

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Efecto de la densidad celular en la proliferación, expansión y diferenciación *in vitro* de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Licenciada en Investigación Biomédica Básica**

**PRESENTA:**

**Francis Valeria Eliosa García**

**TUTOR:**

**Dr. Héctor Mayani Viveros**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd.Mx., 2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **Agradecimientos**

Al Dr. Mayani, por permitirme aprender de usted. Gracias por todo su apoyo. A mis sinodales, Dra. Antonieta Chávez, Dr. Iván Velasco, Dr. Alfredo Fernández y Dr. Fabián Díaz, por sus acertados comentarios y retroalimentación en este trabajo.

A la Dra. Paty Flores, por tenerme muchísima paciencia y por alimentar mi curiosidad científica. Gracias por su guía y sus consejos, este trabajo es en gran parte suyo también, gracias por inspirarme. A los técnicos Luis Torres e Ignacio Galeana, por su apoyo en los experimentos y por hacer del laboratorio un lugar cálido. A mi compañero Daniel, que sufrió conmigo los efectos de la pandemia en la falta de muestras para experimentos y en quien encontré un confidente en momentos muy difíciles, siempre te voy a admirar.

A todos los doctores que fueron pilares en mi formación como científica, Dra. Julieta Rubio, Dr. Carlos Rosales, Dr. Luis Servín, Dr. Jesús Chimal, Dr. Alejandro Fernández, Dr. Alejandro Zentella.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme acceder a la educación media superior y superior, por ayudarme a desarrollarme como persona y como profesionista. Retribuiré a la sociedad y a la Universidad todo el apoyo que me brindó.

A la Licenciatura en Investigación Biomédica, que me ayudó a desarrollarme como científica y me permitió conocer a personas maravillosas en el camino. A mis compañeros de generación, Fati, Andy, Luz, Adri, Roger, Sebas, Sam, Gerard, Adrián y Arturo, por su compañía durante todos esos semestres y por inspirarme a dar lo mejor de mí, siempre los llevaré en mi corazón. Un especial reconocimiento a Andy, Luz y Sam, porque en la oscuridad ustedes me enseñaron la luz.

A Charlie y Rafa, por ser amigos incondicionales, en las buenas y en las malas y de quienes estaré orgullosa de llamar colegas en el futuro. A Nancy Mora, por abrirme las puertas de su casa y ser una gran amiga.

A Isaac Rojas, Majo Hernández, Juan González, Sofía Fuentes, Juan Zárate, por seguir acompañándome desde la preparatoria en este largo camino, siempre tendrán un lugar especial en mi corazón. Especial reconocimiento a Laura Hurtado, por ser mi mejor amiga, te amo.

A Ulises Martínez, Emily Retana, Sebas López, María Santos, por todos estos años juntos y por una amistad que durará toda la vida.

A Diego, por ser el pilar de mi vida y mi lugar seguro, por inspirarme todos los días a ser una mejor persona. Gracias por permitirme compartir esta vida contigo. Te amo con todo mi corazón.

A mi familia. A mis papás, Eduardo y María Elena, porque sin ustedes no sería quien soy ahora, por ser mi ejemplo a seguir, por darme su amor incondicional y acompañarme durante todos estos años. Los amo con todo mi corazón, gracias por ser los mejores papás del mundo entero. A mis hermanos, Esba y Mari, porque no importa qué tan lejos estemos el uno del otro, siempre vamos a estar juntos. Los admiro y me inspiran a seguir adelante siempre. Los amo con todo mi corazón.

A todas aquellas personas que compartieron su espacio y su tiempo conmigo, por más largo o corto que haya sido, todos fueron parte fundamental para que pudiera llegar hasta acá. Gracias.

# ÍNDICE

Resumen.....	5
Lista de abreviaturas .....	7
1. INTRODUCCIÓN .....	9
1.1 Hematopoyesis.....	9
1.1.1 Definición de la hematopoyesis .....	9
1.1.2 Compartimientos celulares de la hematopoyesis.....	9
1.2 Células troncales y progenitoras hematopoyéticas .....	10
1.2.1 Inmunofenotipo .....	10
1.2.2 Ensayos funcionales .....	12
1.2.3 Cultivos <i>in vitro</i> de las CTPH.....	12
1.2.4 Importancia clínica de las poblaciones celulares en trasplantes hematopoyéticos .....	13
1.3 Fuentes de células troncales y progenitoras hematopoyéticas.....	14
1.3.1 Médula ósea (MO).....	14
1.3.2 Sangre periférica movilizada (SPM) .....	14
1.3.3 Sangre de cordón umbilical (SCU).....	15
1.3.4 Diferencias entre las fuentes de CTPH .....	15
2. Antecedentes .....	16
2.1 Expansión <i>ex vivo</i> .....	16
2.2 Densidad celular .....	17
2.2.1 Densidad celular en otras poblaciones celulares primitivas .....	17
2.2.2 Densidad celular en células hematopoyéticas .....	18
3. Planteamiento del problema .....	19
4. Hipótesis.....	19
5. Objetivos .....	19
5.1 Objetivo general.....	19
5.2 Objetivos particulares .....	19
6. Materiales y métodos .....	20
6.1 Obtención de poblaciones celulares CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> y CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> .....	20
6.2 Citometría de flujo .....	20
6.3 Cultivos celulares <i>in vitro</i> .....	21
6.4 Conteo celular .....	21
6.5 Ensayos de colonias.....	21

