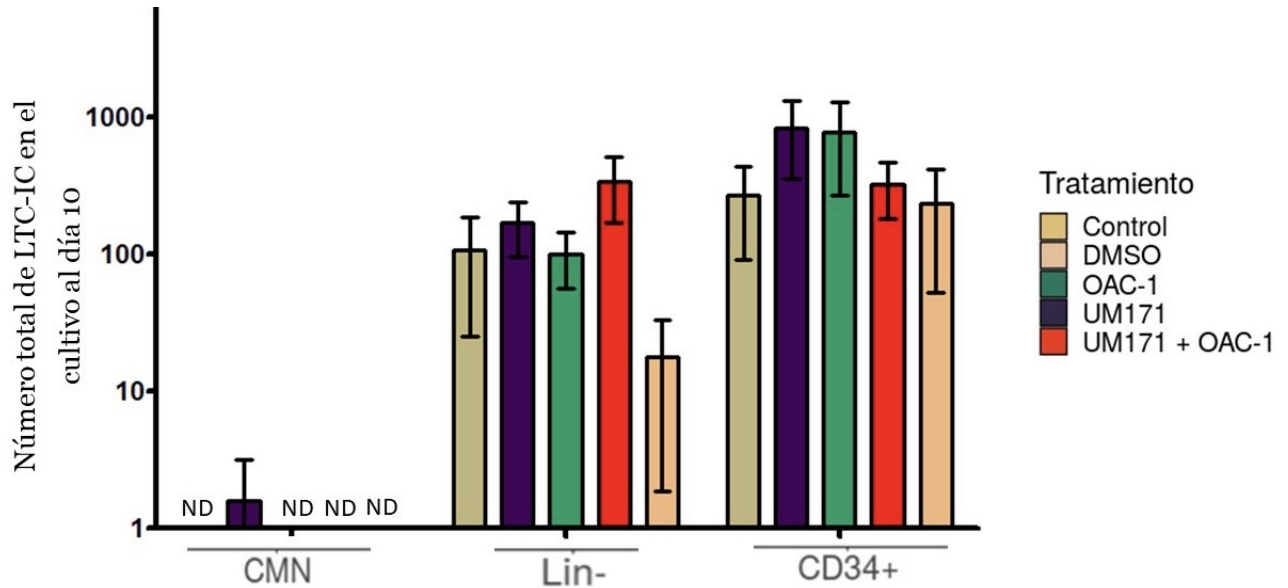


Figura 6.11: Los datos representan el contenido total de células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC) en el día 10 de cultivo. Se presenta la media y el error estándar de 6- 5 experimentos independientes. Se evaluaron estadísticamente con una ANOVA de una vía los datos de cada población celular y se consideraron diferencias significativas a partir de una $p < 0.05$.

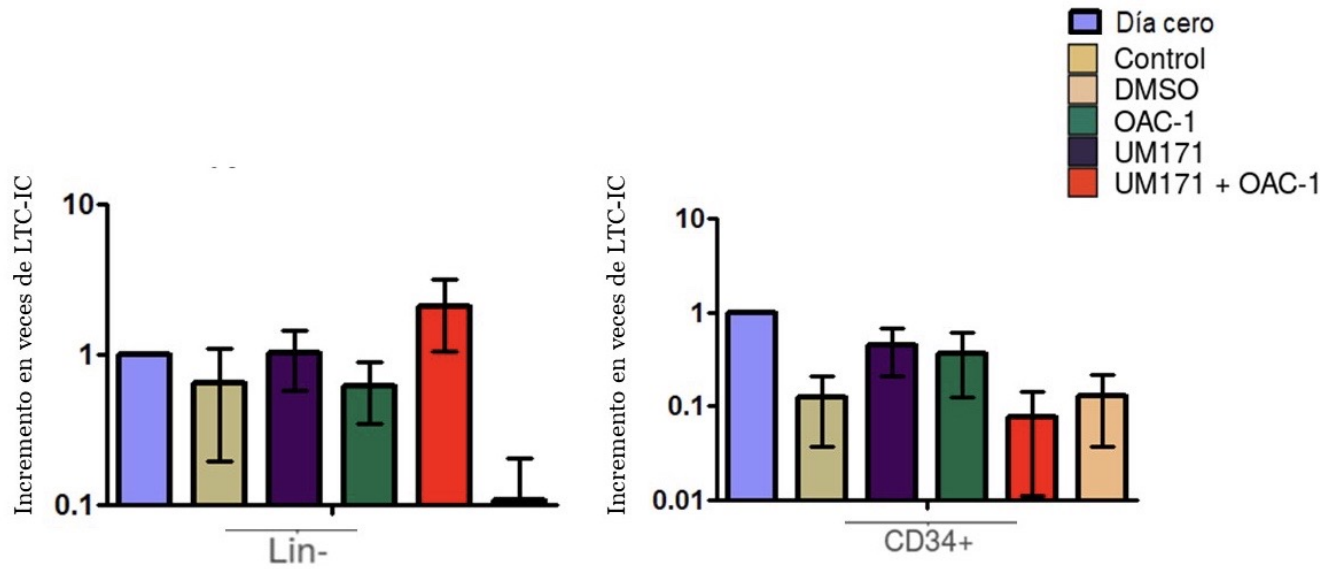


Figura 6.12: Los datos representan el incremento en veces de células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC) en el día 10 de cultivo. Se presenta la media y el error estándar de 6- 5 experimentos independientes. Se evaluaron estadísticamente con una ANOVA de una vía los datos de cada tratamiento para cada población celular y se consideraron diferencias significativas a partir de una $p < 0.05$.

6.7. Cinéticas de expansión

Después de 5 días del inicio del cultivo y hasta finalizar (día 20), se evaluó de manera funcional el contenido de progenitores mediante ensayos de colonias como se indica en la tabla refcolony en capítulo de "Materiales y métodos." De esta manera, se determinó la capacidad de expansión de cada uno de los tipos celulares a partir de la capacidad de los progenitores para generar colonias tomando en cuenta el número de progenitores que había al inicio del cultivo como se muestra en la figura 6.2.

En estos ensayos, se contó la cantidad total de colonias y se extrapoló al incremento en veces acumulado del día del cultivo y la condición correspondiente para obtener la cantidad total de progenitores que se tenía en ese día. Con este dato, se obtuvo el número de veces que se incrementó la cantidad de progenitores para cada uno de los días evaluados.

De esta manera, se presentan a continuación las gráficas de expansión de colonias totales, colonias mieloides y colonias eritroides para cada población celular.

En el caso de la expansión de las CMN en la figura 6.13 conforme fue avanzando el cultivo, la condición control fue la que presentó el incremento máximo de expansión de colonias totales (9 veces) y eritroides (7 veces). En el caso de las colonias mieloides la condición con UM171 presentó un incremento de 14 veces, mientras que la condición control presentó un incremento de 13 veces. No hubo expansión en el caso de las colonias mixtas y no se muestra gráfica de este tipo de colonias pues conforme avanzó el cultivo, ya no se observaron este tipo de colonias en los siguientes días en la mayoría de los cultivos.

En la figura 6.15 correspondiente a las células Lin- podemos observar que, en todas las condiciones existe una expansión, sin embargo, al igual que en la gráfica de proliferación, la condición con UM171 fue la que presentó una mayor capacidad de expansión con un incremento máximo al día 20 de 62 veces presentando diferencias significativas con respecto al control y las condiciones con OAC-1 y DMSO. Asimismo, el incremento en veces máximo para la expansión de células formadoras de colonias mieloides también lo presentó UM171 (179 veces) mientras que la condición con ambos fármacos presentó un incremento de 150 veces, este último no presentó diferencias significativas. En cuanto a los progenitores eritroides, hay una tendencia en que la condición UM171 presente un mayor incremento en veces (17 veces) seguido de la condición con ambos fármacos (12 veces), no obstante no presentaron diferencias significativas.

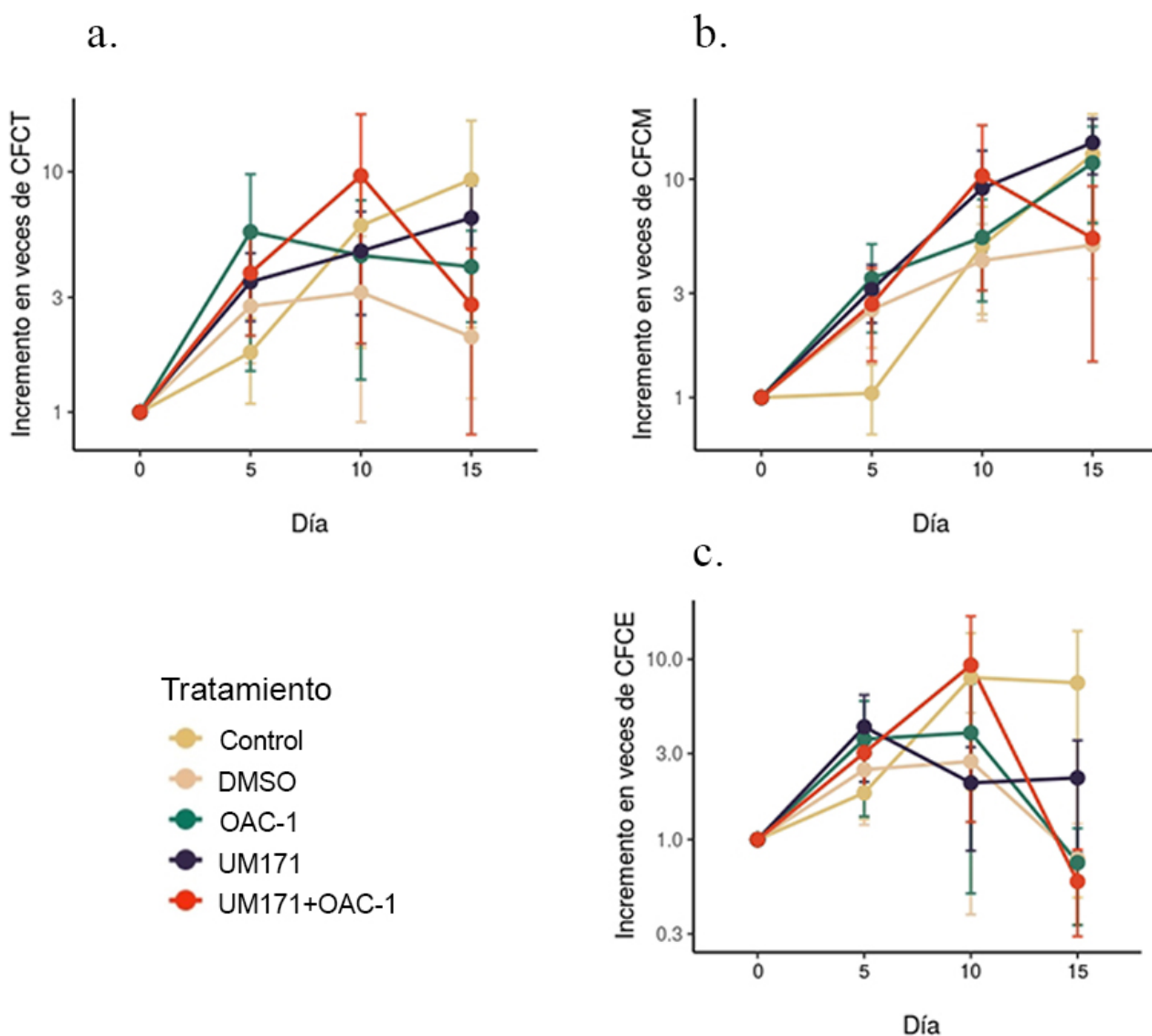


Figura 6.13: Cinética de expansión de las CMN. **a** Cinética de expansión de CFCT. **B** Cinética de expansión de CFCM. **c** Cinética de expansión de CFCE. Los datos representan el incremento en veces del número total de células formadoras de colonias comparadas contra el día cero. Se presenta la media y el error estándar de 7 - 3 experimentos independientes. Se evaluaron estadísticamente con un modelo lineal de efectos mixtos y se consideraron diferencias significativas a partir de una $p < 0.05$. *CFCT*: Células formadoras de colonias totales; *CFCM*: Células formadoras de colonias mieloides; *CFCE*: Células formadoras de colonias eritroides

