



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ESTUDIO COMPARATIVO DE FACTORES MOLECULARES EN LA DIFERENCIACIÓN IN VITRO DE CÉLULAS PLURIPOTENTES HUMANAS HACIA HEMATOPOYESIS TEMPRANA EN CONDICIONES 2D Y 3D

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA
GERMAN ATZIN MORA ROLDAN

DIRECTOR DE TESIS DR. KARLEN GAZARIAN, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR
DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO, CENTRO DE INVESTIGACION MÉDICA DE ORIENTE, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, DELEGACION PUEBLA
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD DE MEXICO, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A los que estuvieron y ya no están,

A los que siguen aquí...

Gracias

Dedicatoria

Para Aurora

Índice de contenidos

1. Abreviaturas	6
2. Resumen.....	7
3. Introducción.....	8
3.1 La hematopoyesis durante el desarrollo	8
3.2 Hematopoyesis primitiva.....	9
3.2.1 El componente endotelial en la hematopoyesis primitiva	11
3.3 La hematopoyesis definitiva	11
3.4 Generación de células troncales hematopoyéticas partir de células troncales pluripotentes embrionarias e inducidas (hPSCs).....	12
3.4.1 Cultivos en monocapa y tercera dimensión.....	14
4 Justificación	15
4.1 Pregunta de Investigación	16
5. Objetivos.....	16
5.1 General	16
5.2 Objetivos particulares	17
6. Estrategia Experimental	17
7. Metodología	17
7.1 Células troncales pluripotentes humanas embrionarias y líneas de células iPSC	17
7.2 Cultivo celular en condiciones 2D/monocapa y 3D/ Cuerpo embrioide	18
7.3 Diferenciación mesodérmica, hematoendotelial y hematopoyética	18
7.4 Ensayo de colonias hematopoyéticas	18
7.5 Diferenciación hematopoyética en Co-cultivo con AFT024	18
7.6 Análisis de citometría de flujo.....	19
7.7 Análisis de expresión génica por RT-qPCR	19
7.8 Análisis estadístico	20
8. Resultados.....	20
8.1 Células pluripotentes.....	20
8.2 Inducción del mesodermo a partir de hPSCs	21
8.3 Las condiciones de cultivo 3D/EB y 2D/monocapa difieren en su capacidad para producir células hematopoyéticas.....	22

8.4 La señalización endógena de Wnt/catenina está activa en el sistema 3D/EB pero no en el sistema 2D/monocapa.....	26
9. Discusión	30
10. Conclusiones	31
11. Bibliografía	33
12. Apendice	39

1. Abreviaturas

AGM: Aorta gónada mesonefro

iPSCs: *Induced Pluripotent Stem Cells*

hESC: *Human Embryonic Stem Cells*

hPSCs: *Human Pluripotent Stem Cells*

EB: *Embryoid body*

FGF: *Fibroblast Growth Factor*

KDR: *Kinase insert domain receptor*

IL: *Interleukin*

SCF: *Stem Cell Factor*

E8: *Essential 8 media*

HbF: Hemoglobina Fetal

EMP: erytromieloid progenitor, Progenitor eritro-mieloide

EPO: eritropoyetina

CFU: Colony Forming Unit

CFC/eryPCFC: primitive erythroid colony-forming progenitors

FLT3: proteína tirosina-quinasa de tipo receptor.

ERG: ETS-related gene

HOXA5: Homeobox A5

HOXA9: Homeobox A9

HOXA10: Homeobox a10

LCOR: *Ligand dependent nuclear receptor co-repressor*

RUNX1: RUNX family transcription factor1

SPI1: Spi-1 proto-oncogene

OCT4: Octamer-binding transcription factor 4

SOX2: SRY-box transcription factor 2

KLF4: Krüppel-like factor 4

MYC: Proto-oncogen MYC, también llamado factor de transcripción bHLH

2. Resumen

Los métodos *in vitro* para la diferenciación hematopoyética de células troncales pluripotenciales humanas (hPSC) son un tema prioritario para la investigación de los mecanismos de la embriogénesis temprana. Hasta ahora, los resultados publicados con respecto a la generación de células hematopoyéticas provienen de estudios que utilizan de manera independiente formatos de cultivo 2D o 3D, por lo tanto, es difícil discernir su contribución particular al desarrollo de un modelo *in vitro* de la hematopoyesis que sea similar a las condiciones *in vivo*. El objetivo de este estudio fue evaluar usando las mismas condiciones de cultivo y el mismo intervalo de tiempo, el potencial de cada uno de estos dos formatos para promover la diferenciación de células troncales hPSC a hematopoyesis primitiva sin activación exógena la vía de Wnt. Se utilizaron formatos de cultivo en 2D y 3D en paralelo, empleando el mismo entorno de cultivo y métodos de análisis (citometría de flujo, inmunofluorescencia, RT-qPCR) para investigar las etapas de compromiso y especificación de células endoteliales mesodérmicas y del endotelio hemogénico a células hematopoyéticas CD34+. Los resultados mostraron, una formación adecuada del mesodermo, un compromiso eficiente hacia el endotelio hemogénico, un mayor número de células hematopoyéticas CD34+ y potencial de capacidad de formación de colonias solo en la diferenciación en formato 3D. Este estudio muestra que el formato 3D, no así el 2D, asegura la inducción del programa de diferenciación intrínseco de las hPSC a células hematopoyéticas primitivas. Este trabajo propone que el formato 3D proporciona un nivel adecuado de regulación positiva de la señalización endógena de Wnt/ β -catenina.

Abstract

In vitro methods for the hematopoietic differentiation of human pluripotent stem cells (hPSCs) are a priority topic for the investigation of the mechanisms of early embryogenesis. Until now, the published results regarding the generation of hematopoietic cells come from studies using independently 2D or 3D culture formats, therefore it is difficult to discern their particular contribution to the development of an in vitro model of hematopoiesis that be similar to the conditions in vivo. The objective of this study was to evaluate, using the same culture conditions and the same time interval, the potential of each of these two formats to promote the differentiation of hPSC stem cells to primitive hematopoiesis without exogenous activation of the Wnt pathway. Parallel 2D and 3D culture formats, employing the same culture environment and analysis methods (flow cytometry, immunofluorescence, RT-qPCR) were used to investigate the stages of commitment and hemogenic endothelial and mesodermal endothelial cells to hematopoietic cells. CD34+. The results showed adequate mesoderm formation, efficient commitment to the hemogenic endothelium, increased number of CD34+ hematopoietic cells, and potential colony-forming ability only in 3D differentiation. This study shows that the 3D format, but not the 2D format, ensures the induction of the intrinsic differentiation program of hPSCa primitive hematopoietic cells. This work proposes that the 3D format provides an adequate level of up-regulation of endogenous Wnt/ β -catenin signalling.

3. Introducción

El sistema hematopoyético es el encargado de dar origen a los linajes sanguíneos del organismo humano. Se trata de una organización de jerarquía compleja, la cual comprende distintos linajes que comparten un progenitor común, la célula troncal hematopoyética (por sus siglas en inglés, Hematopoietic Stem Cell, HSC) (Snoeck, 2013). La hematopoyesis es el proceso de formación de las células sanguíneas y células del sistema inmune. Se inicia a partir de una población limitada de HSCs, de la cual se diferencian de manera gradual y continua, progenitores que restringen su compromiso de linaje (Balandrán & Pelayo, 2016).

Desde el hallazgo por James Till and Ernest McCulloch, de la capacidad para la contribución a los linajes sanguíneos de las células de la médula ósea (donde residen las HSCs adultas), hasta nuestro tiempo, se han realizado una cantidad significativa de estudios enfocados en la identificación de las células que componen el sistema el sistema hematopoyético humano (Steensma & Kyle, 2021) siendo el componente inicial la HSC, la cual da origen a progenitores comunes comprometidos hacia los linajes linfoides y mieloides, que a su vez darán origen a progenitores comunes para ambos linajes, para posteriormente dirigirse a células especializadas, como megacariocitos, células dendríticas, macrófagos, eritrocitos; y linfocitos innatos. Los progenitores linfoides, maduraran en nichos especializados donde posteriormente formaran parte de las células del sistema inmune adaptativo (Zhang, Gao, Xia, & Liu, 2018)

El conocimiento de la ontogenia del sistema hematopoyético adulto ha sido útil para la comprensión de los mecanismos moleculares de las patologías que lo afectan. Dada su implicación en un número importante de funciones dentro del organismo, es que estas células tienen una importancia clínica relevante; por ejemplo, para estudios mecanísticos de la hematopoyesis, desarrollo de terapia celular para enfermedades hematológicas, tolerancia inmune inducida, modelado de enfermedades y detección de fármacos (Mora-Roldan, Ramirez-Ramirez, Pelayo, & Gazarian, 2021).

Si bien a pesar de los extensos esfuerzos en esta área durante las últimas dos décadas para la identificación de la ontogenia del sistema hematopoyético adulto, así como a sus interacciones y mecanismos en salud y enfermedad, aún no es posible derivar HSC *in vitro*. Esta imposibilidad se debe en parte a la falta de una comprensión completa de las vías reguladoras que controlan la aparición de HSC durante el desarrollo embrionario (Sturgeon, Ditadi, Clarke, & Keller, 2013)

3.1 La hematopoyesis durante el desarrollo

Actualmente, la mayor contribución a la ontogenia del sistema hematopoyético temprano, se ha hecho a través del empleo de modelos animales, principalmente en ratón, pollo, y en el pez cebra (Jing & Zon, 2011). Estos modelos han permitido elucidar los principales componentes morfológicos y anatómicos de la formación de los linajes sanguíneos, permitiendo así la identificación de sitios tempranos de actividad hematopoyética (Boieri, Shah, Dressel, & Inngjerdigen, 2016). En los vertebrados la producción de las células sanguíneas ocurre a través de los procesos de localización y especificación de distintas poblaciones de células embrionarias en diversos sitios durante la formación del embrión (Yoder, 2014). En mamíferos, los sitios en donde secuencialmente ocurre la hematopoyesis

son el saco vitelino, un área que rodea la aorta dorsal, llamada también la región aorta-gonada mesonefro (AGM, Aorta-Gonad-Mesonephros, por sus siglas en inglés), el hígado fetal y finalmente la médula ósea (Gao, Xu, Asada, & Frenette, 2018). Las propiedades de las diferentes células troncales hematopoyéticas en cada uno de estos sitios difieren, debido al contexto correspondiente a cada uno de estos nichos. Por ejemplo, las células troncales hematopoyéticas presentes en la etapa del hígado fetal son células con un ciclo celular activo, mientras que las de la médula ósea son principalmente quiescentes (Lewis, Yoshimoto, & Takebe, 2021). Es debido a estas diferencias en sus capacidades que, del mismo modo que en la hematopoyesis del organismo adulto, que inicia en la médula ósea, se han realizado esfuerzos para definir los tipos de hematopoyesis que pueden generarse en los modelos animales; pues ahora se sabe que durante el desarrollo, la hematopoyesis se establece en oleadas sucesivas restringidas temporal y espacialmente, cada una de las cuales da lugar a progenitores sanguíneos específicos; la hematopoyesis primitiva genera principalmente eritrocitos primitivos, mientras que la hematopoyesis definitiva genera todos los linajes hematopoyéticos, incluidos los eritrocitos definitivos así como HSCs con actividad repobladora a largo plazo (Lacaud & Kouskoff, 2017; Umeda et al., 2004).

3.2 Hematopoyesis primitiva

A la ola inicial de producción de sangre en el saco vitelino de los mamíferos se denomina "primitiva". La función principal de la hematopoyesis primitiva es la producción de glóbulos rojos que facilitan la oxigenación de los tejidos a medida que el embrión experimenta un crecimiento rápido. La principal característica de las células eritroides primitivas es la expresión de proteínas de globina embrionarias (HbF) (Keller, Kennedy, Papayannopoulou, & Wiles, 1993). En el ser humano, se piensa que la hematopoyesis primitiva comienza del mismo modo que en los modelos animales, en la región AGM, sin embargo, se han logrado identificar poblaciones *in vitro*, que amplían los estudios en animales; en el embrión de ratón, durante el desarrollo, la hematopoyesis primitiva tiene lugar en las islas sanguíneas dentro del saco vitelino. Esta primera ola da lugar a eritrocitos primitivos, macrófagos y megacariocitos. Todas las producciones subsecuentes de células sanguíneas emergentes a partir de este periodo se definen como hematopoyesis definitiva. Esto incluye progenitores eritro-mieloides (EMP, erythromyeloid progenitor progenitor eritro-mieloides, por sus siglas en inglés) que se producen en el saco vitelino (Figura 1) (Vink, Mariani, & Dzierzak, 2022).

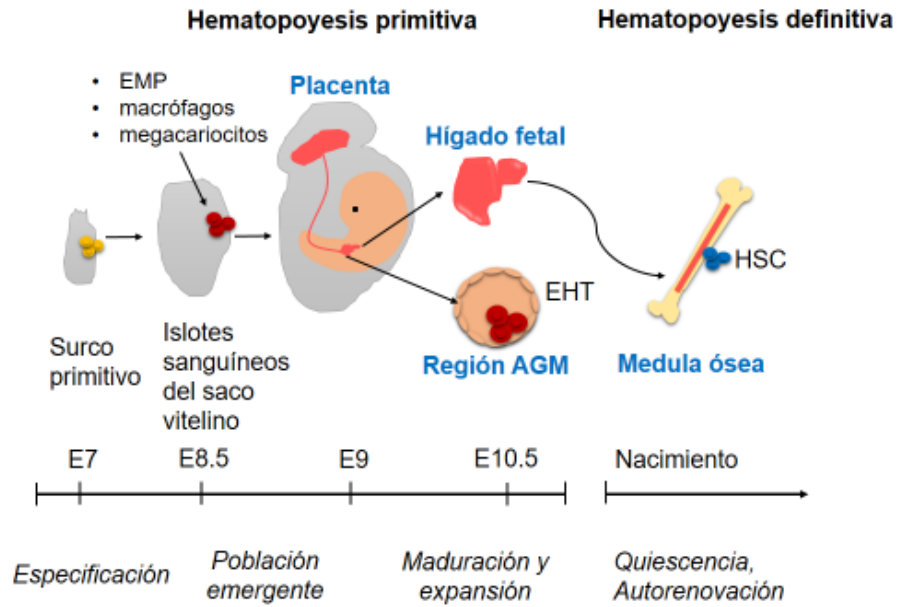


Figura 1. Representación esquemática de la hematopoyesis primitiva *in vivo*. La hematopoyesis emerge en oleadas, con eventos tempranos que ocurren en el saco vitelino y en la región aorta-gónada-mesonefros (AGM) derivados de poblaciones endoteliales del surco primitivo y del mesodermo. Esta ola se distingue por la presencia de progenitores eritroides primitivos, macrófagos embrionarios y megacariocitos en el saco vitelino cuya producción continuara hasta E9. El proceso continúa en E10.5 con las primeras HSC que surgen del endotelio homogéneo en la región AGM; simultáneamente a la producción de EMP y de progenitores linfoides que continúa en el saco vitelino y AGM. Después de E10.5, las HSC se producen en las arterias umbilicales, en el saco vitelino y la placenta. Las HSC de todos estos sitios establecen el hígado fetal. El hígado sigue siendo el sitio principal de la hematopoyesis hasta el final de la gestación, cuando las HSC se movilizan hacia el torrente sanguíneo y se alojan en el compartimento de la médula ósea para establecer la hematopoyesis en la médula ósea. Adaptado de Kumar, et. al. *Stem Cells International* (2019).