6.6 Ensayos de morfología celular .....	21
6.7 Estadística.....	22
7. Resultados .....	23
7.1 Enriquecimiento y obtención de las poblaciones celulares purificadas .....	23
7.2 Proliferación celular .....	25
7.3 Expansión celular.....	39
7.4 Diferenciación celular.....	43
8. Discusión .....	46
9. Conclusiones y perspectivas.....	51
10. Bibliografía .....	53

## Resumen

La hematopoyesis es el proceso por el cual se generan las células sanguíneas a partir de un precursor común, denominado célula troncal hematopoyética (CTH), la cual es capaz de autorrenovarse y de diferenciarse a cualquier tipo de linaje sanguíneo. Durante la hematopoyesis, las CTH dan lugar a células progenitoras (CPH), las cuales proliferan y se diferencian a células maduras. Una de las tres fuentes principales de células troncales y progenitoras hematopoyéticas de interés clínico es la sangre de cordón umbilical (SCU), la cual posee ciertas ventajas, principalmente inmunológicas, con respecto a las otras fuentes. Sin embargo, la principal desventaja de las CTH y CPH provenientes de SCU es su limitado número absoluto en cada unidad a comparación de lo obtenido de otras fuentes, como la médula ósea y la sangre periférica movilizada. Esto ha causado que su uso en trasplantes se restrinja únicamente a pacientes de talla y peso bajos, principalmente pediátricos. Por ello, se han propuesto distintas estrategias para incrementar los números totales de CTH y CPH para ser empleados en trasplantes de pacientes adultos.

Se han establecido distintos modelos de cultivo *in vitro* para la proliferación, expansión y diferenciación de las CTH y CPH, en donde el tipo y la concentración de citocinas hematopoyéticas empleadas juega un papel fundamental. Aunque es claro que las CTH y CPH proliferan en suspensión, el efecto de la densidad celular en estos cultivos ha sido poco considerada. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue conocer si la proliferación, expansión y diferenciación de dos poblaciones hematopoyéticas purificadas de SCU humana, denominadas CTH (CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup>) y CPH (CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup>), se modificaban al iniciar su cultivo en distintas densidades celulares.

Por medio de citometría de flujo, las células purificadas de ambas poblaciones se sembraron a densidades de 1, 10 100 y 1000 células por pozo, durante 21 días. Durante los días 7, 14 y 21 se evaluó la proliferación, expansión y diferenciación celular.

Observamos en ambas poblaciones que la tasa de proliferación a densidades bajas (1 y 10 células/pozo) aumentó rápidamente durante los primeros 7 días y posteriormente se mantuvo a lo largo del cultivo. En contraste, la tasa de proliferación a densidades altas (100 y 1000 células/pozo) tuvo un aumento lento y disminuyó para el día 21.

Sin embargo, en las densidades altas de las CTH todos los pozos evaluados proliferaron durante todo el cultivo, mientras que en las densidades bajas el porcentaje de pozos que proliferaron fue muy bajo desde el inicio (25%) y disminuyó con el tiempo. En las CPH, el porcentaje de pozos proliferativos disminuyó con el tiempo en todas las densidades.

A pesar de que cada población se consideró inmunofenotípicamente homogénea, hubo grandes diferencias en la respuesta entre pozos, ya que en algunos no hubo proliferación y en otros hubo un alto incremento de número celular en cultivo. Esta variabilidad en la respuesta fue más notoria en las densidades bajas, las cuales tuvieron el porcentaje más alto de pozos que no proliferaron y de pozos que tuvieron el mayor incremento celular. En contraste, en las densidades altas no se registraron pozos no proliferativos, así como tampoco pozos con incremento en el número celular mayor a 100 veces, sino que se mantuvieron en un rango de 1 a 25 veces de incremento. Además, los cultivos de CTH únicamente a densidades bajas disminuyeron su viabilidad con el tiempo, mientras que la población de CPH disminuyó su viabilidad en todas las densidades, pudiendo ser esta una característica intrínseca del tipo celular.