En cuanto a la expansión de células purificadas CD34+ la condición que presentó un incremento en veces mayor fue la que tenía ambos fármacos (92 veces) seguido por UM171 (68 veces), de igual manera la condición con ambos fármacos fue la que

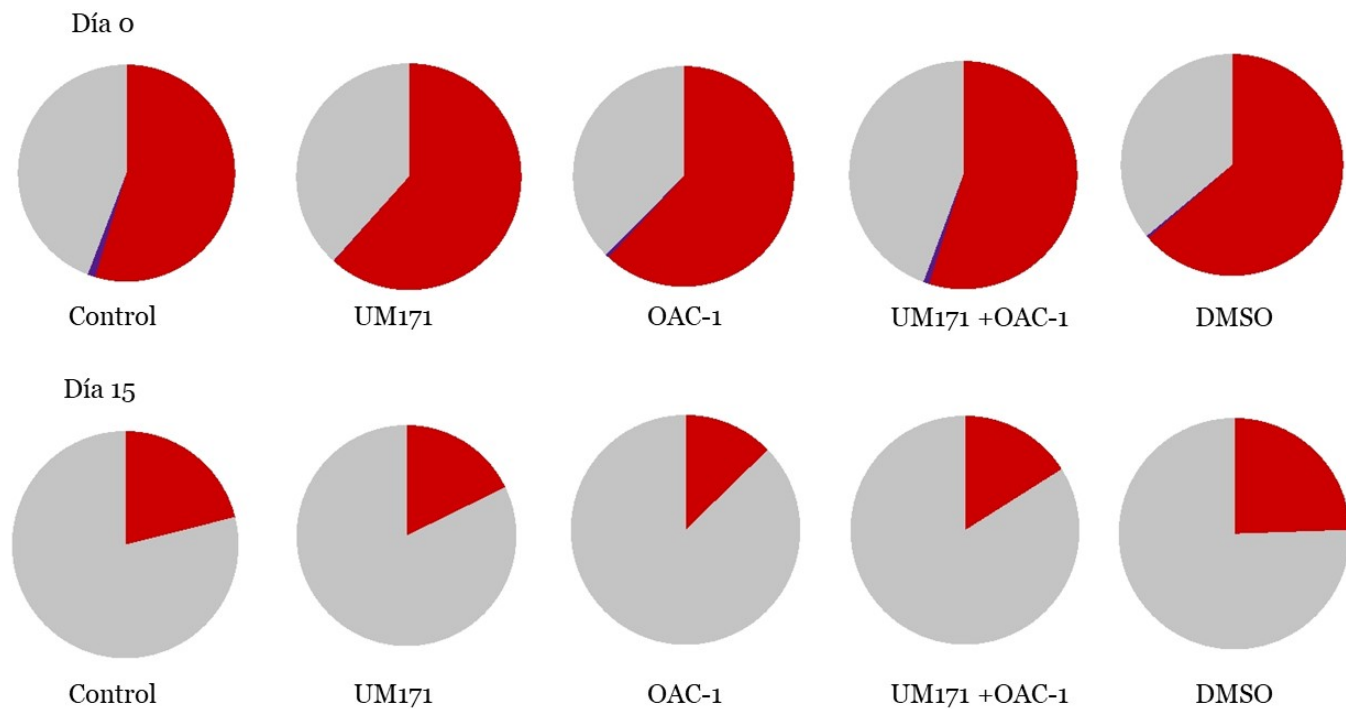


Figura 6.14: Proporciones relativas del tipo de progenitores que había en la población de CMN desde el día de su aislamiento (día cero) y la proporción de progenitores al día 15 de cultivo. Los datos representan la media del porcentaje sobre el número total de colonias formadas en el día cero y 15 en cada uno de los tratamientos. El color gris corresponde a progenitores mieloides; el color rojo corresponde a progenitores eritroides y el color morado a progenitores mixtos.

presentó los incrementos máximos al día 20 para las colonias mieloides y eritroides (453 y 22 veces respectivamente).

Como se puede observar en la figura 6.18 la capacidad de expansión de las células purificadas CD34- va disminuyendo desde el día 15, al día 20 ya no se pusieron ensayos, pues no había el suficiente número celular, al final de la cinética de expansión de progenitores mieloides y eritroides al día 15, solo se contaban con dos muestras para las condiciones Control, UM171 y OAC-1, mientras que para ambos fármacos solo había una y para DMSO ya no había células desde el día 10. Sin embargo, al menos para la expansión de progenitores mieloides hay incremento en veces de colonias blancas de 35 veces en la condición control y 33 veces para UM171, ambas condiciones son las que sí presentaron expansión.

A manera de comparar el tipo de progenitores presentes durante el cultivo de estas

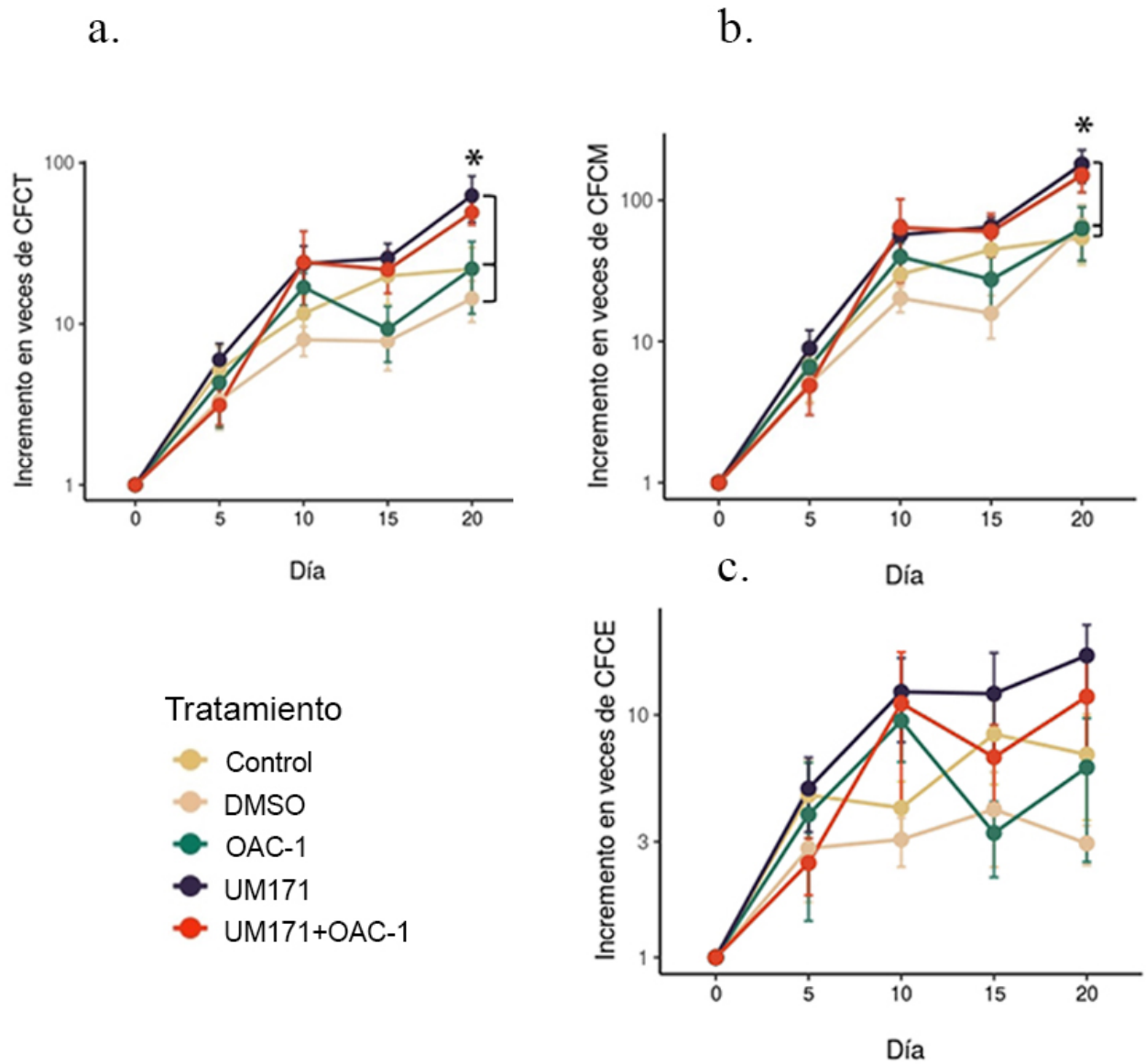


Figura 6.15: **a** Cinética de expansión de CFCT. **B** Cinética de expansión de CFCM. **c** Cinética de expansión de CFCE. Los datos representan el incremento en veces del número total de células formadoras de colonias comparadas contra el día cero. Se presenta la media y el error estándar de 9 - 7 experimentos independientes. Se evaluaron estadísticamente con un modelo lineal de efectos mixtos y se consideraron diferencias significativas a partir de una $p < 0.05$.

CFCT: Células formadoras de colonias totales; CFCM: Células formadoras de colonias mieloides; CFCE: Células formadoras de colonias eritroides.

dos poblaciones purificadas, en las figuras 6.19 y 6.20 se presentan las proporciones relativas de progenitores mieloides, eritroides y mixtas. Algo interesante es que las