3.2.1 El componente endotelial en la hematopoyesis primitiva

Se reconoce ahora que la sangre y el endotelio son dos linajes estrechamente relacionados que emergen de manera simultánea durante el desarrollo embrionario (Fraser et al., 2002; Li, Ferkowicz, Johnson, Shelley, & Yoder, 2005; Sabin, 1920). La demostración formal de que los progenitores sanguíneos se generan a partir de una población de células endoteliales se logró mediante el rastreo de linajes (Jaffredo, Gautier, Eichmann, & Dieterlen-Lièvre, 1998; Zovein et al., 2008) e imágenes de lapso de tiempo (Bertrand et al., 2010; Boisset et al., 2010; Eilken, Nishikawa, & Schroeder, 2009; Kissa & Herbomel, 2010; Lancrin et al., 2009). Estos estudios proponen la existencia de una población endotelial especializada, denominada "endotelio hemogénico", la cual da origen a las células sanguíneas a través de una transición endotelial a hematopoyética en lugar de una división asimétrica (Eilken et al., 2009). Por definición, un endotelio hemogénico es una célula endotelial que tiene el potencial de convertirse en una célula sanguínea, se caracteriza por un perfil de expresión génica y una morfología específica del endotelio, localizada dentro de la capa endotelial de los vasos sanguíneos (Frame, Fegan, Conway, McGrath, & Palis, 2016). El endotelio hemogénico como población celular que da lugar a células sanguíneas se ha descrito ahora en la mayoría de las especies estudiadas hasta la fecha. En el embrión de ratón, se ha demostrado que tanto EMPs del saco vitelino, como progenitores intra-embrionarios y HSC emergen del endotelio hemogénico (Boisset et al., 2010). Aun no se define por completo si la hematopoyesis primitiva surge directamente del mesodermo, del endotelio hemogénico o de otro tipo de precursor. Sin embargo, existe evidencia clara en la literatura que demuestra que la hematopoyesis primitiva surge de precursores que expresan marcadores endoteliales, incluidos TIE2, cadherina vascular endotelial (CD144) y CD31 (K. Choi, Kennedy, Kazarov, Papadimitriou, & Keller, 1998; Li et al., 2005; Vodyanik, Thomson, & Slukvin, 2006).

3.3 La hematopoyesis definitiva

La hematopoyesis definitiva se distingue por la presencia de poblaciones celulares de linajes principalmente linfoides (Células T, B y NK). Las células linfoides maduran en órganos inmunes secundarios una vez que salen del nicho hematopoyético donde sus progenitoras se alojan durante el desarrollo embrionario (Jackson, Ling, & Roy, 2021). A pesar de no estar completamente caracterizada, se sabe que, del mismo modo que la hematopoyesis primitiva, la hematopoyesis definitiva está estrechamente relacionada con el endotelio; estudios en ratón y pez cebra han arrojado evidencias de que la hematopoyesis definitiva se genera al igual que la hematopoyesis primitiva: a través de la transición endotelial a hematopoyética (EHT, *endotelial to hematopoietic transition*, por sus siglas en inglés). Se piensa que, en el modelo de ratón, la primera ola de hematopoyesis comienza en el saco vitelino para generar progenitores primitivos (principalmente mielo-eritroides) y luego en la región aorta-gónada-mesonefro (AGM) para generar HSC definitivas. Estas dos oleadas de hematopoyesis generan progenitores funcionalmente distintos, y las células inmunitarias, como las células linfoides, se generan principalmente a partir de la segunda oleada de hematopoyesis definitiva (Figura 1). (Frame et al., 2016; Ulloa et al., 2021; Zhu et al., 2020).

Las células provenientes de la hematopoyesis definitiva, tienen un potencial terapéutico importante dado que son los principales componentes del sistema inmune, sin embargo existen limitantes técnicas que restringen en gran medida su aplicación, principalmente la de su obtención, pues su disponibilidad depende en gran medida de donantes autólogos, o de forma limitada, donantes heterólogos condicionados a su compatibilidad (Morgan, Gray, Lomova, & Kohn, 2017). Para sobreponerse a esta problemática, una fuente alternativa de HSCs, podría ser a través de las células pluripotenciales humanas, ya sea embrionarias o inducidas (hiPSCs, human pluripotent stem cells, por sus siglas en inglés) (Moretta et al., 2016).

3.4 Generación de células troncales hematopoyéticas partir de células troncales pluripotentes embrionarias e inducidas (hPSCs)

A partir del aislamiento de una población residente en la masa interna del blastocisto humano, con capacidad de auto renovación y expansión *in vitro*, a las que James Thomson les denominó como células embrionarias (hES, Embryonic Stem Cells, por sus siglas en inglés), Thomson demostró que estas células tienen la capacidad de diferenciarse hacia células de las tres capas embrionarias que componen el organismo adulto, este descubrimiento dió origen a una nueva área de investigación en células troncales, pues las hESCs, revelaron su potencial para medicina regenerativa (Thomson, et al., 1998). En 2006, Yamanaka y colaboradores reportaron que la transfección de células somáticas de raton con los factores de transcripción OCT4, SOX2, KLF4y c-MYC, provoca su reprogramación hacia un estado pluripotente. Las células resultantes recibieron el nombre de Células Troncales Pluripotentes Inducidas (iPSC, Induced-Pluripotent Stem Cells) (Takahashi & Yamanaka, 2006). Un año después, Yamanaka mostró que con los mismos factores se pueden reprogramar fibroblastos humanos (Takahashi et al., 2007) y Carey demostró que se pueden reprogramar células somáticas utilizando un solo vector lentiviral policistrónico portador de los cuatro genes utilizados por Yamanaka (Carey et al., 2009). Desde entonces, un número considerable de laboratorios han replicado con éxito la reprogramación en una variedad de tipos celulares. La producción de iPSC (por lo cual Yamanaka recibió el Premio Nobel de Medicina en 2012), permite la derivación *in vitro* de células de cualquier tejido y de cualquier fondo genético. Entre las aplicaciones posibles de esta tecnología están: i) modelaje *in vitro* del desarrollo humano, (ii) suministro de células normales o patológicas para ensayos preclínicos, (iii) abastecimiento para terapias celulares, (iv) rejuvenecimiento de células viejas/senescentes para medicina regenerativa y v) modelaje *in vitro* de enfermedades humanas.

Tomando en cuenta lo anterior, es que diversos grupos desarrollaron protocolos para la generación de células de linajes hematopoyéticos al final de la década de los años 90 (Itskovitz-Eldor et al., 2000; Kaufman Dan, Hanson Eric, Lewis Rachel, Auerbach, & Thomson James, 2001). Con la participación de James Thomson, los trabajos de Slukvin sentaron las bases para la generación de HSCs a partir de hESCs, pudiendo identificar los principales marcadores que definen a progenitores hematoendoteliales y hematopoyéticos en etapas tempranas, los progenitores hematopoyéticos dentro de la población de células CD34+ en cultivos de hPSC podrían identificarse con precisión en función de la expresión de leucosialina (CD43), que los separa de forma fiable de las células endoteliales CD43-CD34+ y las células CD43-CD34- con características mesénquimales. Los progenitores

derivados de CD34+CD43+ son progenitores multilínea que carecen de marcadores de linaje y muestran un fenotipo típico de HSC humanas que emergen en AGM que tienen un fenotipo CD34+CD38-. A pesar de la similitud fenotípica con las HSC, el grupo de Slukvin, no ha podido detectar ninguna actividad de repoblación hematopoyética significativa después de la inyección intravenosa de estas células en ratones (Slukvin, 2013). Del mismo modo, el grupo de Gordon Keller ha contribuido notablemente a la identificación de los marcadores que definen las poblaciones hematopoyéticas, principalmente en ensayos de citometría de flujo, en donde a través del análisis de diversos marcadores previamente identificados durante los primeros días de diferenciación, mostraron que ambos programas hematopoyéticos transitan a través de intermediarios endoteliales hemogénicos y se desarrollan a partir de progenitores KDR+CD34-CD144- que se distinguen por la expresión de CD235a. Keller y su grupo proponen, que la generación de progenitores primitivos (KDR+CD235a+) depende de la señalización negativa de la vía Wnt- β -catenina, mientras que la especificación de progenitores definitivos (KDR+CD235a-) requiere la señalización de Wnt- β -catenina durante este mismo periodo de tiempo. Estos hallazgos han establecido las estrategias de diferenciación selectiva para la generación de progenitores hematopoyéticos primitivos o definitivos a través de la manipulación de Wnt- β -catenina, con el objetivo de acceder a poblaciones enriquecidas para futuros estudios sobre el desarrollo hematopoyético derivado de hPSCs (Sturgeon, Ditadi, Awong, Kennedy, & Keller, 2014). Recientemente, han surgido sistemas de "reprogramación directa" (Huang et al., 2009; Lim et al.; Najm et al., 2013), inspirados en la sinergia del factor de transcripción descubierta por Takahashi y Yamanaka (Takahashi et al., 2007). Dichos sistemas postulan que mediante la inducción forzada, las células deberían convertirse "directamente" a células somáticas (D'Alessio et al., 2015; Rackham, Firas, Fang, & Oates, 2016). Este abordaje también fue aplicado a la generación de células hematopoyéticas, en este rubro, es notable el trabajo del grupo de George Daley, en el, se describe la obtención de HSC capaces de injerto y repoblación de los compartimentos hematopoyéticos provenientes de células pluripotentes, incluida la hematopoyesis definitiva. Con este fin, el grupo de Daley, realizó la diferenciación dirigida por morfógenos hacia HSCs humanas provenientes del endotelio hemogénico, posterior a la identificación de 26 factores de transcripción específicos de HSC adultas los cuales fueron seleccionados como candidatos por su capacidad para promover el injerto hematopoyético de múltiples linajes en ratones hospederos. El grupo propone 7 factores de transcripción (ERG, HOXA5, HOXA9, HOXA10, LCOR, RUNX1 y SPI1) que en conjunto, son suficientes para convertir el endotelio hemogénico en HSCs y progenitoras hematopoyéticas que generan células mieloides, B y T capaces de injertarse en ratones receptores primarios y secundarios. Este enfoque de diferenciación impulsada por morfógenos y conversión de destino celular mediada por factores de transcripción produce HSC y progenitoras hematopoyéticas a partir de hPSC (Sugimura et al., 2017). A pesar de estos avances, la generación de HSC *in vitro* con potencial de injerto y de hematopoyesis definitiva, necesita de métodos que no involucren la transferencia de factores de transcripción, es por esta razón que son necesarios enfoques que sean capaces de recapitular el proceso embrionario para la generación de HSC.

3.4.1 Cultivos en monocapa y tercera dimensión

Como ya se ha mencionado, se han realizado múltiples estudios para definir las condiciones de diferenciación apropiadas requeridas para obtener células troncales hematopoyéticas *in vitro*; por ejemplo, manipulación de vías de señalización, (Crisan et al., 2015), citoquinas en combinaciones adecuadas, y microambientes específicos, como células alimentadoras o nichos artificiales y con diferentes sistemas de cultivo como cuerpos embrioides (EB, del inglés Embryoid Body) y cultivos en tercera dimensión (D'Souza et al., 2016). El EB se ha empleado ampliamente en estudios de hematopoyesis para seguir el curso del desarrollo embrionario y para investigar la hematopoyesis primitiva (y definitiva) representada por el endotelio hemogénico (de Bruijn, 2014; Huang et al., 2009; Lacaud & Kouskoff, 2017) que produce células eritroides y monocitos (K. Choi et al., 1998; Huber, Kouskoff, Fehling, Palis, & Keller, 2004; Keller et al., 1993; Kennedy, D'Souza, Lynch-Kattman, Schwantz, & Keller, 2007; Knorr et al., 2013). Además, la monocapa (cultivo en 2D) se ha considerado adecuada para la inducción de hematopoyesis primitiva (Galat et al., 2017; Mills, Paluru, Weiss, Gadue, & French, 2014; Niwa et al., 2011; Ruiz et al., 2019). Tanto en los sistemas de EB (3D) como en monocapa (2D), se ha utilizado la estimulación exógena de la vía Wnt/catenina para mejorar la obtención de hematopoyesis definitiva. En conjunto, estos estudios han contribuido al concepto actual de diferenciación hematopoyética *in vitro* (Figura 2) y plantearon preguntas sobre las razones para usar EB o monocapas para producir células hematopoyéticas (ver Tabla 1). Estudios recientes demostraron las ventajas de los protocolos en 3D de diferenciación de hPSC y generación de células progenitoras humanas definitivas de grado clínico y células troncales de linajes hematopoyéticos, progenie linfoide potencialmente injertable para estudios de trasplante y progenie eritroide capaz de producir hemoglobina adulta (Demirci et al., 2020).

La tecnología de cultivo en 3D también se ha perfeccionado mediante el empleo de biomateriales para crear modelos de tumores en 3D para la detección de fármacos (Kaushik, Ponnusamy, & Batra, 2018; Nii, Makino, & Tabata, 2020). Existen, también, precedentes de la realización de cultivos en 3D y 2D en paralelo, principalmente llevados a cabo para la comparación de ambos sistemas para escalar la producción, expansión y mantenimiento *in vitro* de hPSCs (Abecasis et al., 2017). En el mismo contexto, la comparación entre condiciones 2D y 3D se ha realizado en estudios de otros modelos de diferenciación, como la diferenciación osteogénica (Tian et al., 2008) y, ampliamente, en la diferenciación cardíaca. Los estudios con cardiomiocitos derivados de hPSC mostraron que el potencial de diferenciación se vio afectado por la elección de las plataformas de cultivo, ya sea 2D o 3D (Fong et al., 2016; Hamad et al., 2019; Haraguchi, Matsuura, Shimizu, Yamato, & Okano, 2015; Jeziorowska et al., 2017; Sacchetto, Vitiello, de Windt, Rampazzo, & Calore, 2020).