La expansión celular se evaluó por ensayos de células formadoras de colonias (CFCs). No hubo un efecto significativo de la densidad celular en la expansión, la cual tuvo su pico máximo a los 14 días en la población de CTH, y a los 7 días en la población de CPH. En ambas poblaciones se observó que los cultivos perdieron la capacidad de formar colonias de linaje eritroide con el tiempo, sin embargo, la densidad alta promovió que la pérdida fuera más rápida. En cuanto a la diferenciación celular, se demostró que esta ocurre inherentemente en cultivos de ambas poblaciones, pero se ve promovido por la alta densidad celular.

En conclusión, la densidad en cultivo afecta la proliferación celular, promoviendo su rápido crecimiento a densidades bajas, y un crecimiento más lento a densidades altas. La densidad celular no afecta la expansión de las poblaciones. Por último, la densidad celular afecta la diferenciación celular, promoviéndola en cultivos a densidades altas, sin embargo, esta capacidad incrementa con el tiempo independientemente de la densidad celular.

## **Lista de abreviaturas**

**APC** Alofocianina

**CFC** Células formadoras de colonias

**CMN** Células mononucleares

**CPH** Células progenitoras hematopoyéticas

**CTH** Células troncales hematopoyéticas

**CTPH** Células troncales y progenitoras hematopoyéticas

**DMSO** Dimetil sulfóxido

**DP** Células dobles positivas (CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>)

**ECM** Matriz extracelular

**EICH** Enfermedad de injerto contra hospedero

**EPO** Eritropoyetina

**FBS** Suero bovino fetal

**FL3** ligando de la interleucina FLT-3

**GM-SCF** Factor estimulante de colonias granulo-monocíticas

**IL-6** Interleucina 6

**IMSS** Instituto Mexicano del Seguro Social

**Lin** Linaje (Marcadores de diferenciación)

**LT-HSC** Células troncales hematopoyéticas de largo plazo

**MO** Médula ósea

**MSC** Células troncales mesenquimales

**PE** Ficoeritrina

**RPMI** Medio Roswell Park Memorial Institute

**SCF** Factor de células troncales

**SCU** Sangre de cordón umbilical

**SP** Células simples positivas (CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>)

**SPM** Sangre periférica movilizada

**SRC** Célula repobladora en ratones inmunodeficientes SCID

**ST-HSC** Células troncales hematopoyéticas de corto plazo

**TEPA** Tetraetilenopentamina

**TPO** Trombopoyetina

**VPA** Ácido valproico

# 1. Introducción

## 1.1 Hematopoyesis

### 1.1.1 Definición de la hematopoyesis

La sangre es uno de los tejidos con mayor recambio celular en el organismo. La hematopoyesis (del griego *haima*, "sangre", y *poiesis*, "creación") es el proceso mediante el cual se generan todas las células que conforman la sangre. El modelo clásico de la hematopoyesis es jerárquico y unidireccional, es decir, está organizado en compartimentos celulares dependiendo de la maduración celular y el proceso ocurre siempre en la dirección de las células primitivas hacia células terminalmente diferenciadas [1].

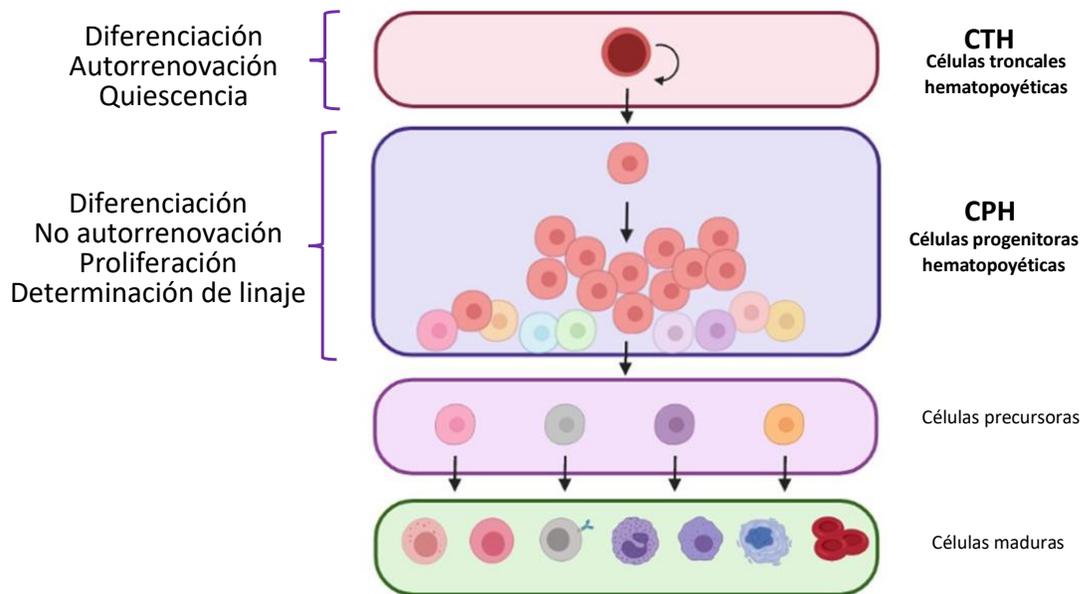
### 1.1.2 Compartimientos celulares de la hematopoyesis