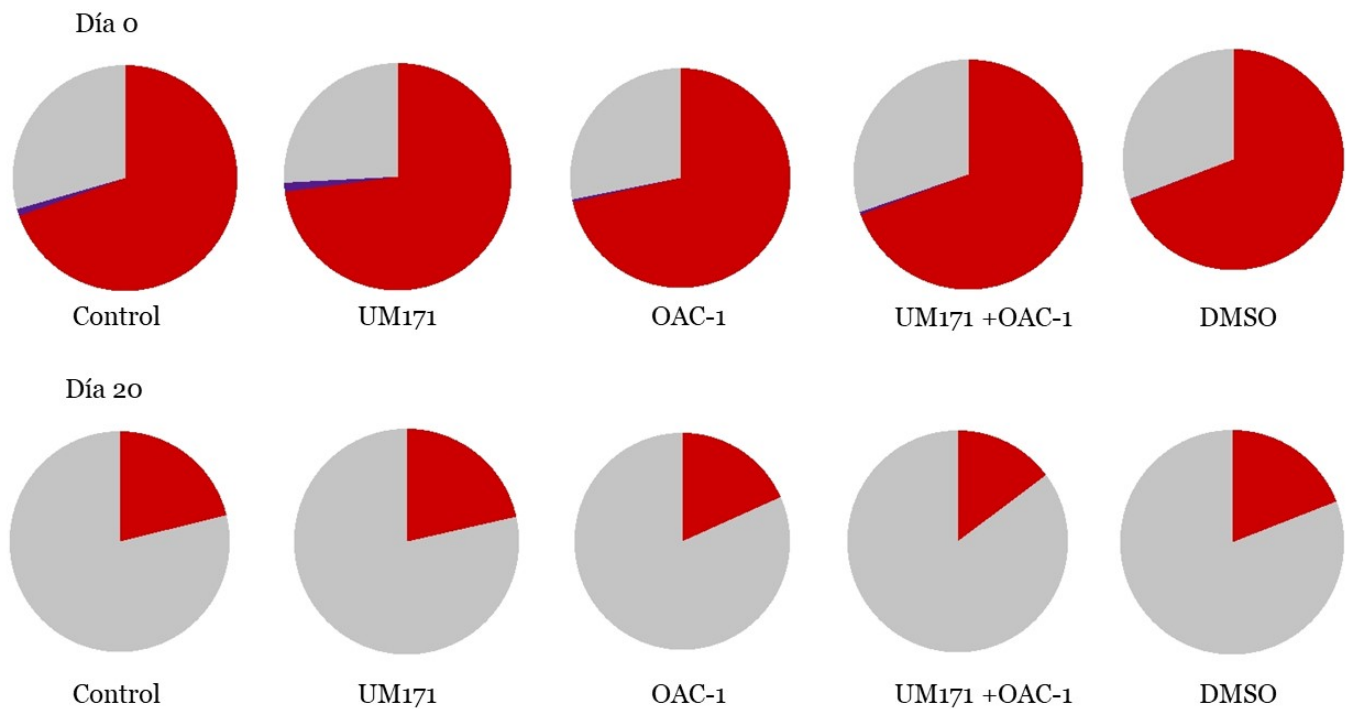


Figura 6.16: Proporciones relativas del tipo de progenitores que había en la población celular enriquecida Lin- después la inmunoselección (día cero) y proporción de progenitores al día 20 de cultivo. Los datos representan la media del porcentaje sobre el número total de colonias formadas en el día cero y 15 en cada uno de los tratamientos. El color gris corresponde a progenitores mieloides; el color rojo corresponde a progenitores eritroides y el color morado a progenitores mixtos.

células CD34- después ser obtenidas contenían un porcentaje alto de progenitores eritroides, sin embargo como se puede observar en la figura 6.20 conforme fue avanzando el cultivo, se fueron perdiendo estos progenitores.

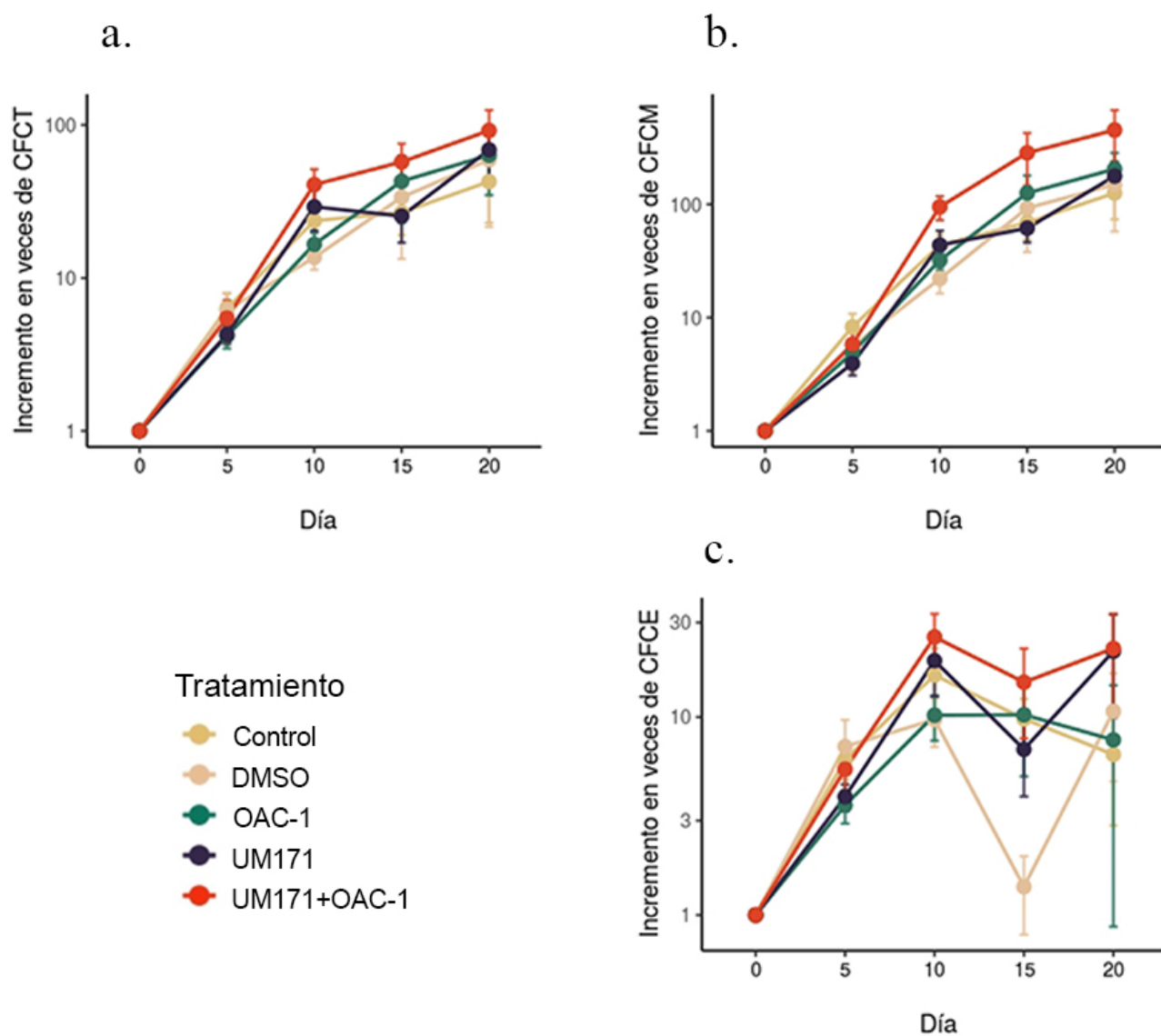


Figura 6.17: Cinética de expansión de las células purificadas CD34+. **a** Cinética de expansión de CFCT. **B** Cinética de expansión de CFCM. **c** Cinética de expansión de CFCE. Se evaluaron estadísticamente con un modelo lineal de efectos mixtos y se consideraron diferencias significativas a partir de una $p < 0.05$.

CFCT: Células formadoras de colonias totales; CFCM: Células formadoras de colonias mieloides; CFCE: Células formadoras de colonias eritroides.

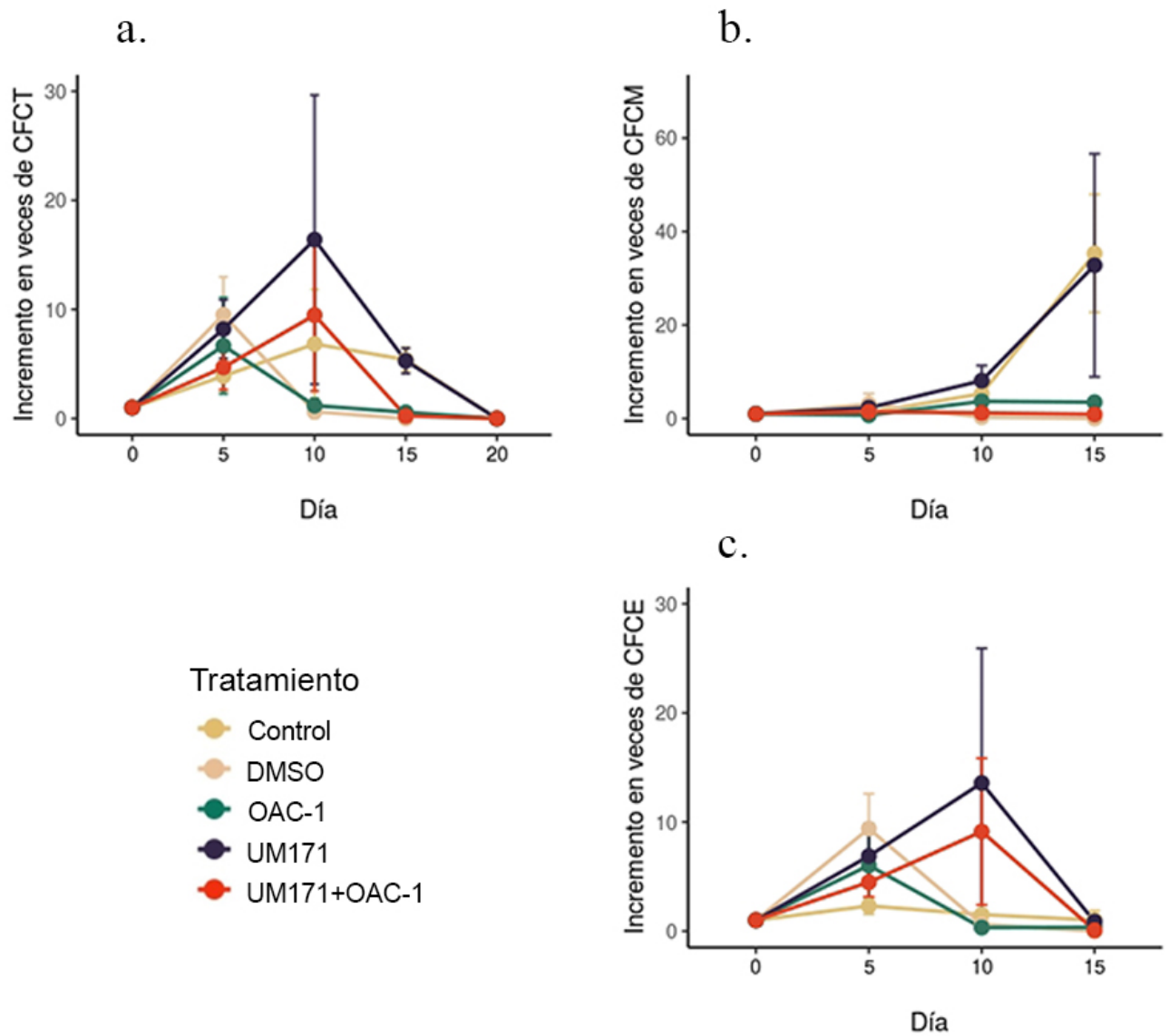


Figura 6.18: **a** Cinética de expansión de CFCT. **B** Cinética de expansión de CFCM. **c** Cinética de expansión de CFCE. Los datos representan el incremento en veces del número total de células formadoras de colonias comparadas contra el día cero. Se presenta la media y el error estándar de 7 - 2 experimentos independientes. Se evaluaron estadísticamente con un modelo lineal de efectos mixtos y se consideraron diferencias significativas a partir de una $p < 0.05$.

CFCT: Células formadoras de colonias totales; CFCM: Células formadoras de colonias mieloides; CFCE: Células formadoras de colonias eritroides.