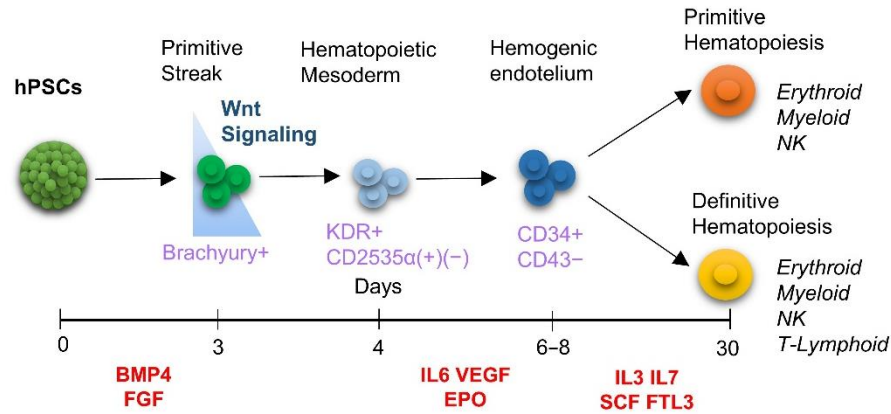


Figura 2. Representación esquemática del conocimiento actual de diferenciación in vitro de células troncales pluripotenciales humanas al linaje hematopoyético. La diferenciación hematopoyética de hPSCs se representa en base a los protocolos en la literatura. La diferenciación hematopoyética ocurre de una manera específica de etapa consecutiva, comenzando con el compromiso mesodérmico inducido por BMP4 (días 0 a 4) seguido por la activación exógena convencionalmente empleada de la señalización de Wnt/ β -catenina en esta etapa inicial. El mesodermo de la placa lateral (Día 3–4) genera progenitores endoteliales (4–6), endotelio hemogénico con potencial para linajes hematopoyéticos (Día 6–8). En esta última etapa, la población se divide en dos programas/olas de desarrollo: hematopoyesis primitiva, caracterizada por la formación de tipos de células monocíticas, y hematopoyesis definitiva con potencial linfoide.

4 Justificación

El presente trabajo tuvo como objetivo realizar un estudio de la hematopoyesis temprana a partir de hPSCs, enfocándose en los aspectos particulares del cultivo, dada la falta de un consenso que defina las condiciones específicas para la obtención de HSCs y de este modo, revelar las diferencias entre las condiciones 2D y 3D observables durante la generación de células hematopoyéticas en condiciones paralelas. Previamente, se han observado en estudios independientes (K. Choi, Vodyanik, & Slukvin, 2009; Niwa et al., 2009; Ohta et al., 2016; Yanagimachi et al., 2013) algunas diferencias entre la configuración 2D y 3D en los procesos de especificación de linaje, así como las ventajas de los sistemas 3D. Sin embargo, en experimentos independientes, debido a la extrema plasticidad de la embriogénesis temprana, las diferencias en el microambiente pueden influir claramente en los procesos de desarrollo, por lo tanto, solo mediante el uso del mismo entorno experimental, las mismas condiciones de cultivo, ensayos paralelos y principios de interpretación podemos destacar confiablemente, las diferencias intrínsecas entre los dos métodos de cultivo observados en cada uno de los pasos de la inducción y diferenciación *in vitro*. Para abordar este problema, hemos realizado experimentos comparativos de sistemas 2D y 3D con respecto a la capacidad de cada uno de ellos para apoyar la diferenciación hematopoyética primitiva utilizando una línea de células troncales embrionarias comerciales y una línea de células troncales pluripotenciales inducidas generada en nuestro laboratorio.

Estudio	hPSCs	Plataforma de Cultivo	Tipo de Hematopoyesis	Linajes generados	Activación de Wnt
Yanagimachi et al., 2013	hESCs, hiPSCs	2D/Monocapa	Primitiva	Monocitos, Células Dendríticas	No
Sturgeon et al., 2014	hESCs,	3D/EB	Primitiva	Monocitos, Linajes linfoides	Si
	HiPSCs		Definitiva		
Ruiz et al., 2019	hiPSCs	2D/Monocapa	Primitiva	Celulas Hematopoyecticas primitivas	Si
Niwa et al., 2011	hiPSCs	2D/Monocapa	Primitiva	Linajes Monociticos	No
Kennedy et al., 2007	hESCs	3D/EB	Primitiva	Progenitores hematopoyéticos tempranos	No
Galat et al., 2017	hiPSCs	2D/Monocapa	Primitiva	Linajes monociticos	Si
Ditadi & Sturgeon, 2015	hESCs	3D/EB	Primitiva, Progenitores definitivos	Endotelio Hemogénico y linajes hematopoyéticos tempranos	Si
Knorr et al., 2013	hiPSC, hESCs	3D/EB	Definitiva	Celulas Nk, linfocitos	No

Tabla 1. Publicaciones seleccionadas sobre el uso independiente de sistemas 3D/cuerpo embrioide y 2D/monocapa en la diferenciación hematopoyética de hPSC. La tabla muestra las diferencias en la generación de linajes hematopoyéticos bajo estas dos condiciones. Además, los resultados muestran la importancia de la activación de la señalización de Wnt/ β -catenina durante la diferenciación de las hPSC del destino hematopoyético definitivo.

4.1 Pregunta de Investigación

¿Cuáles son las características de las células hematopoyéticas diferenciadas a partir de células pluripotenciales humanas e inducidas al ser cultivadas en paralelo en condiciones 2D y 3D?

Hipótesis

La comparación del potencial de diferenciación hematopoyética de las células troncales pluripotenciales, embrionarias e inducidas en plataformas de cultivo 2D y 3D, mostrara las diferencias de ambas plataformas de cultivo.

5. Objetivos

5.1 General

Realizar un estudio comparativo de la diferenciación hematopoyética temprana a partir de células pluripotenciales humanas embrionarias e inducidas en condiciones 2D y 3D.

5.2 Objetivos particulares

- Establecer y expandir cultivos de hiPSCs y hESCs (iDL2, ESI017)
- Estandarizar las condiciones de diferenciación hacia el mesodermo
- Establecer las condiciones de diferenciación hematopoyética temprana en condiciones 2D y 3D.
- Realizar pruebas comparativas de marcadores específicos de la hematopoyesis temprana en condiciones 2D y 3D.
- Identificar, cambios o diferencias en los marcadores de hematopoyesis temprana evaluados durante el proceso de diferenciación en condiciones 2D y 3D.

6. Estrategia Experimental

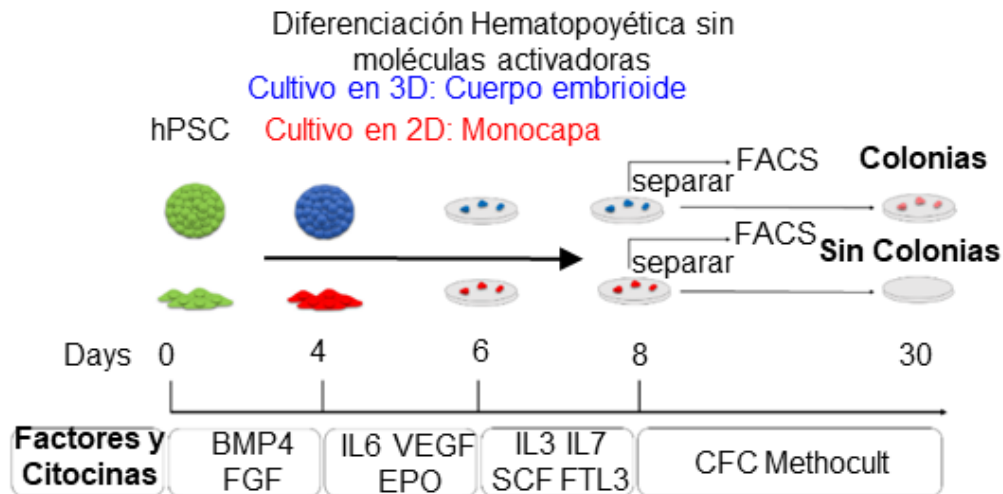


Figura 3. Diferenciación hematopoyética en cultivos 2D y 3D. La diferenciación hematopoyética se llevó a cabo con el uso de un protocolo adaptado de Niwa (2D) y Keller (3D), sin el uso de moléculas activadoras de la vía de Wnt (Niwa et al., 2011; Sturgeon et al., 2014) y lleva un tiempo de 30 días hasta la generación de linajes maduros. Se destacan los procesos clave durante los días 4 (aparición del mesodermo), 6 (compromiso hematopoyético temprano) y 8 (compromiso hematopoyético) durante los cuales se evaluaron por citometría de flujo, PCR en tiempo real e inmuno-florescencia, marcadores relevantes del compromiso hematopoyético temprano a partir del día 8 y hasta el día 30 se verificó la presencia de colonias hematopoyéticas en experimentos de unidades formadoras de colonias (CFU) BMP4: Bone morphogenic Protein 4, FGF: Fibroblast Grow Factor, EPO: Eritropoyetina, VEGF: Vascular endothelial grow factor, FTL3: tirosina-proteína quinasa de tipo receptor FLT3, SCF: Stem Cell Factor, IL, 3,6 y 7, Interleucinas 3, 6 y 7.

7. Metodología

7.1 Células troncales pluripotenciales humanas y líneas de células iPS

La línea de células ES ESI-017 se adquirió de ESI-BIO (Alameda, CA, EE. UU.). Se generaron células troncales pluripotentes inducidas como se describió anteriormente (Cevallos, Rodríguez-Martínez, & Gazarian, 2018). Brevemente, los fibroblastos dérmicos humanos (ATCC número de catálogo PCS-201-010) se transdujeron con vectores

lentivirales que contenían los genes que codifican los factores de reprogramación Oct 4, Sox2, Nanog, Klf4 y c-Myc, lo que resultó en la formación de colonias en el día 15 a 20 días post-infección. A continuación, las colonias se seleccionaron según la morfología y la compactación y se expandieron hasta el pase 30 y se mantuvieron hasta que estaban listas para la diferenciación. El uso de células humanas en este estudio ha sido aprobado por el comité de ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

7.2 Cultivo celular en condiciones 2D/monocapa y 3D/ Cuerpo embrioide

Se cultivaron colonias de células iPS y ES humanas como 2D/monocapa y 3D/EB en medio Essential 8, E8 (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE. Louis, MI, EE. UU.) Utilizando la técnica de disgregación mecánica. Las células 2D/monocapa se sembraron a una densidad de 1×10^4 en placas recubiertas con Matrigel (MG) (Corning, NY, EE.) (Nunc, Rochester, Nueva York, EE. UU.). Los grupos de células se mantuvieron en medio E8 hasta que las esferas crecieron a no más de 300 μ M de diámetro. Las esferas obtenidas se pasaron después del tratamiento con colagenasa y seguido de desagregación mecánica. Los grupos de células de alrededor de 100 a 200 μ m se sembraron y cultivadas en las mismas condiciones hasta el inicio de la diferenciación (día 0)

7.3 Diferenciación mesodérmica, hematoendotelial y hematopoyética

Para observar los efectos de los dos sistemas de cultivo (2D y 3D) sobre la diferenciación, no se añadieron a los medios activadores ni inhibidores de la vía Wnt como se hace convencionalmente (véase la Tabla 1). La diferenciación de las hPSCs tuvo lugar en placas de 12 pocillos (Nunc) tratadas con MG para el 2D y en placas no tratadas de ultrabajo adherencia para 3D. La diferenciación mesodérmica se realizó en medio Stempro 34 (Sigma-Aldrich) suplementado con 1X ITS (Gibco), 40 ng/mL de BMP4, 10 ng/mL de FGF2 (Preprotech), 50 μ g/mL de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich), 1X Glutamax (Gibco) y Gentamicina (Gibco) del día 0 al día 4. El día 4 se cambió el medio a Stempro 34 con 1XITS, 1X Glutamax, gentamicina concentración 10 ng/mL FGF, 10 ng/mL VEGF; 10 ng/mL de IL6 y 2 U/mL de EPO (Preprotech) por tres días más (días 4 a 6). El día 6, el medio se reemplazó con medio de diferenciación hematopoyética Stempro 34 que contenía los suplementos anteriores más 50 ng/ml de SCF, 5 ng/ml de IL7, 5 ng/ml de FLT3 y 10 ng/ml de IL3 (Preprotech Rocky Hill, EE. UU.). CHIR99021 (3 μ M) e IWR-1 (1 μ M) (Sigma), se agregaron solo cuando se indicó.

7.4 Ensayo de colonias hematopoyéticas

El análisis del potencial de formación de colonias hematopoyéticas de las células troncales hematopoyéticas se realizó sembrando 2,000 células en Methocult (Stem Cell Technologies Inc. Vancouver, Canadá) suplementado con SCF (100 ng/mL), EPO (2 U/mL), IL-6 (5 ng/mL), IL-3 (40 ng/mL), TPO (40 ng/mL) (Preprotech). Las colonias se cuantificaron después de 30 días. Las células se separaron del Methocult mediante centrifugación y se fijaron para la tinción de Wright.

7.5 Diferenciación hematopoyética en Co-cultivo con AFT024

Para generar linajes hematopoyéticos cuya diferenciación fuera más avanzada, empleamos el co-cultivo con la línea celular AFT024, que se deriva del estroma hepático fetal de ratón, esta línea celular expresa DLL1, un factor importante durante la adquisición de destinos hematopoyéticos avanzados, se trata de un ligando de la vía de Notch. La señalización de Notch desempeña un papel en la hematopoyesis pues contribuye a la expansión y auto-

renovación de HSC (Lampreia, Carmelo, & Anjos-Afonso, 2017). Las células se compraron de ATCC (SCRC-1007) y se transdujeron con un reportero de GFP lentiviral (pLentiCMV GFP Puro, Addgene). Las células del pase 4 se expandieron con Optimem (Gibco) y FBS al 5 % (Gibco) hasta la confluencia y luego se sembraron 10 000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. En los días 6 a 8, se sembraron células 2D/monocapa y 3D/EB en AFT024 monocapas con medio Optimem suplementado con 1%FBS, 1X Glutamax e IL7, IL3, SCF con cambio de monocapa cada 5 días durante 30 días (Ramirez-Ramirez & Vadillo, 2016).