La hematopoyesis comienza con un grupo celular particular llamado células troncales hematopoyéticas (CTH), las cuales tienen dos características fundamentales: 1) pueden autorrenovarse, es decir, son capaces de dividirse y generar células con características similares a la célula original, manteniendo así la población troncal durante un tiempo prolongado, y 2) tienen un alto potencial de diferenciación -capacidad de dar origen a uno o distintos tipos celulares-, puesto que pueden generar todas las células sanguíneas [2]. A lo largo de la vida de un organismo, un alto porcentaje de las CTH se encuentran en un estado de quiescencia, es decir, se encuentran fuera del ciclo celular [3]. Cuando hay requerimiento de células hematopoyéticas, como en una respuesta inmune, las CTH entran a ciclo celular y se dividen.

Las CTH dan origen a las células progenitoras hematopoyéticas (CPH), las cuales no tienen la capacidad de autorrenovarse, pero tienen un alto potencial de proliferación y de diferenciación. Una de las características de la población progenitora es su capacidad de amplificar el número de precursores sanguíneos de los distintos linajes, con la finalidad de mantener un número constante de células en circulación.

Aunado a esto, con el avance de la maduración, las CPH comienzan a limitar su potencial de diferenciación a alguno de los dos principales linajes celulares: mieloide y linfoide. El linaje mieloide se subdivide en el linaje granulo-monocítico, que abarca neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, macrófagos, y en el linaje megacariocítico-eritroide, que abarca plaquetas y eritrocitos. Por otro lado, el linaje linfoide se conforma de linfocitos T, linfocitos B, células *natural killer* (NK) y células dendríticas [4].

Una vez determinadas hacia alguno de los linajes hematopoyéticos, las CPH dan lugar a las células precursoras, las cuales están limitadas a la formación de un tipo celular y tienen un potencial de proliferación muy limitado. A diferencia de las CTH y las CPH, las células precursoras pueden ser identificadas por su morfología y producen a las células maduras. En conjunto, los compartimentos de células troncales, progenitoras, precursoras y maduras componen el sistema hematopoyético (Fig.1).



**Figura 1.** Esquema del sistema hematopoyético, el cual está conformado por los compartimentos de células troncales, progenitoras, precursoras y maduras. Modificado de [5]

Las células troncales y progenitoras hematopoyéticas (CTPH), así como las células precursoras, se encuentran en la médula ósea (MO) de organismos adultos. Por otra parte, las células maduras mieloides (a excepción de los macrófagos, los cuales se encuentran en tejidos) salen de la MO para adentrarse a la circulación sanguínea. Mientras tanto, algunos linajes de células linfoides (como las células T) salen de la MO y migran hacia los órganos linfoides secundarios para completar su maduración antes de entrar al torrente sanguíneo [4].

## 1.2 Células troncales y progenitoras hematopoyéticas

Desde principios del siglo XX ya existía un modelo unitario que proponía la existencia de un precursor común para el sistema hematopoyético [6]. Incluso se conocía que este precursor residía en la MO y que se localizaba en un microambiente específico [7]. Sin embargo, no fue sino hasta la década de 1960 que se demostró la existencia de las células hematopoyéticas primitivas experimentalmente. En estos se encontró que, al trasplantar ratones letalmente irradiados con células de MO provenientes de ratones sanos, se formaban colonias mielo-eritroides en el bazo del hospedero, probando el potencial de diferenciación de estas poblaciones [8]. Además, se demostró que las células de una colonia provenían de una célula en común, denominada célula formadora de colonias (CFC), las cuales fueron posteriormente clasificadas como células progenitoras [8, 9]. Con el transcurso del tiempo, lograron caracterizar un grupo celular que podía reconstituir el sistema hematopoyético completo en ratones letalmente irradiados, las cuales fueron denominadas células troncales. Actualmente, pueden seguirse estrategias fenotípicas de marcadores de membrana o ensayos funcionales *in vitro* e *in vivo* para identificar las poblaciones troncal y progenitora.

### 1.2.1 Inmunofenotipo

Las CTH humanas no presentan marcadores membranales característicos de células maduras, como CD3, CD8, CD11, CD14, CD16, entre otros. Por ello, son conocidas como células linaje negativo (Lin<sup>-</sup>). No obstante, son positivas a CD90, conocido como antígeno de diferenciación de timocito 1 (Thy-

1); CD49f, integrina  $\alpha 6$ ; CD117, también llamado c-kit, receptor del factor de células troncales (SCF, por sus siglas en inglés); CD133, también conocido como prominina-1; CD135, también conocido como FLT3, receptor de la citocina de acción temprana FL3, entre otros[2], [11]–[14].