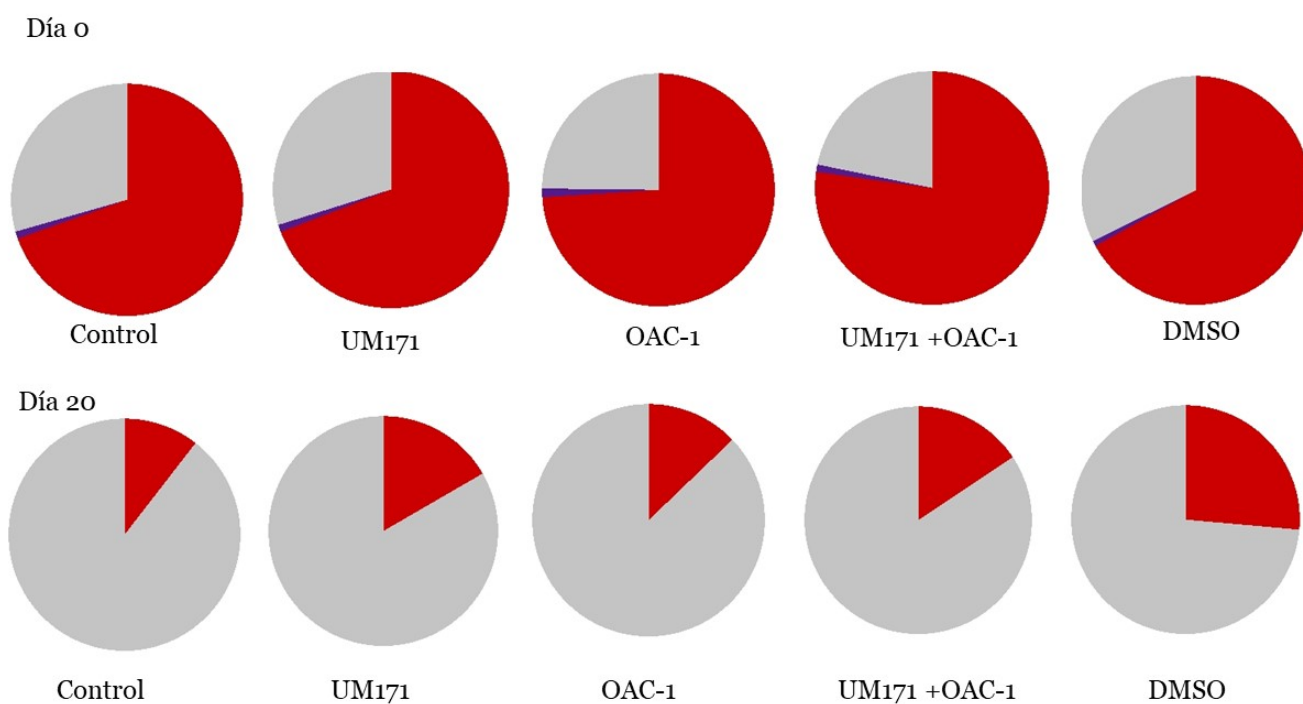


Figura 6.19: Proporciones relativas del tipo de progenitores que había en la población celular CD34+ después del *sort* (día cero) y proporción de progenitores al día 20 de cultivo. Los datos representan la media del porcentaje sobre el número total de colonias formadas en el día cero y 20 en cada uno de los tratamientos. El color gris corresponde a progenitores mieloides; el color rojo corresponde a progenitores eritroides y el color morado a progenitores mixtos.

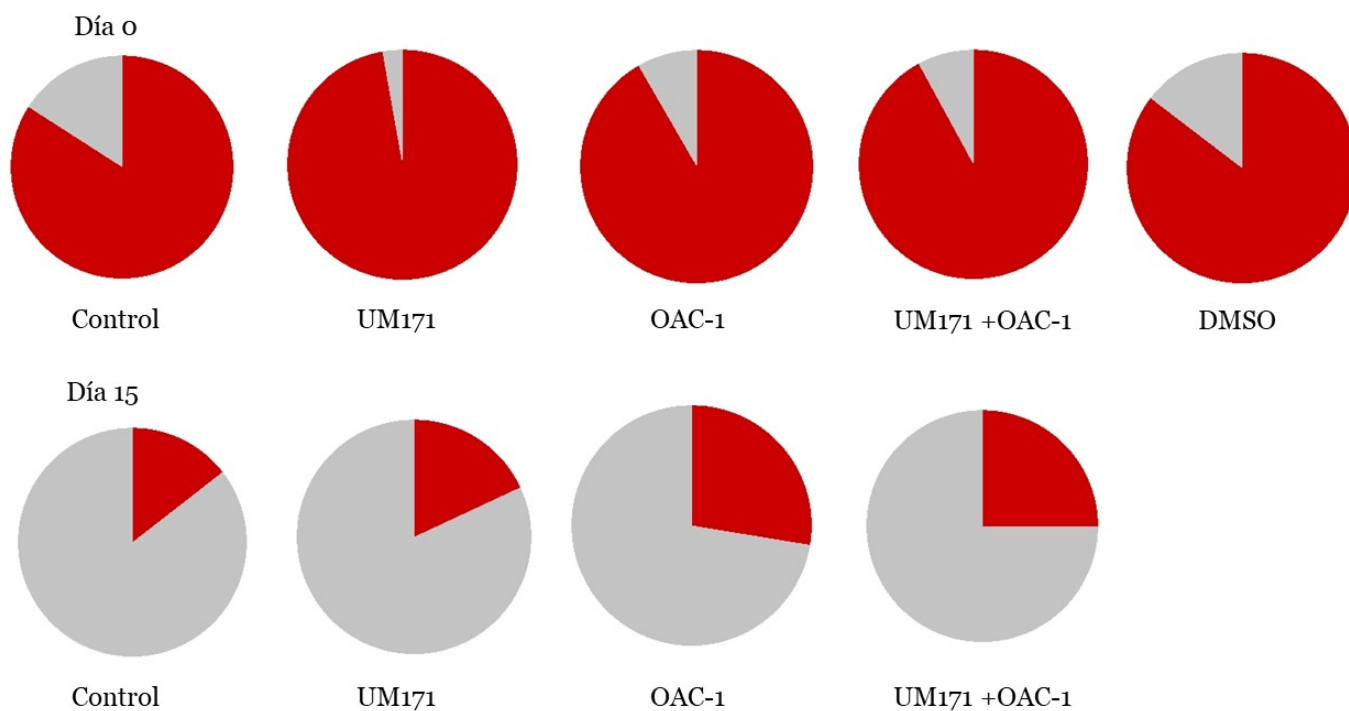


Figura 6.20: Proporciones relativas del tipo de progenitores que había en la población celular CD34- después del *sort* (día cero) y proporción de progenitores al día 15 de cultivo. Los datos representan la media del porcentaje sobre el número total de colonias formadas en el día cero y 15 en cada uno de los tratamientos. El color gris corresponde a progenitores mieloides; el color rojo corresponde a progenitores eritroides y el color morado a progenitores mixtos.

Capítulo 7

Discusión

Durante las últimas dos décadas, la producción *in vitro* de CTyPH humanas ha generado un gran interés debido a su potencial impacto en la clínica, por tal motivo se han desarrollado diferentes sistemas de expansión *in vitro* que se basan en el uso de citocinas recombinantes, con o sin diferentes tipos de moléculas pequeñas y en ausencia o presencia de células estromales. En la mayoría de estos estudios, las CTyPH son generadas en cultivos *in vitro* a partir de células hematopoyéticas frescas (de médula ósea, sangre periférica movilizada o de SCU), asimismo, se pueden utilizar distintas poblaciones celulares para realizar estos cultivos [15].

Para favorecer la autorrenovación *ex vivo* de CTPyH, se han desarrollado múltiples estrategias con citocinas y factores de crecimiento implicados en la regulación de la autorrenovación de las CTH que se han utilizado para promover la autorrenovación *ex vivo*, por ejemplo las citocinas de acción temprana como la trombopoyetina (TPO) y el factor de células troncales (SCF), las cuales pueden expandir CTyPH con injerto a corto plazo, pero para una expansión de CTyPH con injerto a largo plazo se necesita la acción sinérgica de agonistas de expansión de CTH [37]. En apoyo de esto, existen estudios en donde muestran resultados contundentes basados en la acción sinérgica de citocinas y agonistas de expansión de CTyPH, en donde informan mejoras significativas en el injerto y en la cantidad de células obtenidas gracias a que se han identificado múltiples moléculas pequeñas que imitan o promueven la autorrenovación [37].

A pesar de que no se han definido las condiciones óptimas de cultivo para su uso clínico, la mayoría de los protocolos de expansión se han enfocado en realizarse a partir de fracciones de células con una mayor expresión del marcador CD34+ [117].

Es importante resaltar que para un uso clínico satisfactorio las células expandidas *ex vivo* deben cumplir varios requisitos previos: para minimizar el riesgo de contaminación, se debe evitar la manipulación extensa durante el período de cultivo, deben estar libres de estroma para evitar cualquier arrastre de una capa alimentadora con HLA no coincidente y, debido al riesgo de transmisión de infecciones, no se debe utilizar suero fetal bovino.[118] Asimismo, los resultados deben ser reproducibles y las células expandidas deben tener una actividad funcional y una estabilidad genética adecuadas.[118]

Con el fin de contribuir a proponer una nueva estrategia de expansión para nuestro laboratorio, en este trabajo se estudió el efecto de dos moléculas pequeñas, UM171 y OAC-1 solas y en combinación con y sin citocinas en 4 poblaciones celulares distintas (CMN, células enriquecidas Lin- y células purificadas CD34+ y CD34-).

En cuanto a la proliferación, en aquellas condiciones sin citocinas en las 4 poblaciones celulares no hubo proliferación después del día 5, es decir, las moléculas pequeñas por sí solas no tienen un efecto en la proliferación y por consecuencia no se pueden realizar los ensayos funcionales correspondientes debido al bajo número celular, esto corrobora lo previamente reportado en un estudio, en donde se utilizaron moléculas pequeñas sin citocinas y en el cual se resalta la importancia de agregar citocinas en el medio para fines de expansión [119].

Además, en el estudio previamente mencionado se reporta que al no haber citocinas en el medio hubo muerte celular, por lo que fue imposible realizar resiembras, lo mismo sucedió en este trabajo, pues la ausencia de citocinas no promovió la proliferación en ninguna de las poblaciones evaluadas al día 5 y fue por esta razón que no se muestran en las gráficas de proliferación en el Capítulo 6, lo cual también corrobora lo antes reportado para la molécula UM171 [106].

Asimismo, TPO, SCF y Flt3-L se han confirmado durante mucho tiempo como la mezcla de citocinas centrales para el mantenimiento de CTyPH en cultivos *in vitro*, además de que al añadir IL-3 e IL-6 al cultivo, se puede aumentar el número celular.[120]

¿Qué ocurrió al agregar moléculas pequeñas y citocinas en el cultivo?

La fracción de células mononucleares se sembraron a una densidad de 100,000 células/ml al día 0, ya que dosis celulares más bajas no conducen a una proliferación celular fiable, lo cual ya había sido previamente observado en nuestro laboratorio y reportado

en otros estudios [118]. No obstante, después del día 5, solo la mitad del total de los cultivos de CMN proliferaron, siendo la condición control la que más incremento en veces presentó aunque el número absoluto de células nucleadas fue moderado. Los efectos de las moléculas pequeñas no fueron notorios a este nivel, en primera instancia porque los fármacos están dirigidos a células CD34+ y esta población celular es muy heterogénea pues existen células como linfocitos, monocitos, células estromales mesenquimales, etc. Por esta razón muchos protocolos de expansión no se realizan partiendo de CMN para así evitar efectos inespecíficos, debidos a moléculas liberadas por otras células [15].

Los cultivos que se empezaron con las células purificadas CD34- Lin- presentaron una proliferación moderada, sin embargo la mayoría de los cultivos no proliferaron hasta el día 20 e incluso algunas condiciones presentaron agotamiento celular desde el día 10, por lo que ya no se siguieron los cultivos. Existe un conocimiento limitado de las células CD34, sin embargo se ha reportado que tras el cultivo de células CD34, el antígeno CD34 aparece después de 48 horas en cultivo y además tanto células CD34 como las CD34 + modulan la expresión del antígeno CD34 poco después del inicio del cultivo. En ambos casos, la modulación de CD34 refleja el estado proliferativo de las células Lin en cultivo [121].