7.6 Análisis de citometría de flujo

El análisis de citometría de flujo se realizó en un citómetro FACSCanto (Becton Dickinson, NJ, EE. UU.). Los anticuerpos conjugados con fluoróforo utilizados para la inmunotinción por citometría de flujo se enumeran en la Tabla 1 del apéndice. La inmunotinción se realizó según lo recomendado en la ficha técnica de cada anticuerpo. El análisis de las adquisiciones de citometría de flujo se realizó con el software FACSDiva (Becton Dickinson, BD Biosciences, CA, EE. UU.) 2.3. Y con el software FlowJo v10.0.7 (FlowJo, LLC, BD Biosciences, CA, EE. UU.). Se registraron diez mil eventos para cada muestra. El análisis de los datos de citometría de flujo y la obtención de valores de aumento en la fluorescencia media se realizó con FlowJo v10.0.7.2.7. Las células de inmunofluorescencia se sembraron en portaobjetos de cámara recubiertos con MG (Nunc-Labtek, Thermo Scientific, EE. UU.). Las células se fijaron con PFA al 4 % durante 15 min a temperatura ambiente y luego se permeabilizaron con Triton al 0.2 % en PBS durante 10 min. Los cultivos se bloquearon usando BSA al 1 % más Tritón al 0.2 % en PBS durante 30 min a temperatura ambiente y luego se incubaron con una solución de bloqueo de anticuerpos primarios durante 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C. Después del lavado, se añadieron los anticuerpos secundarios, se lavaron y las células se pusieron en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Después del lavado, los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 (Invitrogen, CA, EE. UU.). El análisis de epifluorescencia se realizó con un microscopio de fluorescencia con contraste de fase Olympus IX71 y las imágenes se analizaron con el software QCapture Suite (QImaging, Surry, BC, Canadá). El análisis microscópico se realizó con un microscopio confocal Nikon y las imágenes se analizaron con Image J (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EE. UU.), Los Z stacks de los cultivos 3D se obtuvieron utilizando el complemento Bioformats.

7.7 Análisis de expresión génica por RT-qPCR

El ARN total se aisló usando el reactivo TRIzol de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, CA, EE. UU.), seguido de un tratamiento con DNasa I (Invitrogen, Waltham, MA, EE. UU.) Y limpieza de ARN usando el RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania). Las reacciones de transcripción inversa se realizaron con un kit de RT-PCR de un solo paso (Qiagen). Las reacciones cuantitativas de RT-PCR (RT-qPCR) se realizaron con la mezcla maestra KAPA SYBR FAST (Roche) en un termociclador Rotor-Gene 6000 (Qiagen). El análisis de datos se realizó con el software Rotor-Gene Q series (Qiagen) y la expresión relativa se calculó con el método calibrado de eficiencia de Pfaffl (Pfaffl, 2001). Los oligos para los experimentos de PCR se enumeran en la Tabla 2 del anexo.

7.8 Análisis estadístico

Los valores se dan como media con Error estándar, y la significación estadística se realizó a partir de al menos tres réplicas biológicas independientes. Se realizó la prueba t de Student o análisis de varianza (ANOVA) para analizar dos o más grupos de medias, respectivamente, usando GraphPad Prism versión 6.04 para Windows, (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.). Se realizó la prueba post hoc de Tukey para determinar la significación estadística del ANOVA

8. Resultados

8.1 Células pluripotenciales

La Figura 4A muestra los cambios morfológicos de las células en formatos 2D y 3D en los días 0, 4, 6 y 8 de la diferenciación de hPSC impulsada exclusivamente por factores endógenos. Antes de la diferenciación, probamos la capacidad del protocolo que usamos para garantizar propiedades de Pluripotencia y expansión similares del pasaje 30 hESC e hiPSC, sembrándolos en el mismo medio como una monocapa a una densidad de 1×10^4 (2D) o como esferas 3D y cultivamos durante 5 días. El análisis de inmunofluorescencia con anticuerpos contra Tra-160, Oct4 y NANOG no mostró la pérdida de los marcadores de Pluripotencia o la aparición de marcadores de diferenciación, lo cual en esencia demostraba que no existían diferencias aparentes al inicio de la diferenciación en ambos sistemas es por esta razón que los marcadores no fueron cuantificados

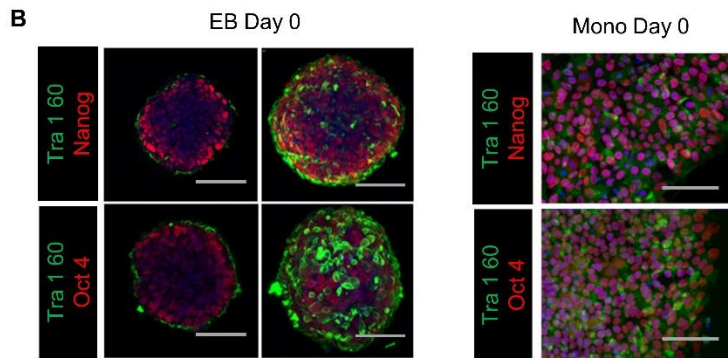
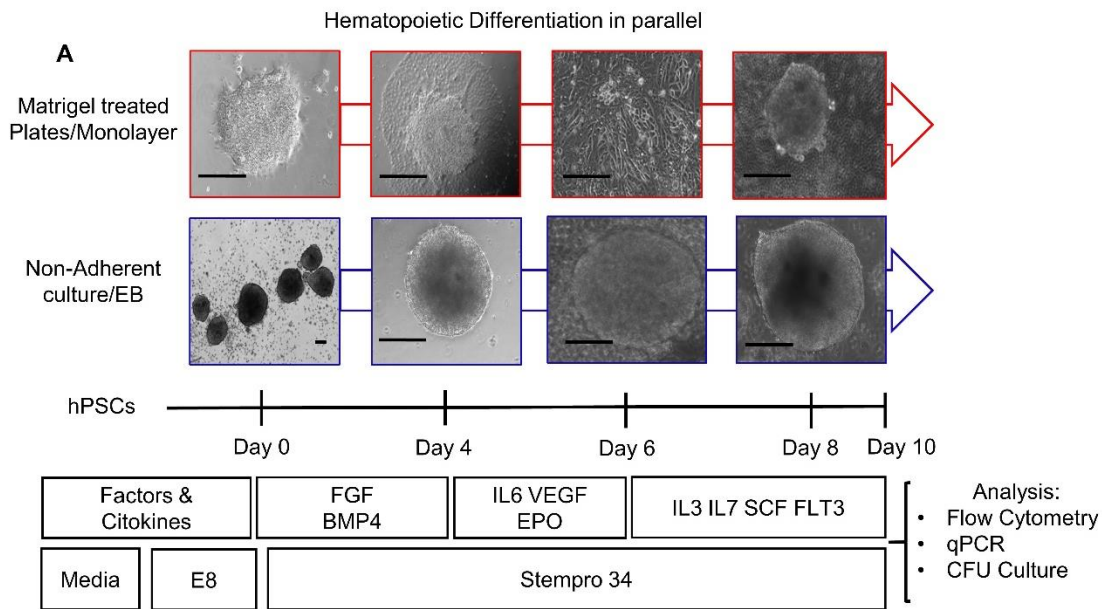


Figura 4. Comparación de la pluripotencialidad de hPSCs en sistemas de cultivo 2D/monocapa y 3D/EB. (A) Procedimiento experimental de diferenciación *in vitro* en entornos paralelos que muestran imágenes de contraste de fase representativas de las células en el día 0, día 4, día 6 y día 8. (B) Análisis de inmunofluorescencia de clones 3D/EB y sus secciones transversales, y Células 2D/monocapa, teñidas con anticuerpos contra Tra-1-60, Oct4 y NANOG. Barras de escala: EB: 100 μ m, Monocapa: 100 μ m.

8.2 Inducción del mesodermo a partir de hPSCs

Como ya se mencionó, la hematopoyesis embrionaria *in vitro*, se origina mediante la implementación de protocolos que recapitulan paso a paso, el proceso de diferenciación que inicia en el mesodermo, continua en un estadio transicional con marcadores endoteliales y culmina en una célula con potencial hematopoyético. El primer abordaje que se implementó fue el de realizar una diferenciación en monocapa, debido principalmente a la complejidad técnica que requiere la formación de esferas (3D/EB) en suspensión. Los primeros experimentos se realizaron exponiendo a colonias de hPSCs a una alta dosis de BMP4 (Sadlon, Lewis, & D'Andrea, 2004) (ver materiales y métodos) para la inducción del linaje mesodermal (Sturgeon et al., 2014), que de acuerdo a la literatura, se genera durante

los primeros cuatro días de diferenciación y se distingue por la presencia de marcadores del mesodermo lateral. Después de cuatro días, el análisis de citometría de flujo de las hPSCs en diferenciación mostró la expresión de KDR, un marcador de células de linaje endotelial derivadas del mesodermo lateral (Fig. 5A) del mismo modo se examinó a la misma población de células para la expresión del marcador CD45, un marcador de linaje hematopoyético (Fig.5A). Adicionalmente, un análisis de expresión de genes por PCR, mostro que las células expresaban Brachyury (T) un marcador distintivo del mesodermo, así como Sox17, un marcador de fenotipo endotelial (Fig. 5B). El panel C muestra fotografías en contraste de fase de una colonia de iPSC en el día 0 de diferenciación y una fotografía tomada, cuatro días después, se aprecian los cambios morfológicos en las células que indican diferenciación. Posiblemente hacia células derivadas del mesodermo en un estado de transición hacia un compromiso hematopoyético.

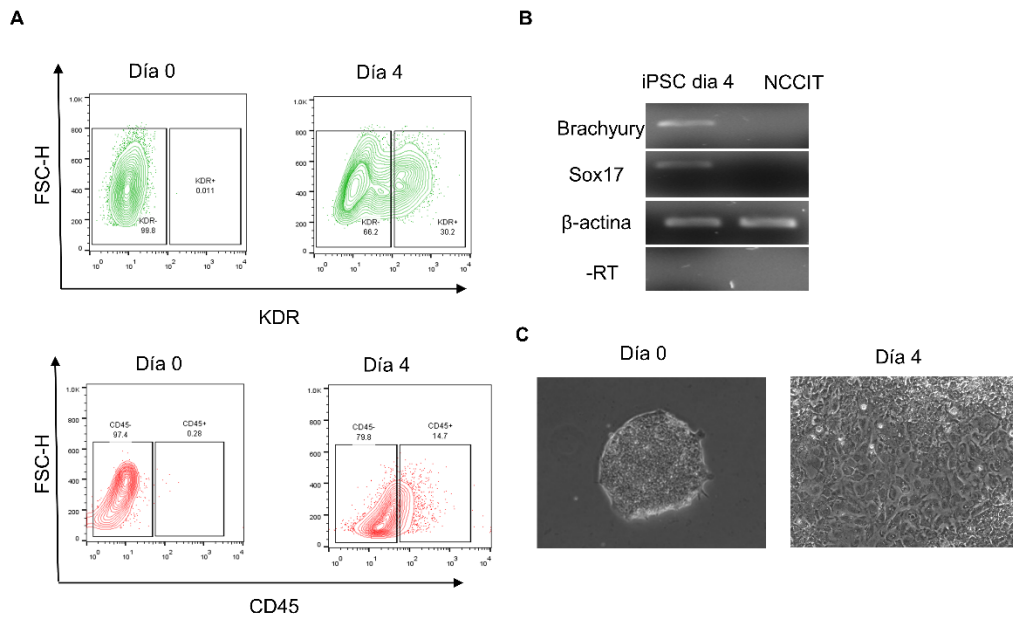


Figura 5. Inducción del mesodermo a partir de hPSCs en monocapa. A) Análisis de citometría de flujo para los marcadores KDR y CD45, en los días 0 y 4, se observa las poblaciones derivadas del mesodermo B) Análisis de expresión génica por PCR, se observa expresión de gen característico del mesodermo Brachyury C) Fotografías en contraste de fase de que muestra los cambios morfológicos de las células desde el día 0 hasta el día 4

8.3 Las condiciones de cultivo 3D/EB y 2D/monocapa difieren en su capacidad para producir células hematopoyéticas

Nuestro objetivo principal fue comparar la capacidad de estos formatos para soportar los eventos de compromiso celular durante la diferenciación de hPSC a hematopoyesis primitiva sin estimulación exógena de Wnt/ β -catenina, que previamente se ha empleado para dirigir las hPSCs a linajes hematopoyéticos definitivos (Gadue, Huber, Paddison, & Keller, 2006; Loh et al., 2016; Nostro, Cheng, Keller, & Gadue, 2008; Richter, Traver, & Willert, 2017; Sturgeon et al., 2014; Sumi, Tsuneyoshi, Nakatsuji, & Suemori, 2008). Para ello, realizamos la diferenciación simultánea en estos formatos, con el mismo ambiente de cultivo y métodos de ensayo, sin la adición de ningún estimulador exógeno de Wnt/ β -Catenina como CHIR99021. Posteriormente, nos propusimos encontrar posibles diferencias en el compromiso hematopoyético de las células en las dos condiciones de cultivo. Como

se ha mencionado (consultar las referencias en la Tabla 1), el compromiso hematopoyético temprano se puede identificar a partir del día 6 mediante la detección y cuantificación de una cohorte de células con el fenotipo CD34+/KDR+. Aunque CD43 sería adecuado para la identificación de poblaciones hematopoyéticas en estos experimentos, encontramos que la co-expresión de CD34+/KDR+ es preferible para identificar células en transición de mesodermo a fenotipos hematopoyéticos y endoteliales. Con esto en mente, medimos la cantidad de células CD34+/KDR+ mediante citometría de flujo y comparamos la cantidad de células positivas para CD34 en los dos formatos de cultivo en los días 4, 6 y 8 (Figura 6A). Se encontró un mayor número de células CD34+/KDR+ en la condición 3D/EB. Además, medimos la capacidad de formación de colonias de las células de ambos sistemas cultivadas en metil-celulosa durante 30 días (Día 6 + 24). Para este propósito, las células del día 6 se dividieron por la mitad, una de las cuales se usó para el análisis FACS y la otra mitad se usó en los experimentos de formación de colonias en metilcelulosa. (Figura 6B). Se utilizaron 200 células (n = 3) de cada uno de los formatos y se obtuvieron en promedio siete colonias (cuatro de ellas se muestran en la Figura 6). Aunque las CFU ya eran detectables a los 10-15 días, continuamos cultivando hasta 30 días (6d + 24d), las células se aislaron y luego se tiñeron con Wright y se identificaron como colonias de CFU-GM. La presencia de colonias reveló las diferencias claras entre los dos formatos de cultivo: se encontraron grupos de células redondas y refractivas en el 3D/EB mientras que los cultivos monocapa/2D no mostraron formación de colonias (Figura 6B). No se realizó la separación e identificación de más tipos de UFC, considerando que solo un tipo ya demostró una marcada diferencia entre los dos formatos. Como no hubo colonias en la condición 2D/monocapa (n = 3), no se realizó la determinación cuantitativa de las capacidades de CFU.