Una de las moléculas más importantes expresadas por las poblaciones primitivas es CD34, la cual es una proteína transmembranal relevante para el anclaje al nicho hematopoyético. La fracción celular identificada como  $\text{Lin}^- \text{CD34}^+$  está enriquecida en células con morfología blástica, mientras que la fracción  $\text{Lin}^+ \text{CD34}^-$  se conforma principalmente de células precursoras, cuyo estado de maduración es reconocible por su morfología. Se ha reportado en la literatura que CD34 es expresado por células hematopoyéticas tempranas en altos niveles y su expresión disminuye conforme se diferencian [15]. Además, las células  $\text{Lin}^- \text{CD34}^+$  provenientes de MO o de sangre de cordón umbilical (SCU) tienen un enriquecimiento de 10 a 100 veces en células formadoras de colonias (CFCs) (descrito en el capítulo 1.2.3)[15].

Cabe mencionar que se han aislado células  $\text{Lin}^- \text{CD34}^-$  con características troncales, ya que son capaces de reconstituir el sistema hematopoyético en xenotrasplantes<sup>1</sup>, además de formar colonias hematopoyéticas, principalmente del linaje megacariocítico-eritroide [16]. Sin embargo, los cultivos de esta población generaron células  $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^-$ , el inmunofenotipo tradicional de las CTH más primitivas, lo que sugiere que las células  $\text{Lin}^- \text{CD34}^- \text{CD38}^-$  pueden corresponder a una población más primitiva [17].

Las CPH más primitivas, al igual que las CTH, no presentan marcadores de diferenciación ( $\text{Lin}^-$ ) y comparten algunas moléculas de superficie, como CD34, ya que son poblaciones primitivas [18]. Sin embargo, presentan marcadores que los distinguen, como CD38, el cual se expresa en la población progenitora, pero no en la población troncal [19]. Distintas poblaciones hematopoyéticas expresan CD38, como monocitos, células dendríticas, linfocitos, entre otras. Sin embargo, su expresión puede modificarse cuando estas se activan en contextos inflamatorios [20]. La molécula CD38 es una proteína transmembranal con actividad enzimática, involucrada en la activación y respuesta del sistema inmunológico. Únicamente el 0.1% de las células  $\text{CD34}^+$  en MO no expresan CD38 [21]. Al diferenciarse y comprometerse hacia algún linaje hematopoyético, las células aumentan la expresión de CD38 mientras que disminuyen la expresión de CD34 [21]. Se ha observado que la población  $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+$  tiene una gran capacidad de formación de colonias, pero solo reconstituye la hematopoyesis durante un corto tiempo en modelos de trasplante [22]. Las CPH en estados más avanzados de diferenciación comienzan a expresar a bajos niveles los marcadores del linaje al que se comprometieron. Por ejemplo, las células progenitoras de megacariocitos y eritrocitos (MEP, por sus letras en inglés *Megakaryocyte/Erythrocyte Progenitor*) expresan CD41, CD44 y CD71, mientras que las progenitoras de granulocitos y monocitos (GMP, por sus siglas en inglés *Granulocyte/Monocyte Progenitor*) CD45RA [12], [23].

Para fines de este estudio, definimos la población troncal hematopoyética como células  $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^-$  y la población progenitora hematopoyética como células  $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+$ , ya que se ha demostrado que estos inmunofenotipos son suficientes para diferenciar y purificar ambas poblaciones [17][18].

---

<sup>1</sup> Tipo de trasplante de células, tejidos u órganos de una especie a otra (por ejemplo, de humano a ratón) [125].

### 1.2.2 Ensayos funcionales

En ensayos funcionales *in vitro*, las CPH son capaces de formar colonias celulares embebidas en una matriz semisólida, demostrando su potencial de diferenciación y de proliferación. Estas colonias pueden ser clasificadas por su tamaño, color y composición celular como granulocíticas (G), monocíticas (M), granulomonocíticas (GM), eritroides tempranas (BFU-E), eritroides tardías (CFU-E), y mixtas (GEMM). A pesar de que una colonia surge de una célula progenitora, la cantidad de colonias no es equivalente a la cantidad de células progenitoras en cultivo, ya que no todas las células progenitoras presentes en cultivo pueden generar colonias [24].

En el caso de las CTH, el estándar de oro para evaluar sus propiedades es la reconstitución hematopoyética por medio de trasplantes a recipientes murinos inmunodeficientes que han sido irradiados. Hasta la fecha, el ensayo de reconstitución *in vivo* es el único método irrefutable para detectar a la población troncal [25].