Asimismo, se han utilizado sistemas de cultivo *in vitro* para investigar las células CD34 humanas y su modulación del antígeno CD34. Estos experimentos y el análisis de estas células se ha visto obstaculizado debido al potencial de crecimiento limitado de células CD34 de SCU en cultivos sin estroma [121, 122, 123]

No obstante, algunos datos sugieren que la actividad formadora de colonias y la expresión del antígeno CD34 se presentan después de 7 a 10 días de cultivo de esta población celular [124]. Lo cual resulta interesante, pues desde el día cero, nuestros resultados indican que esta población sí presenta formación de colonias y alrededor de 80 % corresponden a colonias rojas, específicamente a BFU-E.

Aún se discute la naturaleza de las células hematopoyéticas CD34, pues algunos estudios se han centrado en su actividad de injerto, los cuales llevaron a algunos investigadores a concluir que las células CD34 son más primitivas que las CD34+, mientras que otros han sugerido que la expresión de CD34 refleja el estado de "activación" de estas células.[121]

Estudios *in vitro* e *in vivo* han llevado a la hipótesis de que las CTH existen en dos estados funcionales que pueden distinguirse por la expresión de CD34. Exponen que

las células CD34 representan un conjunto de CTH en reposo funcional que necesitan ser activadas para generar una población de células CD34 + con alto potencial de proliferación y de injerto. Asimismo describen que las células Lin⁻ CD34 parecen estar principalmente fuera de ciclo y tienen una capacidad mínima, de formación de colonias y de células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC) [125, 126].

Tomando en cuenta que la expresión de CD34 puede ser modulada, hay estudios en donde exploran la posibilidad de la generación de células CD34 + a partir de células CD34 *in vitro* [124]. Partiendo de ello, quizá valdría la pena explorar si a lo largo de los cultivos con nuestras condiciones, en algún momento se hizo presente este marcador.

En nuestro laboratorio no se habían caracterizado las cinéticas de proliferación y expansión de esta población celular, sin embargo, nuestros datos sugieren que a pesar de la adición de moléculas pequeñas, la población no es óptima para fines de expansión puesto que no se detectó actividad clonogénica significativa *in vitro*.

En los cultivos con células enriquecidas Lin⁻ y células purificadas CD34+, la adición de moléculas pequeñas sí fue notorio su efecto en términos del número total de células nucleadas a lo largo el cultivo, siendo la condición con UM171 la que presentó incrementos en veces mayores en comparación con las demás condiciones. No obstante, solo las células enriquecidas Lin⁻ presentaron diferencias significativas en comparación con el control, la condición con el vehículo (DMSO) y la condición con OAC-1.

Los estudios reportados por el grupo del Dr. Guy Sauvageau en donde se ha utilizado UM171 con células enriquecidas CD34+ han descrito que las células cultivadas con UM171 retienen el fenotipo CD34+ a lo largo del cultivo e incluso los análisis del fenotipo celular mostraron menos diferenciación y muerte celular para las células cultivadas con esta molécula pequeña en comparación con los controles, hecho que sugiere que este compuesto inhibe la diferenciación.[106, 107]

Lo anterior valida y soporta los datos observados en este trabajo, si bien hubo un decremento del marcador CD34 después del inicio del cultivo, al día 10 la expresión de CD34 en las condiciones con UM171 en el caso de las células enriquecidas Lin⁻, no presenta un decremento importante en los días evaluados en comparación con las demás condiciones.

No obstante, se ha descrito que algunos marcadores de superficie celulares utilizados para el aislamiento de CTH humanas a menudo ya no son confiables después del cultivo *ex vivo*, tal es el caso de CD38 [37].

Lo anterior ya se había observado en el 2005 en ratones, en donde describen que el inmunofenotipo de las CTyPH expandidas *ex vivo* es diferente al de las células recién aisladas, pero habían reportado que esta plasticidad no alteraba significativamente su capacidad de reconstitución de la hematopoyesis [127].

No obstante, el grupo del Dr. John Dick analizó este efecto en células procedentes de SCU humana, en donde sus resultados mostraron que el nivel de expresión de CD38 en cultivos *in vitro* de células CD34+ no es necesariamente predictivo de la función celular. Observaron además una gran expansión de células CD34+ CD38-, pero al hacer ensayos *in vivo*, no hubo aumento en números de células capaces de reconstituir la hematopoyesis, lo que indica una disociación entre el fenotipo CD34+ CD38- y su capacidad de reconstitución e injerto. En este trabajo demostraron que CD38 está fuertemente regulado a la baja durante el cultivo celular *ex vivo* y por lo tanto, la relación entre la función de las CTyPH y su inmunofenotipo puede no ser confiable en las células cultivadas.[128]

Al evaluar el número total de células con inmunofenotipo correspondiente a la población troncal (CD34+ CD38-) y a los progenitores(CD34+ CD38+) en la población enriquecida Lin-, la condición que presentó mayor cantidad de células fueron las condiciones con UM171, sin embargo esto no significa que sean funcionales, de igual manera se observó una expansión en ambas poblaciones.

Se sabe que cuando las células hematopoyéticas primitivas cultivados *in vitro*, experimentan una variedad de cambios fenotípicos y funcionales inducidos por las condiciones de cultivo, incluyendo una tendencia de las CTH a perder su troncalidad.[15]. Por lo tanto, aunque conserven un inmunofenotipo específico, después de la expansión *ex vivo* sus capacidades funcionales pueden alterarse y de ahí la importancia de realizar ensayos funcionales.

Dos publicaciones del grupo del Dr. Guy Sauvageau, sugieren que se evalúen marcadores funcionales después de la expansión *ex vivo* con UM171, estos marcadores son EPCR e ITGA3 [110, 111]. Se ha descrito que la expresión de ITGA3 se requiere funcionalmente para el injerto a largo plazo de células de SCU, además sus resultados indican que ITGA3 es un marcador confiable de CTH a largo plazo (LT-HSC) en cultivo, por lo que la jerarquía de CTyPH cultivadas con UM71 sería la siguiente:

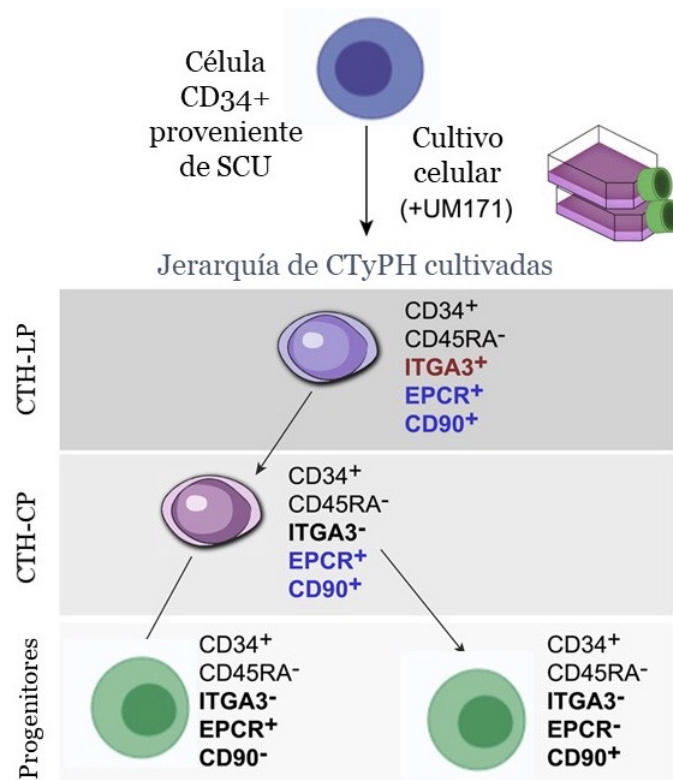


Figura 7.1: Jerarquía de células CTyPH cultivadas con UM171 con su respectivo inmunofenotipo. Modificado de [111]

Ese estudio, confirmó que, dentro de la población CD34 + CD45RA, solo las células que coexpresaban CD90 + y EPCR + pudieron mantener un fenotipo primitivo *in vitro* y proporcionar un injerto a corto (3 semanas) y a largo plazo (24 semanas) *in vivo* [111]. Como se muestra en la figura 7.1, el marcador CD38 ya no aparece como un receptor que permite identificar a las CTPyH en cultivos de expansión.

Asimismo, análisis transcriptómicos muestran que UM171 no regula negativamente la vía AHR, que está involucrada con la autorrenovación pero sí suprime los genes asociados con la diferenciación de eritroide y megacariocítica. Un estudio reportó que UM171 expande preferentemente un inmunofenotipo CD34+ CD45- que está enriquecido en progenitores mieloides (G-CFCs)[129].

Con base en los resultados de los estudios previamente mencionados se puede decir que UM171 favorece preferentemente la expansión de CTH de largo plazo, incluso algunos autores lo describen como el agonista más fuerte para la expansión de células CD34+, estos hallazgos al ser confirmados mediante ensayos *in vivo*, permitieron que se pudiera utilizar esta molécula en ensayos clínicos, en donde los hallazgos preliminares sugieren

que la expansión de las CTyPH de SCU con UM171 es factible, segura y permite el uso de unidades de SCU más pequeñas sin comprometer el injerto. La sangre de cordón expandida con UM171 podría tener el potencial de superar las desventajas de otros trasplantes de sangre de cordón mientras se mantienen los beneficios del bajo riesgo de EICH crónica y recaída [130].

Aunque los estudios del grupo del Dr. Broxmeyer en donde utilizan OAC-1, para la activación de Oct4 en células CD34+ de SCU mejoró la expansión *ex vivo* de CTyPH regulando la expresión de HOXB4, no existen aún estudios o ensayos clínicos de protocolos de expansión en donde se utilice esta molécula [58].

No obstante, OAC-1 se había probado con un conjunto de otras moléculas pequeñas (CHIR-99021, Forskolin y OAC-1; CFO como llamaron al grupo de estas moléculas) las cuales lograron un mantenimiento de células CD34+ *in vitro*. La eficiencia del sistema de cultivo se caracterizó mediante citometría de flujo para ver expresión del marcador CD34, ensayos de formación de colonias y xenotrasplantes. Se encontró que las células positivas para CD34 humanas tratadas con esta combinación tenían una expresión mejorada de marcadores de CTyPH y una capacidad de repoblación hematopoyética aumentada en ratones inmunodeficientes. Los análisis de sc-RNA-seq mostraron que la combinación CFO apoya el mantenimiento de las células humanas CD34+ mediante la activación de la vía de señalización HOXA9, GATA2 y AKT-cAMP. Además, concluyen que a través de la regulación positiva de HOXB4 mediada por OCT4, OAC-1 podría mejorar la expansión *ex vivo* de las CTPyH humanas.

Por otro lado UM171 se ha probado en combinación con SR1 (StemReginin) en donde se reportó que esta combinación obstaculizaba el potencial de proliferación y el mantenimiento de CTH de largo plazo pero se mantenía el marcador CD34+ [107].

Recientemente, un estudio en el participó el Dr. Broxmeyer se reportó que la combinación de Eupalinilide E con UM171 mejoran de forma aditiva/sinérgica la expansión de las CTH y concluyen que esta combinación podría mejorar la producción *ex vivo* de CTH de SCU para trasplante clínico de células hematopoyéticas [131].

Sin embargo, UM171 nunca se había probado en combinación con OAC-1 y a partir de los ensayos funcionales de formación de colonias y de células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC) y de las cinéticas de proliferación que se hicieron en este trabajo, se observó que para las células enriquecidas Lin- y purificadas CD34+, la presencia de UM171 ya sea sola o en combinación, favorece la proliferación y expansión de CPH.