Los resultados del análisis de citometría descritos en la Figura 6B mostraron que solo el formato de cultivo en suspensión (3D/EB) produjo una población de células CD34+KDR+. Al analizar más a fondo este subconjunto doble positivo, encontramos que esta población celular expresa casi en su totalidad CD31 (97,5%). Esto sugirió la aparición de una población endotelial homogénea (CD34+KDR+CD31+). Simultáneamente, encontramos evidencia (panel inferior) de una población que es positiva para CD34 y positiva para CD31, pero negativa para KDR, una posible indicación de células endoteliales no hematopoyéticas, que muestra que las células hematopoyéticas y no hematopoyéticas pueden surgir simultáneamente durante este período de diferenciación. Este hallazgo se correlaciona con la formación de colonias en el 3D y la falta de colonias en el formato monocapa. La inmunofluorescencia mostró en el día 6 la coexpresión de CD34, KDR y CD43 en el formato 3D pero no en el 2D (Figura 6C). Estos resultados indicaron que el sistema 2D/monocapa fue significativamente inferior en el apoyo a la diferenciación hematopoyética, básicamente, y específicamente, en el desarrollo de células hematopoyéticas clonogénicas CD34. Además, para saber si las diferencias observadas se debieron a una diferenciación más lenta de las células 2D/monocapa, comparamos el curso temporal de la diferenciación de las células en los dos formatos en puntos de tiempo posteriores (Día 8 y Día 10) (Figura 6A). Los resultados mostraron un patrón de evolución constante en el tiempo de la generación de células CD34+ en los días 8 y 10, lo que indica que no hubo una mayor cantidad de células positivas en ningún momento durante la diferenciación de la monocapa/2D. Una vez que se observaron las diferencias anteriores entre los dos sistemas, buscamos averiguar el punto de tiempo más temprano en el que estas diferencias se hicieron evidentes. Con este fin, realizamos un análisis qRT-PCR de la

expresión de las células del día 4 de los principales marcadores de compromiso mesodérmico: Brachyury (T), BMP, KDR, receptor del factor de crecimiento derivado de placa (PDGFR) y Sox17, un marcador asociado con el linaje endodérmico. pero también conocido como un factor relacionado con la diferenciación durante la adquisición del fenotipo endotelial requerido para el establecimiento temprano del destino hematopoyético (Clarke et al., 2013; Kyba, 2013; Nakajima-Takagi et al., 2013; S. Takahashi et al., 2020). Encontramos que el mesodermo estaba fenotípicamente bien establecido en 3D/EB en el día 4; por el contrario, las células de formato 2D mostraron un compromiso reducido o nulo (Figura 5D). En particular, la expresión de Brachyury (T) fue dos veces mayor en el sistema 3D/EB que en el sistema 2D ($p \leq 0,001$). Analizamos la expresión del gen KDR, un importante marcador mesodérmico que, a diferencia del gen T, permanece activo en células que sufren compromiso hematopoyético (Nakajima-Takagi et al., 2013). En nuestros experimentos, las células de mesodermo 3D/EB mostraron una alta expresión de KDR, mientras que las células de mesodermo 2D/monocapa fueron negativas para este marcador, lo que sugiere que ninguna o muy pocas de estas células eran competentes para la hematopoyesis. PDGFR se ha utilizado para identificar el mesodermo de la placa lateral y para distinguirlo del mesodermo paraxial (Huang et al., 2009; Sakurai et al., 2006). Encontramos que el nivel de expresión del gen PDGFR por las células 3D/EB superó en más del doble su expresión por las células 2D/monocapa ($p \leq 0,001$), lo que sugiere que el sistema 2D tenía una capacidad más débil para producir mesodermo lateral. Los patrones de expresión de todos estos marcadores sugirieron que el sistema 2D/monocapa era deficiente para la adecuada inducción en las células mesodérmicas (positivas para T y KDR) del compromiso con el linaje hematopoyético (KDR), mostrando, al mismo tiempo, una fuerte selectividad para el compromiso del mesodermo lateral (PDGFR) con la hematopoyesis temprana (primitiva) (Sox 17). La Figura 3E compara la tinción de inmunofluorescencia T y KDR en el día 4. Además, de acuerdo con los resultados anteriores (Figura 6D), encontramos que el marcador mesodérmico Brachyury (T) se expresó en células de ambos formatos, pero en diferente medida. El compromiso se logró claramente en los dos sistemas. Sin embargo, dado que hubo poca o ninguna tinción con KDR en las células 2D, se puede postular que la condición 2D/monocapa podría promover un compromiso mesodérmico parcial, pero sigue siendo insuficiente para lograr la especificación hematopoyética por completo. Estos resultados sugirieron una capacidad más débil para inducir el mesodermo lateral del sistema 2D, lo que resultó en un compromiso hematopoyético disminuido.

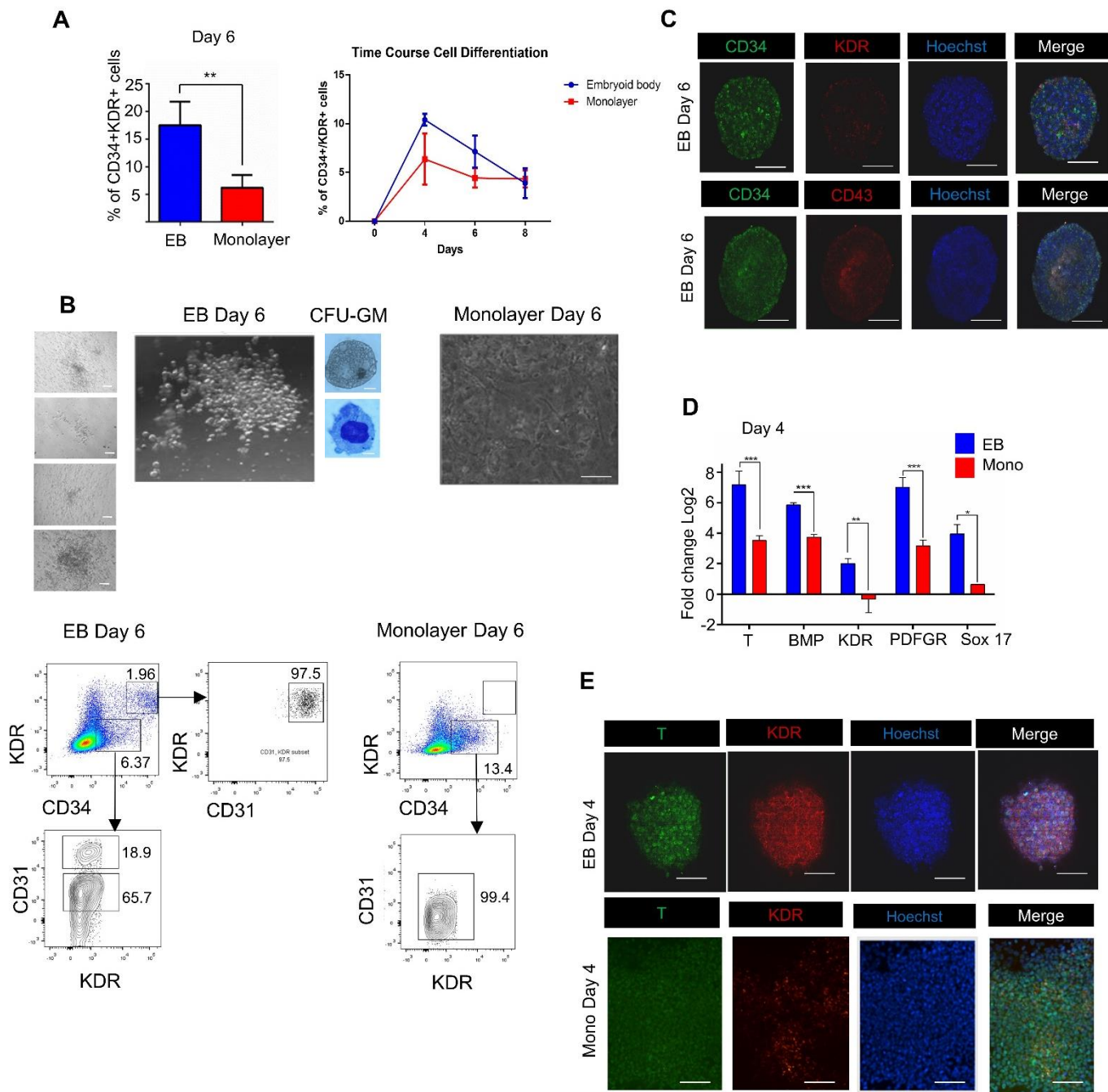


Figura 6. Los formatos de suspensión 3D/EB y 2D/monocapa difieren significativamente en su capacidad de producir células hematopoyéticas a partir de hPSC. (A) Comparación de los porcentajes de las células con fenotipo CD34+/KDR generadas por los sistemas 3D y 2D el día 6 (Media \pm SEM) $n = 4$, ** $p \leq 0,01$. Evolución temporal de las células CD34/KDR en formatos 3D y 2D (B) Imagen de contraste de fase de colonias hematopoyéticas en metilcelulosa mostrada para 3D/EB el día 30 después de la tinción de Wright (ver métodos), que muestra imágenes de un macrófago típico y un monocito. No había tales células presentes en el sistema 2D. El análisis de citometría de flujo de los rectángulos de células 3D/EB y 2D/monocapa del día 6 para la coexpresión de CD34 y KDR (sin clasificar las células CD34) indica las poblaciones de interés con la

tinción de anticuerpos. Abreviaturas: CD34: Grupo de diferenciación 34, CFU-GM: Unidad formadora de colonias Granulocito-Macrófago. (C) Inmunofluorescencia de marcadores hematopoyéticos CD34, KDR y CD43 el día 6 de las células 3D/EB; las imágenes se procesaron con Image J para obtener secciones (z-stack) de EB utilizando el complemento bioformatos (ver métodos). (D) Niveles de expresión determinados por RT-PCR cuantitativa de genes mesodérmicos en el día 4; las barras muestran los niveles de expresión de los genes en relación con el gen GAPDH; (Media \pm SEM) n = 3, * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01, *** p \leq 0,001. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes con ARN de iPS y células ES. (E) Inmunofluorescencia de marcadores mesodérmicos T y KDR el día 4 para 3D/EB y 2D/Monocapa a 20x, barra de escala: 100 μ m.

8.4 La señalización endógena de Wnt/catenina está activa en el sistema 3D/EB pero no en el sistema 2D/monocapa

Dado que el sistema de cultivo 3D/EB muestra un mayor compromiso mesodérmico y hematopoyético, buscamos las posibles causas de este fenómeno. Nuestro grupo ha informado previamente que Wnt/ β -Catenina es un regulador esencial de la reprogramación bifásica de células somáticas humanas (Cevallos et al., 2018). En particular, Wnt activa genes mesendodérmicos durante la maduración de las células hacia el estado pluripotente. Además, estudios adicionales (Galat et al., 2017; Galat et al., 2018; Sturgeon et al., 2014) estimularon mediante moléculas activadoras, la vía Wnt/Catenina, para producción de poblaciones hematopoyéticas a partir de hPSC. Los ensayos de citometría comparativa revelaron que la β -Catenina se expresó abundantemente en las células 3D/EB y no se expresó en las células 2D/monocapa (Figura 7A). En concordancia con esta mayor presencia de β -Catenina en las células 3D, la Figura 7B muestra la mayor expresión en estas células del gen *Axin2*, uno de los factores de transcripción de Wnt. La figura 7C muestra la inmunotinción de los marcadores T y β -Catenina activa, se observa que en la condición 3D ambos marcadores están presentes, sin embargo, en la condición monocapa solo T estuvo presente. Estos hallazgos sugirieron que el alto nivel de compromiso hematopoyético en las células mesodérmicas y una diferenciación más eficiente a las células CD34+ con potencial clonogénico en el formato 3D/EB podría deberse a los niveles endógenos más altos de señalización de Wnt/Catenina. De acuerdo con esta inferencia, la incapacidad del sistema 2D/monocapa para activar suficientemente la señalización endógena de Wnt/catenina podría ser una causa de su relativa ineficiencia para inducir el compromiso con el destino hematopoyético.