### 1.2.3 Cultivos *in vitro* de las CTPH

La homeostasis de las CTPH es regulada por mecanismos endógenos y exógenos. Los factores endógenos son aquellos involucrados en las diferentes vías de señalización y reguladores transcripcionales, mientras que los factores exógenos se refieren a los componentes del nicho hematopoyético. Para el mantenimiento *in vitro* de las CTPH, es necesario que algunos elementos del nicho hematopoyético sean incluidos en los cultivos. De esta forma, la supervivencia, proliferación y maduración de ambas poblaciones requiere de citocinas en el medio de cultivo. Las citocinas son proteínas secretadas o unidas a membrana que se unen a sus receptores en la superficie membranal y desencadenan respuestas que regulan la activación, proliferación y diferenciación de las células blanco [4]. Asimismo, se pueden clasificar en tres categorías dependiendo de su impacto en el sistema hematopoyético. Las citocinas de acción temprana promueven la supervivencia de las CTH, tales como trombopoyetina (TPO), factor de células troncales (SCF) y el ligando de la tirosina de hígado fetal 3 (FL, o FLT3), las cuales permiten mantener la viabilidad de las células CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> en un 96% [26].

Las de acción intermedia promueven la generación de CPH comprometidas a ciertos linajes, como el factor estimulante de colonias granulo-monocíticas (GM-CSF). Las citocinas de acción tardía contribuyen a la generación de células maduras, como eritropoyetina (EPO) y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF).

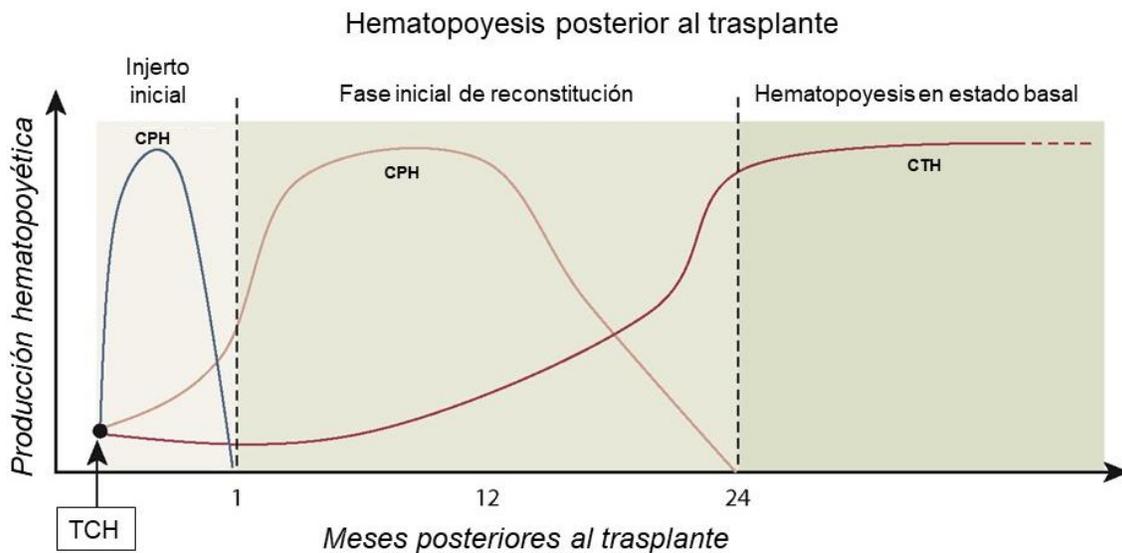
Anteriormente se tenía la hipótesis de que las citocinas de acción intermedia y tardía no influían en la diferenciación de las CTPH a algún linaje en particular, sino únicamente promovían la diferenciación de aquellas que ya están determinadas a algún linaje hematopoyético. [11] [19]. No obstante, trabajos recientes de nuestro laboratorio demuestran que niveles altos de citocinas en el medio alteran el destino celular de las CPH (Hernández-Barrientos, et al, datos no publicados).

Otro de los elementos que recrean el nicho hematopoyético en cultivo es la presencia de células estromales, ya que se sabe que estas secretan citocinas como SCF, TPO, angiopoyetina 1 y osteopontina, entre otros, que promueven la supervivencia y proliferación de las CTPH [29]. Sin embargo, se ha demostrado que ciertas combinaciones de citocinas recombinantes pueden promover la proliferación de las CTPH de mejor manera que las células estromales [30].

### 1.2.4 Importancia clínica de las poblaciones celulares en trasplantes hematopoyéticos

Existen numerosas enfermedades hematológicas para las cuales el tratamiento clínico consiste en trasplantes de CTPH [31]. Para ello, los pacientes reciben altas dosis de quimioterapia, las cuales eliminan a una gran proporción de células hematopoyéticas en el organismo, incluyendo a las células que participan en la respuesta inmunológica. Posteriormente, los pacientes son trasplantados con células hematopoyéticas de donadores inmunocompatibles. La dinámica de recuperación del sistema hematopoyético después de un trasplante se muestra en la **Figura 2**, en el cual las poblaciones troncal y progenitora tienen una importante participación.