Los efectos de UM171 sola en los cultivos de células enriquecidas Lin⁻ fueron más notorios, puede ser el caso que algunas células accesorias presentes en las células enriquecidas Lin⁻ podrían de manera directa (a través de la interacción célula-célula) o indirectamente (a través de la producción de citocinas) ser responsables de este efecto, en donde existe una tendencia que al agregar UM171 favorece la proliferación y la expansión, pues en ambos casos presentaron diferencias significativas.

No obstante para el caso de las LTC-IC, aunque no hubo diferencias significativas si existe una tendencia en presentar un mayor número de LTC-IC en las condiciones con UM171 para el caso de las células enriquecidas Lin⁻. Resultaría interesante analizar a nivel transcriptómico y epigenómico a las células generadas con este protocolo de expansión y poder analizar con mayor detalle si en realidad existe un efecto sinérgico de ambas moléculas en la generación de LTC-IC y porqué esto no se observó para las células purificadas CD34⁺, pues en teoría ambas moléculas contribuyen a la autorrenovación de las CTH y en esta población se vio favorecida la población de progenitores.

En resumen, se han identificado moléculas pequeñas que pueden colaborar con citocinas de acción temprana para promover la expansión de las CTyPH. Realizar investigación sobre su modo de acción podría mejorar considerablemente nuestra comprensión de las vías reguladoras que gobiernan la autorrenovación y la diferenciación de las CTyPH y su comportamiento en cultivos *in vitro*. Además, la caracterización del potencial de actividades aditivas y sinérgicas entre moléculas pequeñas merece ser investigado, ya que esto podría conducir al desarrollo de mejores plataformas de expansión.

Nuestro análisis provee una caracterización funcional al adicionar moléculas pequeñas en un protocolo de expansión con citocinas, y para tomar a consideración en los próximos protocolos de expansión.

Esto además podría tener implicaciones clínicas en el trasplante, pues generalmente se infunde una unidad no manipulada y otra expandida, siendo la primera unidad la que permanece por un periodo más largo de tiempo, las CTH provenientes de esta unidad son las que logran hacer injerto a largo plazo.

Sin embargo, estas moléculas pueden representar un enfoque complementario para mejorar y quizás acelerar el injerto. La optimización de estrategias de expansión de CTyPH es un cambio de paradigma en el trasplante de SCU en el que se pueden utilizar preferentemente unidades más pequeñas y mejor adaptadas.

Por ello, la capacidad de proliferación, el mantenimiento de la expresión del marcador CD34 y la generación de células en estadios avanzados podrían ser benéficos para acortar los tiempos de recuperación de los pacientes, por esta razón UM171 sola o en combinación en células enriquecidas Lin- podría ser una molécula que pueda ayudar a este objetivo.

Capítulo 8

Conclusiones y perspectivas

8.1. Conclusiones

- Para fines de expansión resulta más adecuado empezar con una población enriquecida Lin- o con células purificadas CD34+.
- La presencia de UM171 en cultivo favorece la proliferación y la expansión en células enriquecidas Lin- y células purificadas CD34+.
- Existen diferencias significativas en cuanto a expansión en las células enriquecidas Lin- tratadas con UM171 sola a comparación de los demás tratamientos.
- La molécula UM171 favorece la expansión de progenitores mieloides y eritroides en células enriquecidas Lin-, habiendo diferencias significativas en formación de colonias mieloides.
- A pesar de no existir diferencias significativas, la combinación de UM171 y OAC-1 en células purificadas CD34+ es posible tener un efecto sinérgico en la expansión de células progenitoras.
- Incluir a la molécula UM171 en nuestro sistema de cultivo resulta tener efectos positivos y podría representar una opción para que sea adicionada para futuros experimentos de expansión de CTyPH.
- La posibilidad de que las células CD34- presenten plasticidad en cuanto a la expresión del marcador CD34 necesita seguir siendo estudiada.

8.2. Perspectivas

Se presentó una caracterización funcional *in vitro* de 4 poblaciones celulares al añadir moléculas pequeñas en el cultivo. Sería interesante realizar estos cultivos pero sobre una capa alimentadora y verificar si esta nueva variable pueda beneficiar la proliferación o expansión.

Asimismo, sería conveniente evaluar la presencia de los marcadores sugeridos que clasifican funcionalmente a las células expandidas con UM171, y así tener una mayor certeza del tipo de células troncales que se están generando en cultivo.

Con el fin de entender el mecanismo que produce la presencia de ambas moléculas pequeñas y verificar si efectivamente producen un efecto sinérgico o es más bien UM171 la molécula que está actuando sobre las células, un análisis de transcriptoma podría darnos un panorama más amplio sobre qué vías y genes son las que se están activando. Sin embargo, como primer acercamiento, se podrían realizar reacciones de qPCR del gen POU5F1 y verificar si la molécula OAC-1 esta activando al factor de transcripción.

Bibliografía

- [1] Poletaev, A. Composition of the blood and reflection of the health state of human body. *Biomedical and Pharmacology Journal* **11**, 1797–1800 (2018).
- [2] Mezey, É. On the origin of blood cells–hematopoiesis revisited. *Oral diseases* **22**, 247–248 (2016). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26802784>. 26802784[pmid].
- [3] Wintrobe, M. M., Lee, G. R., Foerster, J. & Lukens, J. 35–36 (Philadelphia Lea amp; Febiger, 1981).
- [4] Ng, A. P. & Alexander, W. S. Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell Death Discovery* **3**, 17002 (2017). URL <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.2>.
- [5] Lin, J. I. Rudolf Virchow: Creator of cellular pathology. *Laboratory Medicine* **14**, 791–794 (1983). URL <https://doi.org/10.1093/labmed/14.12.791>.
- [6] Cooper, B. The origins of bone marrow as the seedbed of our blood: from antiquity to the time of osler. *Proceedings (Baylor University. Medical Center)* **24**, 115–118 (2011). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21566758>. 21566758[pmid].
- [7] Ehrlich, P. Address in pathology, on chemotherapy: Delivered before the seventeenth international congress of medicine. *British medical journal* **2**, 353–359 (1913). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20766753>. 20766753[pmid].
- [8] Maximov, A. Der lymphozyt als gemeinsame stammzelle der verschiedenen blutelemente in der embryonalen entwicklung und im postfetalen leben der säugetiere. *Folia Haematologica* 125–134 (1909).

- [9] Orkin, S. H. & Zon, L. I. Hematopoiesis: An evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* **132**, 631–644 (2008). URL <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.025>.
- [10] Flores, P. *Capítulo 7: Células troncales hematopoyéticas durante el desarrollo embrionario y fetal*, 181–208 (Universidad Nacional Autónoma de México, 2017).
- [11] Haeckel, E. Natürliche schöpfungsgeschichte von dr. ernst häckel, professor in jena. berlin bei georg reimer. 1868 s. 568. *Archiv der Pharmazie* **189**, 282–283 (1869). URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ardp.18691890346>. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ardp.18691890346>.
- [12] Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E. & Dick, J. Hematopoiesis: A human perspective. *Cell Stem Cell* **10**, 120–136 (2012). URL <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.006>.
- [13] Mayani, H. Biological differences between neonatal and adult human hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells and Development* **19**, 285–298 (2010). URL <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0327>. PMID: 19778207.
- [14] Orkin, S. H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nature Reviews Genetics* **1**, 57–64 (2000). URL <https://doi.org/10.1038/35049577>.
- [15] Mayani, H. Human hematopoietic stem cells: Concepts and perspectives on the biology and use of fresh versus in vitro-generated cells for therapeutic applications. *Current Stem Cell Reports* **5** (2019).
- [16] Kumar, S. & Geiger, H. Hsc niche biology and hsc expansion ex vivo. *Trends in molecular medicine* **23**, 799–819 (2017). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28801069>. 28801069[pmid].
- [17] Till, J. E. & McCulloch, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells1. *Radiation Research* **178**, AV3–AV7 (2012). URL <https://doi.org/10.1667/RRAV01.1>.
- [18] Pietras, E. M., Warr, M. R. & Passegué, E. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *The Journal of cell biology* **195**, 709–720 (2011). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22123859>. PMC3257565[pmcid].

- [19] Orford, K. W. & Scadden, D. T. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nature Reviews Genetics* **9**, 115–128 (2008). URL <https://doi.org/10.1038/nrg2269>.
- [20] Wang, J. C. & Dick, J. E. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends in Cell Biology* **15**, 494–501 (2005). URL <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.07.004>.
- [21] Li, J. Quiescence regulators for hematopoietic stem cell. *Experimental Hematology* **39**, 511–520 (2011). URL <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2011.01.008>.
- [22] Mayani, H. The regulation of hematopoietic stem cell populations. *F1000Research* **5**, F1000 Faculty Rev–1524 (2016). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27408695>. 27408695[pmid].
- [23] Zhang, Y., Gao, S., Xia, J. & Liu, F. Hematopoietic hierarchy & an updated roadmap. *Trends in Cell Biology* **28**, 976–986 (2018). URL <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.06.001>.
- [24] Wognum, A. W., Eaves, A. C. & Thomas, T. E. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Archives of Medical Research* **34**, 461 – 475 (2003). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0188440903001292>. Hematopoietic Stem Cells.
- [25] Kang, Y., Chao, N. J. & Aversa, F. Unmanipulated or cd34 selected haplotype mismatched transplants. *Current Opinion in Hematology* **15** (2008). URL https://journals.lww.com/co-hematology/Fulltext/2008/11000/Unmanipulated_or_CD34_selected_haplotype.4.aspx.
- [26] Civin, C. I. *et al.* Antigenic analysis of hematopoiesis. iii. a hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against kg-1a cells. *The Journal of Immunology* **133**, 157 (1984). URL <http://www.jimmunol.org/content/133/1/157.abstract>.
- [27] Tedder, T. F., Steeber, D. A., Chen, A. & Engel, P. The selectins: vascular adhesion molecules. *Federation of American Societies for Experimental Biology* **9**, 866–873 (1995). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7542213/>.
- [28] AbuSamra, D. B. *et al.* Not just a marker: CD34 on human hematopoietic stem/progenitor cells dominates vascular selectin binding along

- with CD44. *Blood Advances* **1**, 2799–2816 (2017). URL <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017004317>. <https://ashpublications.org/bloodadvances/article-pdf/1/27/2799/879408/advances004317.pdf>.
- [29] Naeim, F., Nagesh Rao, P., Song, S. X. & Phan, R. T. Chapter 2 - principles of immunophenotyping. In Naeim, F., Nagesh Rao, P., Song, S. X. & Phan, R. T. (eds.) *Atlas of Hematopathology (Second Edition)*, 29 – 56 (Academic Press, 2018), second edition edn.
- [30] Dao, M. A., Arevalo, J. & Nolta, J. A. Reversibility of CD34 expression on human hematopoietic stem cells that retain the capacity for secondary reconstitution. *Blood* **101**, 112–118 (2003). URL <https://doi.org/10.1182/blood-2002-01-0025>. <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/101/1/112/1686793/h80103000112.pdf>.
- [31] Anjos-Afonso, F. *et al.* Cd34⁺ cells at the apex of the human hematopoietic stem cell hierarchy have distinctive cellular and molecular signatures. *Cell Stem Cell* **13**, 161–174 (2013). URL <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.05.025>.
- [32] Laurenti, E. & Göttgens, B. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature* **553**, 418–426 (2018). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29364285>. Nature25022[PII].
- [33] Haas, S., Trumpp, A. & Milsom, M. D. Causes and consequences of hematopoietic stem cell heterogeneity. *Cell Stem Cell* **22**, 627–638 (2018). URL <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.003>.
- [34] Mayani, H. A glance into somatic stem cell biology: Basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Archives of Medical Research* **34**, 3 – 15 (2003). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0188440902004502>.
- [35] Boulais, P. E. & Frenette, P. S. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood* **125**, 2621–2629 (2015). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25762174>. Blood-2014-09-570192[PII].
- [36] Flores-Guzmán, P., Gutiérrez-Rodríguez, M. & Mayani, H. In vitro proliferation, expansion, and differentiation of a cd34⁺ cell-enriched hematopoietic cell population from human umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. *Archives of medical research* **33**, 107–114 (2002).