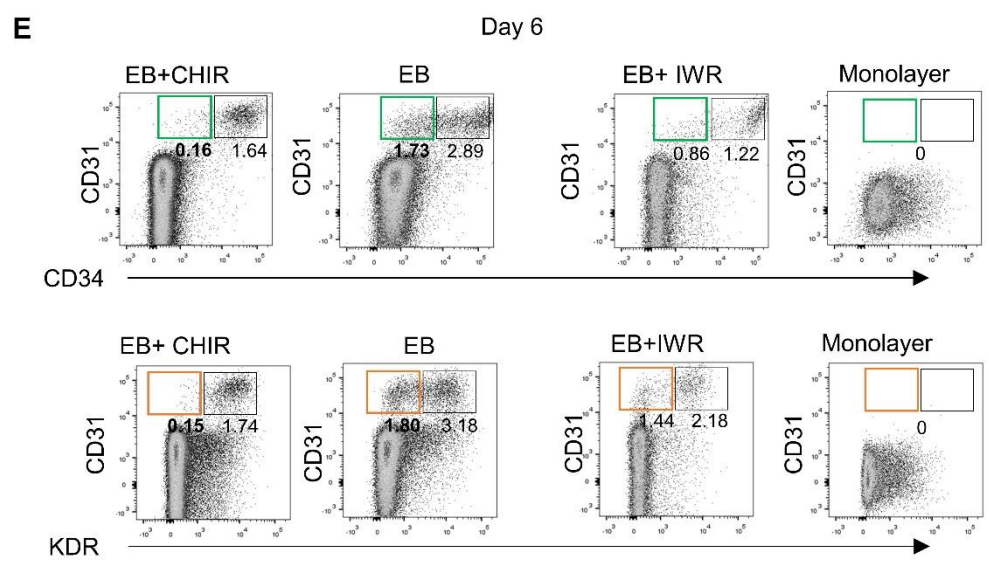
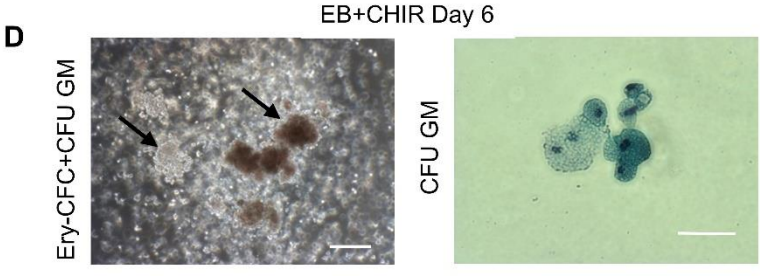
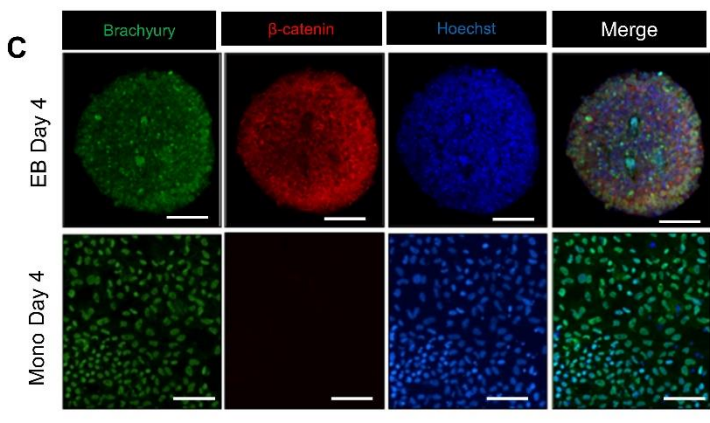
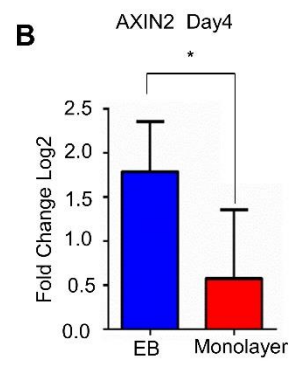
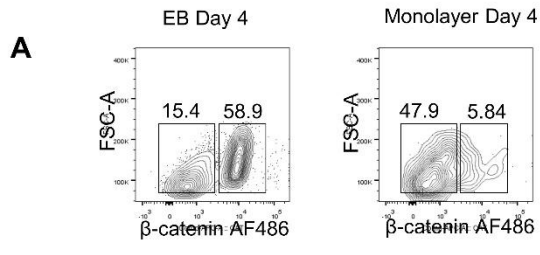


Figura 7. Actividad endógena de señalización de Wnt/ β -Catenina en células 3D/EB y 2D/monocapa en el día 4 de diferenciación de PSC. (A) Análisis de citometría de flujo representativo de las células del día 4, comparación de células positivas para β -Catenina determinadas por FACS y (B) Análisis de PCR cuantitativo de Axin2 y (C) Inmunofluorescencia de Brachyury y β -Catenina. Barras de escala: 100 μ m, (Media \pm SEM) n = 3, * p \leq 0,05. (D) Imágenes de contraste de fase de células 3D/EB+CHIR desagregadas del día 6 cultivadas en metilcelulosa; las flechas indican colonias de EryCFC y CFU-GM teñidas con Wright. (E) Análisis de citometría de flujo representativo de células 3D/EB del día 6 después del uso del activador/inhibidor de Wnt que muestra los resultados del tratamiento con CHIR o con IWR, el rectángulo verde muestra la población de interés, el componente endotelial en CD31/CD34 células, el rectángulo naranja muestra el componente endotelial en las células CD31/KDR y el rectángulo púrpura distingue el componente hematopoyético primitivo en las células CD43/CD34. Origen de las células: poblaciones CD34/KDR (D), poblaciones CD31/CD34, KDR/CD31 y CD34/CD43.

Para complementar estos datos, examinamos la capacidad de generar células con compromiso hematopoyético avanzado en las dos plataformas de cultivo; Con este fin, buscamos obtener linajes linfoides co-cultivando las células con células estromales AFT024, proporcionando un microambiente similar a la condición *in vivo* para una diferenciación hematopoyética avanzada. La Figura 8 comparan los dos formatos de cultivo con respecto a la presencia de CD56, que se asocia más estrictamente con células NK, pero ciertamente no se limita a ellas. Como se esperaba, el formato 3D produjo un mayor número de células positivas para CD56 que el formato monocapa en el día 30 de cultivo.

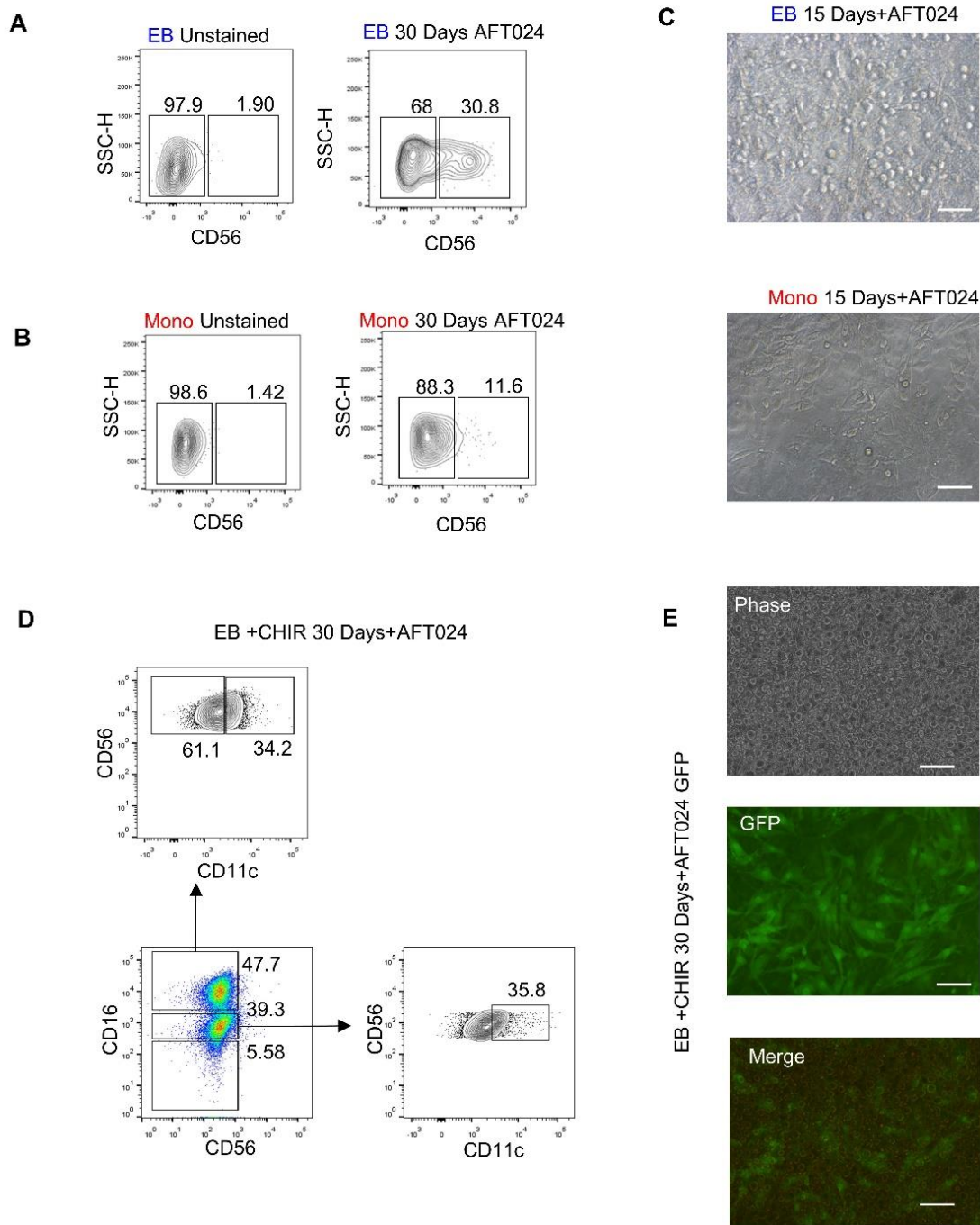


Figura 8. Potencial de diferenciación temprano en co-cultivo de hiPSCs en 3D y 2S con células AFT024. Células del día 6 después de 30 días de diferenciación en células AFT024. (A, B) Células positivas para CD56 y controles no teñidos, respectivamente. (C) Imágenes de contraste de fase de las células del día 6 desagregadas cultivadas en AFT024-GFP durante 30 días en condiciones EB y monocapa. (D) CD56 y CD11c-positivo día 6 de diferenciación en la condición 3D/EB+CHIR. (E) Imágenes de contraste de fase de células

desagregadas 3D/EB+CHIR día 6 de diferenciación cultivadas en células AFT024-GFP, en las imágenes es posible distinguir las células derivadas de hPSCs de las AFT024-GFP positivas.

Una vez que se demostró que el sistema 3D/EB proporciona una mayor actividad Wnt endógena, probamos los efectos de agregar CHIR99021, un activador de la vía Wnt, o IWR-1, un inhibidor de la vía Wnt. La justificación para esto fue observar los efectos sobre la diferenciación hematopoyética del nivel adicional (a la estimulación endógena) de Wnt/ β -Catenina inducida por CHIR99022 en las células 3D/EB (Figura 7D). Se sabe (Kang et al., 2018) que las células endoteliales (EC) se generan a partir del mesodermo durante la diferenciación de hPSC y se componen de dos subpoblaciones: endotelio no hemogénico (vascular) y hemogénico; también se sabe que la población CD34+/CD31+ es un endotelio hemogénico con potencial primitivo (Kennedy et al., 2007). Como se describió anteriormente, dividimos las células derivadas de EB+CHIR en dos porciones, una de las cuales se cultivó en CFC y la otra se sometió a FACS. Encontramos que las células 3D adquirieron una capacidad clonogénica avanzada evidenciada por la generación de colonias eritroides (CFU-E) (Figura 7D). En la Figura 4E, mostramos que la activación de Wnt por CHIR99021 la subpoblación CD31+ que estaba presente en la condición 3D/EB sin activación de Wnt. Además, la activación de la vía Wnt agotó la fracción CD31+/KDR+ que forma parte de las células del linaje hematopoyético primitivo endotelial (Figura 7E). Nuestros resultados sobre el agotamiento de estas poblaciones se correlacionan con los datos publicados (Tabla 1), lo que indica que la activación de Wnt exógena es un medio para iniciar programas hematopoyéticos primitivos y definitivos. Anteriormente, los grupos de Keller y Slukvin (ver Tabla 1) demostraron que el mesodermo da lugar a una población hematopoyética CD34+/CD43- detectable en el día 6 de la diferenciación de hPSC. Esta población expresa los marcadores de endotelio hemogénico y posee un potencial hematopoyético multi-linaje (definitivo). Por otro lado, la población CD34+/CD43+ puede representar células hematopoyéticas primitivas. Encontramos que cuando las células 3D/EB se trataron con CHIR, la fracción CD43+ estuvo ausente en los cultivos del día 6. Consideramos que nuestra condición de activación EB+CHIR Wnt agotó el fenotipo primitivo CD34+CD43+ a favor del fenotipo CD34+CD43- (potencial definitivo), en correspondencia con el hallazgo de Keller. Por el contrario, esta población se mantuvo estable en cultivos 3D/EB sin tratar. En conjunto, estos resultados respaldan aún más la noción de la mayor capacidad de la condición 3D/EB para imitar los eventos embrionarios tempranos (ola primitiva de hematopoyesis) durante la diferenciación in vitro (Figura 7E). Por el contrario, los niveles de expresión de los marcadores CD34, CD31, KDR y CD43 fueron bajos en las células EB+IWR, proporcionando una confirmación adicional de que la 2D/monocapa es por sí sola insuficiente para generar células hematopoyéticas (Figura 7D, E).

9. Discusión

En estudios previos (Huang et al., 2009) (Vease tabla 1) con el formato de cultivo 3D / EB, se demostró que en presencia de los factores de crecimiento, citocinas específicas y otros ingredientes, hPSCs, expuestas a dosis adecuadas de BMP4, se comprometieron a través de la activación de los genes T (Brachyury) y KDR, al mesodermo, luego a través del endotelio hemogénico a las células hemangioblásticas bipotenciales hematopoyéticas primitivas transitorias capaces de diferenciarse en células hematopoyéticas y endoteliales.

Por otro lado, en experimentos independientes que utilizan el formato 2D, las hPSC requieren estimulación exógena de la señalización de Wnt para la generación de poblaciones hematopoyéticas definitivas. La contribución específica de cada uno de estos dos formatos es difícil de evaluar en experimentos independientes, porque las distinciones en los factores del microambiente, las diferentes condiciones de ensayo y las diferencias en la interpretación de los resultados podrían oscurecer sus efectos en los procesos hematopoyéticos *in vitro*. Este estudio compara los potenciales de estos dos formatos para apoyar la diferenciación hematopoyética de hPSCs en el mismo escenario experimental sin estimulación exógena de la señalización de Wnt. Nuestros resultados describen en detalle cómo cada formato apoya la diferenciación hematopoyética, comenzando desde la formación del mesodermo y el compromiso con las etapas posteriores hasta la etapa de clonogenicidad.

A nuestro entender, este es el primer estudio de este tipo cuyos resultados contribuyen a la estimación del potencial de la maquinaria endógena para realizar el programa de diferenciación en dos entornos experimentales, y permite utilizar estos resultados en la conceptualización de la hematopoyesis *in vitro*. Nuestros resultados apoyan la opinión de que el sistema 3D / EB imita de manera eficiente los eventos embrionarios *in vivo*. Además, nuestros resultados proporcionan una explicación tentativa de la mayor capacidad del sistema 3D / EB, al mostrar que la señalización endógena de Wnt / catenina es más activa en este formato el día 4 (Cevallos et al., 2018; Galat et al., 2018; Ohta et al., 2016). La novedad de nuestros hallazgos es la demostración de la importancia de la activación adecuada de la señalización endógena de Wnt por BMP en el formato 3D requerido para la formación robusta del mesodermo a través de la activación de los genes que codifican T y KDR, lo que determina un compromiso exitoso del endotelio hemogénico y consecutivamente precursores de las células hematopoyéticas CD34 clonogénicas. En contraste, el sistema 2D / monocapa muestra un nivel considerablemente más bajo de Wnt / catenina endógena (Fig. 7) y, por lo tanto, un número menor de células CD34 hematopoyéticas que carecen de capacidad clonogénica. De acuerdo con los resultados de esta comparación, se puede plantear la hipótesis de que la deficiencia del sistema 2D / monocapa resulta de su incapacidad para responder adecuadamente a BMP4 para una formación completa del mesodermo. Para compensar este potencial débil, se practica la estimulación exógena de la señalización de Wnt, pero esto dirige la diferenciación hacia el destino hematopoyético definitivo. Significativamente, estas deficiencias del formato 2D reflejan la imposibilidad de dicho formato para modelar el desarrollo embrionario único *in vivo* similar al 3D. Mientras tanto, el formato 2D es capaz de servir como plataforma biotecnológica para la producción de células hematopoyéticas útiles para fines terapéuticos, en las que solo pueden operar factores autónomos de células, dejando en estado inactivo los reguladores integradores de los mecanismos de desarrollo.