Durante los primeros meses postrasplante, las CPH trasplantadas proliferan y se diferencian a células maduras, restaurando los niveles de leucocitos, eritrocitos y plaquetas en el paciente. Debido a que la mayoría de las CTH se encuentra fuera del ciclo celular, la frecuencia de células provenientes de las CTH trasplantadas es baja al inicio de la recuperación. Con el tiempo, las CPH trasplantadas se agotan al no poder autorrenovarse; de manera simultánea, hay un incremento en las células provenientes de las CTH y eventualmente todas las células hematopoyéticas en el paciente son originadas de la población troncal. Aunque las CTH son las que mantienen la hematopoyesis del paciente a largo plazo, las CPH son cruciales para mantener la producción celular hematopoyética a corto plazo. Esto es de vital importancia, debido a que las infecciones son una de las causas principales de mortalidad después de trasplantes hematopoyéticos [32]. Por lo tanto, ambas poblaciones celulares cumplen distintos papeles que son esenciales para la recuperación de los pacientes después de un trasplante hematopoyético.



**Figura 2.** Esquema del origen de las células hematopoyéticas en un paciente en función del tiempo transcurrido posterior a un trasplante hematopoyético. TCH: trasplante de células hematopoyéticas; CTH: células troncales hematopoyéticas; CPH: células progenitoras hematopoyéticas. Modificado de [23]

### 1.3 Fuentes de células troncales y progenitoras hematopoyéticas

Se han reportado tres fuentes principales de CTPH: MO, sangre periférica movilizada (SPM) y SCU [6][7], las cuales serán descritas a continuación.

#### 1.3.1 Médula ósea (MO)

En los mamíferos adultos, las CTPH se encuentran ubicadas en sitios específicos dentro de la MO llamados nichos hematopoyéticos, los cuales poseen una dinámica física y química esencial para la regulación de la supervivencia, proliferación y autorrenovación de ambas poblaciones [35][36]. A diferencia del ratón, en donde todos los huesos participan en la hematopoyesis, en el humano los huesos largos son los principales sitios hematopoyéticos, como el fémur, las costillas, y la cresta ileaca entre otros [37].

Las CTPH se mantienen en el nicho por la interacción con moléculas pertenecientes al estroma del tejido; una de las principales es la interacción CXCR4-CXCL12. CXCL12 (también conocido como SDF-1) es expresado por diferentes tipos celulares en el nicho y se une al receptor CXCR4, expresado en CTPH. Alteraciones en dicha interacción produce números reducidos de células troncales en la MO [28][29]. Otras interacciones involucradas en el mantenimiento de las CTPH en la MO son el factor de células troncales SCF con el receptor Kit (SCF-KIT) y el receptor VLA-4 con la molécula de adhesión VCAM1 (VLA-4- VCAM1) [37][40].

Los primeros intentos de trasplantes de MO fueron realizados por Thomas et. al, a finales de la década de 1950 [41]. Posteriormente, los estudios pioneros de Till y McCulloch para entender la biología de las células hematopoyéticas, así como el descubrimiento de la histocompatibilidad, dio inicio a la clínica de los trasplantes [9].

Para obtener la población troncal y progenitora de MO se realizan aspirados de médula a lo largo de la cresta ilíaca posterior de pacientes adultos, bajo anestesia general, de la cual se pueden obtener hasta 1.5 litros [40]. Los riesgos incluyen sangrado, dolor local e infección [25].

#### 1.3.2 Sangre periférica movilizada (SPM)

En 1962, Goodman y Hodgson reportaron por primera vez la presencia de progenitores hematopoyéticos en sangre periférica de ratones [42]. Las CTPH pueden ser movilizadas de la MO a la circulación de manera fisiológica mediante mecanismos regulados por los ciclos circadianos y por la respuesta inmune, entre otros [43]–[45]. No obstante, la migración de estas poblaciones hacia el torrente sanguíneo puede ser inducida por la administración de fármacos a los donadores, de donde se obtienen las células mediante aféresis. Este tratamiento es utilizado para una obtención alternativa de CTPH y es conocida como SPM.

Uno de los fármacos más utilizados es el factor estimulante de células granulocíticas (G-CSF), el cual provoca disminución de la expresión de SCF y CXCL12 en el nicho, así como aumento de proteasas que cortan a moléculas como CXCL12, SCF y VCAM-1, culminando en la movilización de las células primitivas a la circulación [46], [47]. Adicionalmente, la molécula pequeña AMD3100 (plerixafor) promueve la movilización de las CTPH, puesto que es un antagonista del receptor CXCR4 [48] y se ha demostrado que el uso del ligando de FLT3 (FL), inhibidores de la enzima ciclooxigenasa 1 (COX1) y otros agentes también provocan la movilización de las CTPH hacia la circulación [36][37].