- [37] Wilkinson, A. C., Igarashi, K. J. & Nakauchi, H. Haematopoietic stem cell self-renewal in vivo and ex vivo. *Nature Reviews Genetics* (2020). URL <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0241-0>.
- [38] Gratama, J. W., Sutherland, D. & Keeney, M. Flow cytometric enumeration and immunophenotyping of hematopoietic stem and progenitor cells. *Seminars in Hematology* **38**, 139 – 147 (2001). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0037196301900472>.
- [39] Ito, M. *et al.* NOD/SCID/cnull mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* **100**, 3175–3182 (2002). URL <https://doi.org/10.1182/blood-2001-12-0207>. <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/100/9/3175/1258864/h82102003175.pdf>.
- [40] Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. & van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols* **1**, 2315–2319 (2006). URL <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.
- [41] Eaves, C. J. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood* **125**, 2605–2613 (2015). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25762175>. Blood-2014-12-570200[PII].
- [42] Hao, Q., Thiemann, F., Petersen, D., Smogorzewska, E. M. & Crooks, G. Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population. *Blood* **88**, 3306–13 (1996).
- [43] C.L., M. & C.J., E. Long-term culture-initiating cell assays for human and murine cells. *Hematopoietic Stem Cell Protocols. Methods in Molecular Medicine* **63**, 123–141 (2002).
- [44] Baron, F., Storb, R. & Little, M.-T. Hematopoietic cell transplantation: five decades of progress. *Archives of Medical Research* **34**, 528–544 (2003). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0188440903001310>.
- [45] Gyurkocza, B., Rezvani, A. & Storb, R. F. Allogeneic hematopoietic cell transplantation: the state of the art. *Expert review of hematology* **3**, 285–299 (2010). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20871781>. PMC2943393[pmcid].
- [46] Panch, S. R., Szymanski, J., Savani, B. N. & Stroncek, D. F. Sources of hematopoietic stem and progenitor cells and methods to optimize yields for clinical cell

- therapy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* **23**, 1241–1249 (2017). URL <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.05.003>.
- [47] Pulsipher, M. A. *et al.* Lower risk for serious adverse events and no increased risk for cancer after pbsc vs bm donation. *Blood* **123**, 3655–3663 (2014). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24735965>. Blood-2013-12-542464[PII].
- [48] Donahue, R. E. *et al.* Plerixafor (amd3100) and granulocyte colony-stimulating factor (g-csf) mobilize different CD34+ cell populations based on global gene and microrna expression signatures. *Blood* **114**, 2530–2541 (2009). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19602709>. PMC2746476[pmcid].
- [49] Howard, C. A. *et al.* Recommendations for donor human leukocyte antigen assessment and matching for allogeneic stem cell transplantation: Consensus opinion of the blood and marrow transplant clinical trials network (bmt cttn). *Biology of Blood and Marrow Transplantation* **21**, 4–7 (2015). URL <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.09.017>.
- [50] Broxmeyer, H. E. *et al.* Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 3828–3832 (1989). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2566997>. 2566997[pmid].
- [51] Gluckman, E. *et al.* Hematopoietic reconstitution in a patient with fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an hla-identical sibling. *New England Journal of Medicine* **321**, 1174–1178 (1989). URL <https://doi.org/10.1056/NEJM198910263211707>. PMID: 2571931.
- [52] Mayani, H., Wagner, J. E. & Broxmeyer, H. E. Cord blood research, banking, and transplantation: achievements, challenges, and perspectives. *Bone Marrow Transplantation* **55**, 48–61 (2020). URL <https://doi.org/10.1038/s41409-019-0546-9>.
- [53] Archivo IMSS. Banco de células del imss, entre los primeros cinco mejores del mundo. <http://www.imss.gob.mx/prensa/archivo/201710/321> (2017).
- [54] Mayani, H. Umbilical cord blood: Lessons learned and lingering challenges after more than 20 years of basic and clinical research. *Archives of Medical Research* **42**, 645 – 651 (2011). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0188440911002578>.

- [55] Flores-Guzmán, P., Flores-Figueroa, E., Martínez-Jaramillo, G. & Mayani, H. In vitro characterization of two lineage-negative cd34 cell-enriched hematopoietic cell populations from human uc blood. *Cytotherapy* **7**, 334–344 (2005). URL <https://doi.org/10.1080/14653240500238228>.
- [56] Martínez-Jaramillo, G. *et al.* In vitro proliferation and expansion of hematopoietic progenitors present in mobilized peripheral blood from normal subjects and cancer patients. *Stem Cells and Development* **13**, 382–389 (2004). URL <https://doi.org/10.1089/scd.2004.13.382>. PMID: 15345132, <https://doi.org/10.1089/scd.2004.13.382>.
- [57] Alvarado-Moreno, A., Chávez-González, A., Cébulo, A., Arriaga, L. & Mayani, H. Cell cycle differences in vitro between primitive hematopoietic cell populations from adult and umbilical cord blood. *Stem Cells and Development* **16**, 223–230 (2007). URL <https://doi.org/10.1089/scd.2006.9996>. PMID: 17521234, <https://doi.org/10.1089/scd.2006.9996>.
- [58] Broxmeyer, H. E. *et al.* Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 4109–4113 (1992). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1373894>. PMC525642[pmcid].
- [59] Mayani, H. *et al.* Kinetics of hematopoiesis in dexter-type long-term cultures established from human umbilical cord blood cells. *STEM CELLS* **16**, 127–135 (1998). URL <https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/stem.160127>. <https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/stem.160127>.
- [60] Pettengell, R. *et al.* Direct comparison by limiting dilution analysis of long-term culture-initiating cells in human bone marrow, umbilical cord blood, and blood stem cells. *Blood* **84**, 3653–9 (1995).
- [61] Traycoff, C. *et al.* Human umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells: are they the same as their adult bone marrow counterparts? *Blood cells* **20**, 382–90; discussion 390–1 (1994). URL <http://europepmc.org/abstract/MED/7538343>.
- [62] Ng, Y. Y. *et al.* Gene-expression profiling of cd34+ cells from various hematopoietic stem-cell sources reveals functional differences in stem-cell ac-

- tivity. *Journal of Leukocyte Biology* **75**, 314–323 (2004). URL <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1189/jlb.0603287>. <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1189/jlb.0603287>.
- [63] Weekx, S. *et al.* Cd34++ cd38- and cd34+ cd38+ human hematopoietic progenitors from fetal liver, cord blood, and adult bone marrow respond differently to hematopoietic cytokines depending on the ontogenic source. *Experimental hematology* **26**, 1034–1042 (1998). URL <http://europepmc.org/abstract/MED/9766443>.
- [64] Zandstra, Conneally, Piret & Eaves. Ontogeny-associated changes in the cytokine responses of primitive human haemopoietic cells. *British Journal of Haematology* **101**, 770–778 (1998). URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2141.1998.00777.x>. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-2141.1998.00777.x>.
- [65] Schibler, K. *et al.* Possible mechanisms accounting for the growth factor independence of hematopoietic progenitors from umbilical cord blood. *Blood* **84**, 3679–3684 (1994). URL <http://europepmc.org/abstract/MED/7524747>.
- [66] Ballen, K. K. New trends in umbilical cord blood transplantation. *Blood* **105**, 3786–3792 (2005). URL <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-4125>. <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/105/10/3786/1708702/zh801005003786.pdf>.
- [67] Lund, T. C., Boitano, A. E., Delaney, C. S., Shpall, E. J. & Wagner, J. E. Advances in umbilical cord blood manipulation-from niche to bedside. *Nature reviews. Clinical oncology* **12**, 163–174 (2015). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25511187>. PMC4430198[pmcid].
- [68] Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147 (1998). URL <https://science.sciencemag.org/content/282/5391/1145>. <https://science.sciencemag.org/content/282/5391/1145.full.pdf>.
- [69] Blaser, B. W. & Zon, L. I. Making hscs in vitro: don't forget the hemogenic endothelium. *Blood* **132**, 1372–1378 (2018). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30089629>. 30089629[pmid].
- [70] Lim, W. F., Inoue-Yokoo, T., Tan, K. S., Lai, M. I. & Sugiyama, D. Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells.

- Stem cell research & therapy* **4**, 71–71 (2013). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23796405>. 23796405[pmid].
- [71] Flores-Guzmán, P., Fernández-Sánchez, V. & Mayani, H. Concise review: Ex vivo expansion of cord blood-derived hematopoietic stem and progenitor cells: Basic principles, experimental approaches, and impact in regenerative medicine. *STEM CELLS Translational Medicine* **2**, 830–838 (2013). URL <https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.5966/sctm.2013-0071>.
- [72] Douay, L. Experimental culture conditions are critical for ex vivo expansion of hematopoietic cells. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* **10**, 341–346 (2001). URL <https://doi.org/10.1089/152581601750288948>. PMID: 11454309.
- [73] Flores-Guzman, P. *et al.* Comparative in vitro analysis of different hematopoietic cell populations from human cord blood: in search of the best option for clinically oriented ex vivo cell expansion. *Transfusion* **53**, 668–678 (2013). URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1537-2995.2012.03799.x>.
- [74] Metcalf, D. Hematopoietic cytokines. *Blood* **111**, 485–491 (2008). <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/111/2/485/1220613/zh800208000485.pdf>.
- [75] Mayani, H. & Lansdorp, P. M. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *STEM CELLS* **16**, 153–165 (1998). URL <https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/stem.160153>.
- [76] Mayani, H., Dragowska, W. & Lansdorp, P. Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells. *Blood* **81**, 3252–3258 (1993). URL <https://doi.org/10.1182/blood.V81.12.3252.3252>. <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/81/12/3252/610656/3252.pdf>.
- [77] De Wynter, E. A., Nadali, G., Coutinho, L. H. & Testa, N. G. Extensive amplification of single cells from cd34+ subpopulations in umbilical cord blood and identification of long-term culture-initiating cells present in two sub-

- sets. *STEM CELLS* **14**, 566–576 (1996). URL <https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/stem.140566>.
- [78] Piacibello, W. *et al.* Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood* **89**, 2644–53 (1997).
- [79] Tanavde, V. M. *et al.* Human stem-progenitor cells from neonatal cord blood have greater hematopoietic expansion capacity than those from mobilized adult blood. *Experimental Hematology* **30**, 816–823 (2002). URL [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(02\)00818-4](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00818-4).
- [80] Ogawa, M. Hemopoietic stem cells: stochastic differentiation and humoral control of proliferation. *Environmental health perspectives* **80**, 199–207 (1989). URL <https://doi.org/10.1289/ehp.8980199>. PMC1567604[pmcid].
- [81] Hai-Jiang, W., Xin-Na, D. & Hui-Jun, D. Expansion of hematopoietic stem/progenitor cells. *American Journal of Hematology* **83**, 922–926 (2008). URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ajh.21262>. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ajh.21262>.
- [82] Flores-Guzmán, P. *et al.* Individual and combined effects of mesenchymal stromal cells and recombinant stimulatory cytokines on the in vitro growth of primitive hematopoietic cells from human umbilical cord blood. *Cytotherapy* **11**, 886–896 (2009). URL <https://doi.org/10.3109/14653240903180076>.
- [83] Madlambayan, G. J. *et al.* Dynamic changes in cellular and microenvironmental composition can be controlled to elicit in vitro human hematopoietic stem cell expansion. *Experimental Hematology* **33**, 1229–1239 (2005). URL <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.05.018>.
- [84] Flores-Guzmán, P., Martínez-Jaramillo, G., Montesinos, J. J., Valencia, I. & Mayani, H. Growth kinetics of progenitor cell-enriched hematopoietic cell populations in long-term liquid cultures under continuous removal of mature cells. *Cytotherapy* **8**, 299–307 (2006). URL <https://doi.org/10.1080/14653240600735776>.
- [85] Duncan, A. W. *et al.* Integration of notch and wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nature Immunology* **6**, 314–322 (2005). URL <https://doi.org/10.1038/ni1164>.