10. Conclusiones

Este estudio representa una comparación en paralelo de la diferenciación hematopoyética temprana en condiciones 2D y 3D

Se comparó la liberación del potencial hematopoyético de las hPSC en los dos sistemas de cultivo en función de la productividad de CD34.

La condición 3D promueve condiciones adecuadas para la generación de células con una identidad hematopoyética temprana.

La condición 3D genera células CD34 con actividad clonogénica, no así el formato 2D, el cual no genera las condiciones adecuadas para la generación de células hematopoyéticas.

La activación endógena de la vía de Wnt en el formato 3D es la posible causa de la diferencia en la producción de células CD34 en ambas condiciones de cultivo.

Perspectivas y Limitaciones.

De manera prospectiva, esta capacidad del formato 3D / EB para modelar adecuadamente la condición de nicho 3D para la hematopoyesis primitiva también puede ayudar a explicar las anomalías causadas por mutaciones en los genes KDR y GATA2, proponiendo así un sistema *in vitro* adecuado para la prueba de fármacos (Jung et al., 2018; Kang et al., 2018; Oszajca et al., 2018).

Estudios similares a los realizados por Daley (Nishizawa et al., 2016), han evidenciado las limitantes que tienen las células hematopoyéticas derivadas de hPSCs para generar linajes linfoides maduros, pues al carecer de un nicho adecuado, que solo la médula ósea puede proveer, la aparición de linajes linfoides está limitada a estímulos externos que aumentan las variables en la producción de células y posible uso para terapia, pues aún se depende en gran medida del co-cultivo con células de ratón para la maduración de progenitores hacia linajes linfoides como T y B. Del mismo modo, el injerto de estas células ha probado no ser exitoso en modelos murinos, principalmente debido a que la identidad de estas células o no es equivalente a la población CD34+lin- correspondiente a la médula ósea del adulto, se presume que se trata de poblaciones con una identidad propia correspondiente a los estadios embrionarios que dan origen a las primeras olas de la hematopoyesis durante la generación simultánea de los endotelios embrionarios.

Una de las principales limitaciones para este tipo de estudios es la ausencia de marcadores adecuados que definan de manera específica la hematopoyesis primitiva, particularmente en el ser humano. En particular, para enriquecer y continuar con el presente trabajo, sería adecuado realizar una evaluación funcional de la capacidad nata de las células hematopoyéticas derivadas de las hPSCs a través de ensayos de colonias para evaluar el espectro hematopoyético completo, o bien estudios de respuesta inmune *in vivo* o *in vitro*.

11. Bibliografía

- Abecasis, B., Aguiar, T., Arnault, É., Costa, R., Gomes-Alves, P., Aspegren, A., . . . Alves, P. M. (2017). Expansion of 3D human induced pluripotent stem cell aggregates in bioreactors: Bioprocess intensification and scaling-up approaches. *J Biotechnol*, *246*, 81-93. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.01.004
- Balandrán, J. C., & Pelayo, R. (2016). [B lymphocyte ontogeny]. *Rev Alerg Mex*, *63*(1), 71-79. doi: 10.29262/ram.v63i1.141
- Bertrand, J. Y., Chi, N. C., Santoso, B., Teng, S., Stainier, D. Y., & Traver, D. (2010). Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. *Nature*, *464*(7285), 108-111. doi: 10.1038/nature08738
- Boieri, M., Shah, P., Dressel, R., & Inngjerdigen, M. (2016). The Role of Animal Models in the Study of Hematopoietic Stem Cell Transplantation and GvHD: A Historical Overview. *Frontiers in immunology*, *7*, 333-333. doi: 10.3389/fimmu.2016.00333
- Boisset, J.-C., van Cappellen, W., Andrieu-Soler, C., Galjart, N., Dzierzak, E., & Robin, C. (2010). In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature*, *464*(7285), 116-120. doi: 10.1038/nature08764
- Carey, B. W., Markoulaki, S., Hanna, J., Saha, K., Gao, Q., Mitalipova, M., & Jaenisch, R. (2009). Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(1), 157-162. doi: 10.1073/pnas.0811426106
- Cevallos, R. R., Rodríguez-Martínez, G., & Gazarian, K. (2018). Wnt/ β -Catenin/TCF Pathway Is a Phase-Dependent Promoter of Colony Formation and Mesendodermal Differentiation During Human Somatic Cell Reprogramming. *STEM CELLS*, *36*(5), 683-695. doi: 10.1002/stem.2788
- Clarke, R. L., Yzaguirre, A. D., Yashiro-Ohtani, Y., Bondue, A., Blanpain, C., Pear, W. S., . . . Keller, G. (2013). The expression of Sox17 identifies and regulates haemogenic endothelium. *Nature Cell Biology*, *15*(5), 502-510. doi: 10.1038/ncb2724
- Crisan, M., Kartalaei, P. S., Vink, C. S., Yamada-Inagawa, T., Bollerot, K., van Ijcken, W., . . . Dzierzak, E. (2015). BMP signalling differentially regulates distinct haematopoietic stem cell types. *Nature Communications*, *6*(1), 8040. doi: 10.1038/ncomms9040
- Choi, K.D., Vodyanik, M. A., & Slukvin, I. I. (2009). Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived lin-CD34+CD43+CD45+ progenitors. *The Journal of clinical investigation*, *119*(9), 2818-2829. doi: 10.1172/JCI38591
- Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J. C., & Keller, G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*, *125*(4), 725-732.
- D'Alessio, A. C., Fan, Z. P., Wert, K. J., Baranov, P., Cohen, M. A., Saini, J. S., . . . Young, R. A. (2015). A Systematic Approach to Identify Candidate Transcription Factors that Control Cell Identity. *Stem Cell Reports*, *5*(5), 763-775. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.09.016
- D'Souza, S. S., Maufort, J., Kumar, A., Zhang, J., Smuga-Otto, K., Thomson, J. A., & Slukvin, I. I. (2016). GSK3 β Inhibition Promotes Efficient Myeloid and Lymphoid Hematopoiesis from Non-human Primate-Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, *6*(2), 243-256. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.12.010
- de Bruijn, M. (2014). The hemangioblast revisited. *Blood*, *124*(16), 2472-2473. doi: 10.1182/blood-2014-09-597674

- Demirci, S., Haro-Mora, J. J., Leonard, A., Drysdale, C., Malide, D., Keyvanfar, K., . . . Uchida, N. (2020). Definitive hematopoietic stem/progenitor cells from human embryonic stem cells through serum/feeder-free organoid-induced differentiation. *Stem Cell Research & Therapy*, *11*(1), 493-493. doi: 10.1186/s13287-020-02019-5
- Eilken, H. M., Nishikawa, S.-I., & Schroeder, T. (2009). Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium. *Nature*, *457*(7231), 896-900. doi: 10.1038/nature07760
- Fong, A. H., Romero-López, M., Heylman, C. M., Keating, M., Tran, D., Sobrino, A., . . . Hughes, C. C. W. (2016). Three-Dimensional Adult Cardiac Extracellular Matrix Promotes Maturation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Tissue engineering. Part A*, *22*(15-16), 1016-1025. doi: 10.1089/ten.TEA.2016.0027
- Frame, J. M., Fegan, K. H., Conway, S. J., McGrath, K. E., & Palis, J. (2016). Definitive Hematopoiesis in the Yolk Sac Emerges from Wnt-Responsive Hemogenic Endothelium Independently of Circulation and Arterial Identity. *STEM CELLS*, *34*(2), 431-444. doi: 10.1002/stem.2213
- Fraser, S. T., Ogawa, M., Yu, R. T., Nishikawa, S., Yoder, M. C., & Nishikawa, S. (2002). Definitive hematopoietic commitment within the embryonic vascular endothelial-cadherin(+) population. *Exp Hematol*, *30*(9), 1070-1078. doi: 10.1016/s0301-472x(02)00887-1
- Gadue, P., Huber, T. L., Paddison, P. J., & Keller, G. M. (2006). Wnt and TGF-beta signaling are required for the induction of an in vitro model of primitive streak formation using embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(45), 16806-16811. doi: 10.1073/pnas.0603916103
- Galat, Y., Dambaeva, S., Elcheva, I., Khanolkar, A., Beaman, K., Iannaccone, P. M., & Galat, V. (2017). Cytokine-free directed differentiation of human pluripotent stem cells efficiently produces hemogenic endothelium with lymphoid potential. *Stem Cell Research & Therapy*, *8*(1), 67. doi: 10.1186/s13287-017-0519-0
- Galat, Y., Elcheva, I., Dambaeva, S., Katukurundage, D., Beaman, K., Iannaccone, P. M., & Galat, V. (2018). Application of small molecule CHIR99021 leads to the loss of hemangioblast progenitor and increased hematopoiesis of human pluripotent stem cells. *Experimental Hematology*, *65*, 38-48.e31. doi: https://doi.org/10.1016/j.exphem.2018.05.007
- Gao, X., Xu, C., Asada, N., & Frenette, P. S. (2018). The hematopoietic stem cell niche: from embryo to adult. *145*(2). doi: 10.1242/dev.139691
- Hamad, S., Derichsweiler, D., Papadopoulos, S., Nguemo, F., Šarić, T., Sachinidis, A., . . . Pfannkuche, K. (2019). Generation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in 2D monolayer and scalable 3D suspension bioreactor cultures with reduced batch-to-batch variations. *Theranostics*, *9*(24), 7222-7238. doi: 10.7150/thno.32058
- Haraguchi, Y., Matsuura, K., Shimizu, T., Yamato, M., & Okano, T. (2015). Simple suspension culture system of human iPS cells maintaining their pluripotency for cardiac cell sheet engineering. *J Tissue Eng Regen Med*, *9*(12), 1363-1375. doi: 10.1002/term.1761
- Huang, S., Wang, J., Liu, S., Li, Y., Hu, J., Kou, Z., . . . Gao, S. (2009). Differentiation of reprogrammed somatic cells into functional hematopoietic cells. *Differentiation*, *78*(2), 151-158. doi: https://doi.org/10.1016/j.diff.2009.06.006
- Huber, T. L., Kouskoff, V., Fehling, H. J., Palis, J., & Keller, G. (2004). Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature*, *432*(7017), 625-630. doi: 10.1038/nature03122
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., . . . Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med*, *6*(2), 88-95.

- Jackson, T. R., Ling, R. E., & Roy, A. (2021). The Origin of B-cells: Human Fetal B Cell Development and Implications for the Pathogenesis of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front Immunol*, *12*, 637975. doi: 10.3389/fimmu.2021.637975
- Jaffredo, T., Gautier, R., Eichmann, A., & Dieterlen-Lièvre, F. (1998). Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development*, *125*(22), 4575-4583. doi: 10.1242/dev.125.22.4575
- Jezirowska, D., Fontaine, V., Jouve, C., Villard, E., Dussaud, S., Akbar, D., . . . Hulot, J. S. (2017). Differential Sarcomere and Electrophysiological Maturation of Human iPSC-Derived Cardiac Myocytes in Monolayer vs. Aggregation-Based Differentiation Protocols. *International journal of molecular sciences*, *18*(6). doi: 10.3390/ijms18061173
- Jing, L., & Zon, L. I. (2011). Zebrafish as a model for normal and malignant hematopoiesis. *Dis Model Mech*, *4*(4), 433-438. doi: 10.1242/dmm.006791
- Jung, M., Cordes, S., Zou, J., Yu, S. J., Guitart, X., Hong, S. G., . . . Winkler, T. (2018). GATA2 deficiency and human hematopoietic development modeled using induced pluripotent stem cells. *Blood advances*, *2*(23), 3553-3565. doi: 10.1182/bloodadvances.2018017137
- Kang, H., Mesquitta, W.-T., Jung, H. S., Moskvina, O. V., Thomson, J. A., & Slukvin, I. I. (2018). GATA2 Is Dispensable for Specification of Hemogenic Endothelium but Promotes Endothelial-to-Hematopoietic Transition. *Stem Cell Reports*, *11*(1), 197-211. doi: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.05.002>
- Kaufman Dan, S., Hanson Eric, T., Lewis Rachel, L., Auerbach, R., & Thomson James, A. (2001). Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(19), 10716-10721. doi: 10.1073/pnas.191362598
- Kaushik, G., Ponnusamy, M. P., & Batra, S. K. (2018). Concise Review: Current Status of Three-Dimensional Organoids as Preclinical Models. *STEM CELLS*, *36*(9), 1329-1340. doi: 10.1002/stem.2852
- Keller, G., Kennedy, M., Papayannopoulou, T., & Wiles, M. V. (1993). Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Molecular and cellular biology*, *13*(1), 473-486. doi: 10.1128/mcb.13.1.473
- Kennedy, M., D'Souza, S. L., Lynch-Kattman, M., Schwantz, S., & Keller, G. (2007). Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood*, *109*(7), 2679-2687. doi: 10.1182/blood-2006-09-047704
- Kissa, K., & Herbomel, P. (2010). Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature*, *464*(7285), 112-115. doi: 10.1038/nature08761
- Knorr, D. A., Ni, Z., Hermanson, D., Hexum, M. K., Bendzick, L., Cooper, L. J. N., . . . Kaufman, D. S. (2013). Clinical-scale derivation of natural killer cells from human pluripotent stem cells for cancer therapy. *Stem cells translational medicine*, *2*(4), 274-283. doi: 10.5966/sctm.2012-0084
- Kyba, M. (2013). Hemogenic endothelium in a dish. *Blood*, *121*(3), 417-418. doi: 10.1182/blood-2012-12-469940
- Lacaud, G., & Kouskoff, V. (2017). Hemangioblast, hemogenic endothelium, and primitive versus definitive hematopoiesis. *Experimental Hematology*, *49*, 19-24. doi: 10.1016/j.exphem.2016.12.009
- Lampreia, F. P., Carmelo, J. G., & Anjos-Afonso, F. (2017). Notch Signaling in the Regulation of Hematopoietic Stem Cell. *Curr Stem Cell Rep*, *3*(3), 202-209. doi: 10.1007/s40778-017-0090-8

- Lancrin, C., Sroczynska, P., Stephenson, C., Allen, T., Kouskoff, V., & Lacaud, G. (2009). The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature*, *457*(7231), 892-895. doi: 10.1038/nature07679
- Lewis, K., Yoshimoto, M., & Takebe, T. (2021). Fetal liver hematopoiesis: from development to delivery. *Stem Cell Research & Therapy*, *12*(1), 139. doi: 10.1186/s13287-021-02189-w
- Li, W., Ferkowicz, M. J., Johnson, S. A., Shelley, W. C., & Yoder, M. C. (2005). Endothelial cells in the early murine yolk sac give rise to CD41-expressing hematopoietic cells. *Stem Cells Dev*, *14*(1), 44-54. doi: 10.1089/scd.2005.14.44
- Lim, S. T., Chew, S. H., Ebstein, R. P., Sakuntabhai, A., Park, K. H., Ahn, J., . . . Ritch, R. Loh, K. M., Chen, A., Koh, P. W., Deng, T. Z., Sinha, R., Tsai, J. M., . . . Weissman, I. L. (2016). Mapping the Pairwise Choices Leading from Pluripotency to Human Bone, Heart, and Other Mesoderm Cell Types. *Cell*, *166*(2), 451-467. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.011
- Mills, J. A., Paluru, P., Weiss, M. J., Gadue, P., & French, D. L. (2014). Hematopoietic differentiation of pluripotent stem cells in culture. *Methods Mol Biol*, *1185*, 181-194. doi: 10.1007/978-1-4939-1133-2_12
- Mora-Roldan, G. A., Ramirez-Ramirez, D., Pelayo, R., & Gazarian, K. (2021). Assessment of the Hematopoietic Differentiation Potential of Human Pluripotent Stem Cells in 2D and 3D Culture Systems. *Cells*, *10*(11). doi: 10.3390/cells10112858
- Moretta, F., Petronelli, F., Lucarelli, B., Pitisci, A., Bertaina, A., Locatelli, F., . . . Montaldo, E. (2016). The generation of human innate lymphoid cells is influenced by the source of hematopoietic stem cells and by the use of G-CSF. *European Journal of Immunology*, *46*(5), 1271-1278. doi: <https://doi.org/10.1002/eji.201546079>
- Morgan, R. A., Gray, D., Lomova, A., & Kohn, D. B. (2017). Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy: Progress and Lessons Learned. *Cell Stem Cell*, *21*(5), 574-590. doi: 10.1016/j.stem.2017.10.010
- Najm, F. J., Lager, A. M., Zaremba, A., Wyatt, K., Caprariello, A. V., Factor, D. C., . . . Tesar, P. J. (2013). Transcription factor-mediated reprogramming of fibroblasts to expandable, myelinogenic oligodendrocyte progenitor cells. *Nat Biotechnol*, *31*(5), 426-433. doi: 10.1038/nbt.2561
- Nakajima-Takagi, Y., Osawa, M., Oshima, M., Takagi, H., Miyagi, S., Endoh, M., . . . Iwama, A. (2013). Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. *Blood*, *121*(3), 447-458. doi: 10.1182/blood-2012-05-431403
- Nii, T., Makino, K., & Tabata, Y. (2020). Three-Dimensional Culture System of Cancer Cells Combined with Biomaterials for Drug Screening. *12*(10). doi: 10.3390/cancers12102754
- Nishizawa, M., Chonabayashi, K., Nomura, M., Tanaka, A., Nakamura, M., Inagaki, A., . . . Yoshida, Y. (2016). Epigenetic Variation between Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines Is an Indicator of Differentiation Capacity. *Cell Stem Cell*, *19*(3), 341-354. doi: 10.1016/j.stem.2016.06.019
- Niwa, A., Heike, T., Umeda, K., Oshima, K., Kato, I., Sakai, H., . . . Saito, M. K. (2011). A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS One*, *6*(7), e22261. doi: 10.1371/journal.pone.0022261
- Niwa, A., Umeda, K., Chang, H., Saito, M., Okita, K., Takahashi, K., . . . Heike, T. (2009). Orderly hematopoietic development of induced pluripotent stem cells via Flk-1(+) hemoangiogenic progenitors. *J Cell Physiol*, *221*(2), 367-377. doi: 10.1002/jcp.21864
- Nostro, M. C., Cheng, X., Keller, G. M., & Gadue, P. (2008). Wnt, activin, and BMP signaling regulate distinct stages in the developmental pathway from embryonic stem cells to blood. *Cell Stem Cell*, *2*(1), 60-71. doi: 10.1016/j.stem.2007.10.011

- Ohta, R., Niwa, A., Taniguchi, Y., Suzuki, N. M., Toga, J., Yagi, E., . . . Saito, M. K. (2016). Laminin-guided highly efficient endothelial commitment from human pluripotent stem cells. *Scientific Reports*, *6*(1), 35680. doi: 10.1038/srep35680
- Oszajca, K., Szemraj, J., Wyrzykowski, D., Chrzanowska, B., Salamon, A., & Przewratil, P. (2018). Single-nucleotide polymorphisms of VEGF-A and VEGFR-2 genes and risk of infantile hemangioma. *International Journal of Dermatology*, *57*. doi: 10.1111/ijd.14127
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, *29*(9), e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
- Rackham, O. J., Firas, J., Fang, H., & Oates, M. E. (2016). A predictive computational framework for direct reprogramming between human cell types. *48*(3), 331-335. doi: 10.1038/ng.3487
- Ramirez-Ramirez, D., & Vadillo, E. (2016). Early Differentiation of Human CD11c(+)NK Cells with gammadelta T Cell Activation Properties Is Promoted by Dialyzable Leukocyte Extracts. *2016*, 4097642.
- Richter, J., Traver, D., & Willert, K. (2017). The role of Wnt signaling in hematopoietic stem cell development. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, *52*(4), 414-424. doi: 10.1080/10409238.2017.1325828
- Ruiz, J. P., Chen, G., Haro Mora, J. J., Keyvanfar, K., Liu, C., Zou, J., . . . Larochelle, A. (2019). Robust generation of erythroid and multilineage hematopoietic progenitors from human iPSCs using a scalable monolayer culture system. *Stem Cell Res*, *41*, 101600. doi: 10.1016/j.scr.2019.101600
- Sabin, F. R. (1920). Studies on the origin of blood vessels and of red corpuscles as seen in the living blastoderm of the chick during the second day of incubation. *Contributions to Embryology*, *9*, 213-262.
- Sacchetto, C., Vitiello, L., de Windt, L. J., Rampazzo, A., & Calore, M. (2020). Modeling Cardiovascular Diseases with hiPSC-Derived Cardiomyocytes in 2D and 3D Cultures. *International journal of molecular sciences*, *21*(9), 3404. doi: 10.3390/ijms21093404
- Sadlon, T. J., Lewis, I. D., & D'Andrea, R. J. (2004). BMP4: its role in development of the hematopoietic system and potential as a hematopoietic growth factor. *STEM CELLS*, *22*(4), 457-474. doi: 10.1634/stemcells.22-4-457
- Sakurai, H., Era, T., Jakt, L. M., Okada, M., Nakai, S., Nishikawa, S., & Nishikawa, S. (2006). In vitro modeling of paraxial and lateral mesoderm differentiation reveals early reversibility. *STEM CELLS*, *24*(3), 575-586. doi: 10.1634/stemcells.2005-0256
- Slukvin, I. (2013). Deciphering the hierarchy of angiohematopoietic progenitors from human pluripotent stem cells. *Cell Cycle*, *12*(5), 720-727. doi: 10.4161/cc.23823
- Snoeck, H. W. (2013). Aging of the hematopoietic system. *Curr Opin Hematol*, *20*(4), 355-361. doi: 10.1097/MOH.0b013e3283623c77
- Steensma, D. P., & Kyle, R. A. (2021). James Till and Ernest McCulloch: Hematopoietic Stem Cell Discoverers. *Mayo Clin Proc*, *96*(3), 830-831. doi: 10.1016/j.mayocp.2021.01.016
- Sturgeon, C. M., Ditadi, A., Awong, G., Kennedy, M., & Keller, G. (2014). Wnt signaling controls the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, *32*(6), 554-561. doi: 10.1038/nbt.2915
- Sturgeon, C. M., Ditadi, A., Clarke, R. L., & Keller, G. (2013). Defining the path to hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol*, *31*(5), 416-418. doi: 10.1038/nbt.2571
- Sugimura, R., Jha, D. K., Han, A., Soria-Valles, C., da Rocha, E. L., Lu, Y.-F., . . . Daley, G. Q. (2017). Haematopoietic stem and progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Nature*, *545*(7655), 432-438. doi: 10.1038/nature22370
- Sumi, T., Tsuneyoshi, N., Nakatsuji, N., & Suemori, H. (2008). Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/beta-catenin,

- Activin/Nodal and BMP signaling. *Development*, 135(17), 2969-2979. doi: 10.1242/dev.021121
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861-872. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
- Takahashi, S., Nobuhisa, I., Saito, K., Gerel, M., Itabashi, A., Harada, K., . . . Taga, T. (2020). Sox17-mediated expression of adherent molecules is required for the maintenance of undifferentiated hematopoietic cluster formation in midgestation mouse embryos. *Differentiation*, 115, 53-61. doi: <https://doi.org/10.1016/j.diff.2020.08.001>
- Thomson James, A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro Sander, S., Waknitz Michelle, A., Swiergiel Jennifer, J., Marshall Vivienne, S., & Jones Jeffrey, M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145-1147. doi: 10.1126/science.282.5391.1145
- Tian, X. F., Heng, B. C., Ge, Z., Lu, K., Rufaihah, A. J., Fan, V. T., . . . Cao, T. (2008). Comparison of osteogenesis of human embryonic stem cells within 2D and 3D culture systems. *Scand J Clin Lab Invest*, 68(1), 58-67. doi: 10.1080/00365510701466416
- Ulloa, B. A., Habbsa, S. S., Potts, K. S., Lewis, A., McKinstry, M., Payne, S. G., . . . Bowman, T. V. (2021). Definitive hematopoietic stem cells minimally contribute to embryonic hematopoiesis. *Cell Reports*, 36(11), 109703. doi: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109703>
- Umeda, K., Heike, T., Yoshimoto, M., Shiota, M., Suemori, H., Luo, H. Y., . . . Nakahata, T. (2004). Development of primitive and definitive hematopoiesis from nonhuman primate embryonic stem cells in vitro. *Development*, 131(8), 1869-1879. doi: 10.1242/dev.01065
- Vink, C. S., Mariani, S. A., & Dzierzak, E. (2022). Embryonic Origins of the Hematopoietic System: Hierarchies and Heterogeneity. *HemaSphere*, 6(6), e737-e737. doi: 10.1097/HS9.0000000000000737
- Vodyanik, M. A., Thomson, J. A., & Slukvin, I. I. (2006). Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures. *Blood*, 108(6), 2095-2105. doi: 10.1182/blood-2006-02-003327
- Yanagimachi, M. D., Niwa, A., Tanaka, T., Honda-Ozaki, F., Nishimoto, S., Murata, Y., . . . Saito, M. K. (2013). Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell-free conditions. *PLoS One*, 8(4), e59243. doi: 10.1371/journal.pone.0059243
- Yoder, M. C. (2014). Inducing definitive hematopoiesis in a dish. *Nat Biotechnol*, 32(6), 539-541. doi: 10.1038/nbt.2929
- Zhang, Y., Gao, S., Xia, J., & Liu, F. (2018). Hematopoietic Hierarchy – An Updated Roadmap. *Trends in Cell Biology*, 28(12), 976-986. doi: 10.1016/j.tcb.2018.06.001
- Zhu, Y., Wang, T., Gu, J., Huang, K., Zhang, T., Zhang, Z., . . . Pan, G. (2020). Characterization and generation of human definitive multipotent hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Discovery*, 6(1), 89. doi: 10.1038/s41421-020-00213-6
- Zovein, A. C., Hofmann, J. J., Lynch, M., French, W. J., Turlo, K. A., Yang, Y., . . . Iruela-Arispe, M. L. (2008). Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 3(6), 625-636. doi: 10.1016/j.stem.2008.09.018

12. Apendice

Tabla A1. Lista de anticuerpos utilizados para citometría de flujo e inmunofluorescencia

Antigeno	Marca/Catalogo
Oct3/4	Cellsignaling#2750
Nanog	Cellsignaling# 4903S
Tra1-60 PE	Stemgent Code: 09-0010
CD 34 APC	Biologend 343608
CD31 PE/Cy7	Biologend 102418
CD43 PE	Miltenyi Biotech 130-100-094
CD235a FITC	Miltenyi Biotech 130-117-800
CD309 (KDR)-PE	Miltenyi Biotech 130-120-620
Brachyury-FITC	Millipore FCMA302F
β -Catenin-	Biologend 844601
AF-647	Abcam ab150115
Anti-Rabbit IgG Alexa488	Invitrogen Catalog # A27034
Anti-Rabbit IgG Alexa594	Invitrogen Cat # A32740
Anti-Mouse IgG+IgM Alexa488	Invitrogen Cat # A32723

Tabla A2. Primers utilizados para la evaluación de marcadores mesodérmicos por qPCR, mostrando nombre del gen, número de acceso y secuencias utilizadas.

Gen	Numero de Secuencia Genbank	Primers
KDR f	NM_002244	GGCCAATAATCAGAGTGGCA
KDR r		CCAGTGTCAATTTCCGATCACTTT
PDGFRa f	NM_006206	TGGCAGTACCCCATGTCTGAA
PDGFRa r		CCAAGACCGTCACAAAAAGGC
Brachyury f	NM_003181	TATGAGCCTCGAATCCACATAGT
Brachyury r		CCTCGTTCTGATAAGCAGTCAC
Sox17 f	NM_022454	GTGGACCGCACGGAATTTG
Sox17 r		GGAGATTCACACCGGAGTCA
BMP4 f	NM_001202	ATGATTCCTGGTAACCGAATGC
BMP4 r		CCCCGTCTCAGGTATCAAACCT
Axin2 f	NM_004655	CAACACCAGGCGGAACGAA
Axin2 r		GCCAATAAGGAGTGTAAGGACT