- [86] Ohishi, K., Katayama, N., Shiku, H., Varnum-Finney, B. & Bernstein, I. Notch signalling in hematopoiesis. *Seminars in Cell Developmental Biology* **14**, 143 – 150 (2003). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952102001830>. Notch Signalling in the Immune System.
- [87] Dircio-Maldonado, R. *et al.* Functional integrity and gene expression profiles of human cord blood-derived hematopoietic stem and progenitor cells generated in vitro. *Stem cells translational medicine* **7**, 602–614 (2018). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29701016>. PMC6090508[pmcid].
- [88] Kim, Y., Jeong, J. & Choi, D. Small-molecule-mediated reprogramming: a silver lining for regenerative medicine. *Experimental & Molecular Medicine* **52**, 213–226 (2020). URL <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0383-3>.
- [89] Yip, K. W. & Liu, F.-F. *Small Molecule Screens*, 3451–3455 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011). URL https://doi.org/10.1007/978-3-642-16483-5_5376.
- [90] Flaumenhaft, R. 3.07 - chemical biology. In Taylor, J. B. & Triggle, D. J. (eds.) *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 129 – 149 (Elsevier, Oxford, 2007). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B008045044X000808>.
- [91] Schugar, R. C., Robbins, P. D. & Deasy, B. M. Small molecules in stem cell self-renewal and differentiation. *Gene Therapy* **15**, 126–135 (2008). URL <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3303062>.
- [92] Zhang, M. *et al.* Pharmacological reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by signaling-directed transcriptional activation. *Cell stem cell* **18**, 653–667 (2016). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27133794>. PMC4864020[pmcid].
- [93] Zhang, L. *et al.* Small molecules efficiently reprogram human astroglial cells into functional neurons. *Cell stem cell* **17**, 735–747 (2015). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26481520>. PMC4675726[pmcid].
- [94] Hu, W. *et al.* Direct conversion of normal and alzheimer’s disease human fibroblasts into neuronal cells by small molecules. *Cell Stem Cell* **17**, 204–212 (2015). URL <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.006>.

- [95] Cheng, L. *et al.* Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell research* **24**, 665–679 (2014). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24638034>. PMC4042166[pmcid].
- [96] Wang, H. *et al.* Small molecules enable cardiac reprogramming of mouse fibroblasts with a single factor, oct4. *Cell reports* **6**, 951–960 (2014). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24561253>. 24561253[pmid].
- [97] Fu, Y. *et al.* Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails. *Cell research* **25**, 1013–1024 (2015). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26292833>. PMC4559819[pmcid].
- [98] Cao, N. *et al.* Conversion of human fibroblasts into functional cardiomyocytes by small molecules. *Science* **352**, 1216–1220 (2016). URL <https://science.sciencemag.org/content/352/6290/1216>. <https://science.sciencemag.org/content/352/6290/1216.full.pdf>.
- [99] Katsuda, T. *et al.* Conversion of terminally committed hepatocytes to culturable bipotent progenitor cells with regenerative capacity. *Cell Stem Cell* **20**, 41–55 (2017). URL <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.10.007>.
- [100] Fu, G.-B. *et al.* Expansion and differentiation of human hepatocyte-derived liver progenitor-like cells and their use for the study of hepatotropic pathogens. *Cell Research* **29**, 8–22 (2019). URL <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0103-x>.
- [101] Kim, Y. *et al.* Small molecule-mediated reprogramming of human hepatocytes into bipotent progenitor cells. *Journal of Hepatology* **70**, 97–107 (2019). URL <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.007>.
- [102] Zhang, K. *et al.* *in vitro* expansion of primary human hepatocytes with efficient liver repopulation capacity. *Cell Stem Cell* **23**, 806–819.e4 (2018). URL <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.10.018>.
- [103] Shan, J. *et al.* Identification of small molecules for human hepatocyte expansion and *in situ* differentiation. *Nature chemical biology* **9**, 514–520 (2013). URL <https://doi.org/10.1038/nchembio.1270>. Nchembio.1270[PII].
- [104] Hou, P. *et al.* Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* **341**, 651–654 (2013). URL <https://science>.

- sciencemag.org/content/341/6146/651. <https://science.sciencemag.org/content/341/6146/651.full.pdf>.
- [105] Ye, J. *et al.* Pluripotent stem cells induced from mouse neural stem cells and small intestinal epithelial cells by small molecule compounds. *Cell research* **26**, 34–45 (2016). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26704449>. 26704449[pmid].
- [106] Fares, I. *et al.* UM171 Is a Novel and Potent Agonist Of Human Hematopoietic Stem Cell Renewal. *Blood* **122**, 798–798 (2013). URL <https://doi.org/10.1182/blood.V122.21.798.798>.
- [107] Fares, I. *et al.* Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. *Science (New York, N.Y.)* **345**, 1509–1512 (2014). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25237102>. PMC4372335[pmcid].
- [108] URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indole#:~:text=Indoleisanaromaticheterocyclic,oftheaminoacidtryptophan>.
- [109] Chagraoui, J. *et al.* Um171 induces a homeostatic inflammatory-detoxification response supporting human hsc self-renewal. *PLOS ONE* **14**, 1–17 (2019). URL <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224900>.
- [110] Fares, I. *et al.* EPCR expression marks UM171-expanded CD34+ cord blood stem cells. *Blood* **129**, 3344–3351 (2017). URL <https://doi.org/10.1182/blood-2016-11-750729>. <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/129/25/3344/1364497/blood750729.pdf>.
- [111] Tomellini, E. *et al.* Integrin-3 is a functional marker of ex vivo expanded human long-term hematopoietic stem cells. *Cell Reports* **28**, 1063 – 1073.e5 (2019). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124719308642>.
- [112] Li, W. *et al.* Identification of oct4-activating compounds that enhance reprogramming efficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 20853–20858 (2012). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23213213>. PMC3529047[pmcid].
- [113] Szabo, E. *et al.* Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature* **468**, 521–526 (2010). URL <https://doi.org/10.1038/nature09591>.

- [114] Sauvageau, G. *et al.* Overexpression of *hoxb4* in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Development* **9**, 1753–1765 (1995). URL <http://genesdev.cshlp.org/content/9/14/1753.abstract>. <http://genesdev.cshlp.org/content/9/14/1753.full.pdf+html>.
- [115] Muñoz-Rivera-Cambas, A., Flores-Guzmán, P. & Mayani, H. The in vitro growth of a cord blood-derived cell population enriched for cd34+ cells is influenced by its cell cycle status and treatment with hydroxyurea. *Cytotherapy* **20** (2018).
- [116] Mondragón-García, I., Flores-Guzmán, P. & Mayani, H. Human cord blood hematopoietic cells acquire neural features when cultured in the presence of neurogenic cytokines. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **85**, 102485 (2020). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S107997962030406X>.
- [117] Briddell, R., Kern, B., Zilm, K., Stoney, G. & McNiece, I. Purification of cd34+ cells is essential for optimal ex vivo expansion of umbilical cord blood cells. *Journal of hematotherapy* **6**, 145–150 (1997). URL <https://doi.org/10.1089/scd.1.1997.6.145>.
- [118] Fietz, T. *et al.* Culturing human umbilical cord blood: a comparison of mononuclear vs cd34+ selected cells. *Bone Marrow Transplantation* **23**, 1109–1115 (1999). URL <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1701776>.
- [119] Wang, L. *et al.* A small-molecule/cytokine combination enhances hematopoietic stem cell proliferation via inhibition of cell differentiation. *Stem cell research & therapy* **8**, 169–169 (2017). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28720126>. 28720126[pmid].
- [120] Gilmore, G. L., DePasquale, D. K., Lister, J. & Shadduck, R. K. Ex vivo expansion of human umbilical cord blood and peripheral blood cd34⁺ hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology* **28**, 1297–1305 (2000). URL [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(00\)00531-2](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(00)00531-2).
- [121] Dooley, D. C., Oppenlander, B. K. & Xiao, M. Analysis of primitive cd34 and cd34+ hematopoietic cells from adults: Gain and loss of cd34 antigen by undifferentiated cells are closely linked to proliferative status in culture.

- STEM CELLS* **22**, 556–569 (2004). URL <https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1634/stemcells.22-4-556>.
<https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1634/stemcells.22-4-556>.
- [122] Bhatia, M., Bonnet, D., Murdoch, B., Gan, O. I. & Dick, J. E. A newly discovered class of human hematopoietic cells with scid-repopulating activity. *Nature Medicine* **4**, 1038–1045 (1998). URL <https://doi.org/10.1038/2023>.
- [123] Ando, K. Human cd34 hematopoietic stem cells: Basic features and clinical relevance. *International Journal of Hematology* **75**, 370–375 (2002). URL <https://doi.org/10.1007/BF02982126>.
- [124] Ando, K. *et al.* Extensive generation of human cord blood cd34+ stem cells from lin- cd34- cells in a long-term in vitro system. *Experimental Hematology* **28**, 690–699 (2000). URL [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(00\)00154-5](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(00)00154-5).
- [125] Manfredini, R. *et al.* The kinetic status of hematopoietic stem cell subpopulations underlies a differential expression of genes involved in self-renewal, commitment, and engraftment. *STEM CELLS* **23**, 496–506 (2005). URL <https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1634/stemcells.2004-0265>. <https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1634/stemcells.2004-0265>.
- [126] Engelhardt, M., Lübbert, M. & Guo, Y. Cd34+ or cd34: which is the more primitive? *Leukemia* **16**, 1603–1608 (2002). URL <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402620>.
- [127] Zhang, C. C. & Lodish, H. F. Murine hematopoietic stem cells change their surface phenotype during ex vivo expansion. *Blood* **105**, 4314–4320 (2005). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15701724>. 15701724[pmid].
- [128] Dorrell, C., Gan, O. I., Pereira, D. S., Hawley, R. G. & Dick, J. E. Expansion of human cord blood CD34+CD38cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function. *Blood* **95**, 102–110 (2000). URL <https://doi.org/10.1182/blood.V95.1.102>. <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/95/1/102/1660135/102.pdf>.

- [129] Mesquitta, W.-T. *et al.* Um171 expands distinct types of myeloid and nk progenitors from human pluripotent stem cells. *Scientific Reports* **9**, 6622 (2019). URL <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43054-4>.
- [130] Cohen, S. *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation using single um171-expanded cord blood: a single-arm, phase 1-2 safety and feasibility study. *The Lancet Haematology* **7**, e134–e145 (2020). URL [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(19\)30202-9](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(19)30202-9).
- [131] Zhang, J. *et al.* Effects of eupalinilide e and um171, alone and in combination on cytokine stimulated ex-vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **84**, 102457 (2020). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079979620302473>.