Para movilizar a las CTPH de la MO, los donadores reciben un tratamiento de G-CSF durante cuatro o cinco días previos al trasplante. Sin embargo, en algunas ocasiones el tratamiento no resulta en altos niveles de células CD34<sup>+</sup> en circulación, motivo por el cual, se puede administrar AMD3100 un día previo al trasplante [40]. Es posible recolectar hasta el equivalente de 12 litros de sangre durante la aféresis. Los donadores de SPM tienen una recuperación más rápida que los donadores de MO y menores efectos adversos [51]. Actualmente, los trasplantes hematopoyéticos utilizando SPM como fuente de CTPH son los más utilizados a nivel mundial [52].

### 1.3.3 Sangre de cordón umbilical (SCU)

La tercera fuente proviene de neonatos al momento del alumbramiento. Durante mucho tiempo, la SCU (también conocida como sangre placentaria), así como el cordón *per se*, fueron material de desecho médico al finalizar el alumbramiento. En 1974, Knudtson describió por primera vez la presencia de progenitores hematopoyéticos en la SCU [53]. Posteriormente, Broxmeyer et.al. reportó que contenía células hematopoyéticas primitivas y maduras que podían ser utilizadas para trasplantes [33]. Pero no fue sino hasta 1988 cuando tuvo lugar el primer trasplante en un paciente pediátrico con anemia de Fanconi<sup>2</sup>, quien se le trasplantaron células provenientes de SCU de su hermana menor [54]. A la fecha, se han realizado más de 60,000 trasplantes de SCU a nivel mundial en pacientes con enfermedades hematológicas malignas y no malignas [55].

La SCU es obtenida mediante la punción de la vena umbilical una vez que el producto ha sido separado de la placenta, seguido del drenaje de la sangre a una bolsa estéril con anticoagulante. Es un proceso indoloro, puesto que el cordón umbilical no posee terminaciones nerviosas y no hay efectos adversos. El volumen de recuperación varía entre 80 y 150 ml. Además, las muestras pueden ser criopreservadas en bancos de sangre durante más de 20 años y mantener así a las células funcionales [56]. Más de 803,000 unidades de SCU se encuentran disponibles internacionalmente en bancos públicos y privados (WMDA, [wmda.info](http://wmda.info)) [57]. En México, el Banco de Sangre del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), establecido en 2005, se encuentra entre los mejores cinco en el mundo gracias a su productividad en la recolección de CTPH y su uso clínico en trasplantes ([imss.gob.mx](http://imss.gob.mx)) [58].

### 1.3.4 Diferencias entre las fuentes de CTPH

Si bien las poblaciones celulares provenientes de las tres fuentes tienen características similares, también presentan diferencias. En nuestro grupo de investigación las células de SCU son el objeto principal de estudio, debido a su gran potencial para su uso en tratamientos clínicos [59].

Las células de SCU tienen una mayor expresión del antígeno CD34 que su contraparte adulta, así como una mayor capacidad proliferativa [60], [61]. Además, la frecuencia de células con capacidad repobladora analizada en ratones inmunodeficientes SCID (SRC, por sus siglas en inglés) es más alta en SCU, seguida de MO y por último, en SPM [61].

Por otro lado, una de las mayores complicaciones en trasplantes es la enfermedad de injerto contra hospedero (EICH), la cual es un desorden sistémico donde los linfocitos T del injerto reconocen los tejidos del paciente como extraños y atacan a las células del huésped. Aunque las tres fuentes de

---

<sup>2</sup> Enfermedad hereditaria caracterizada por una falla en los mecanismos de reparación del ADN. Esto lleva a alteraciones en el desarrollo, falla medular progresiva y un riesgo más alto a desarrollar ciertos tipos de cáncer [126].

CTPH contienen una fracción de células T, las unidades de SCU tienen la incidencia de EICH más baja [40]. Esto se debe a que la SCU contiene células T consideradas “nuevas” o “vírgenes”, es decir, células que no han sido expuestas a antígenos, por lo que no tienen memoria inmunológica y pueden llegar a generar una tolerancia en el nuevo organismo que las aloje, en caso de un trasplante. Si bien las muestras de SPM son las que contienen mayores números absolutos de linfocitos, no hay diferencias significativas en la incidencia de EICH (aguda y crónica) de trasplantes de SPM y MO [52].

El criterio de compatibilidad de HLA (antígeno leucocitario humano, por sus siglas en inglés) para MO y SPM es alto (6/6 loci para un donador emparentado idéntico, 7/8 para un donador haploidentico y 8/8 para un donador no emparentado). Para SCU, el criterio es más flexible (4/6 loci), razón por la cual este tipo de trasplante sería más accesible, sobre todo para minorías étnicas [62].

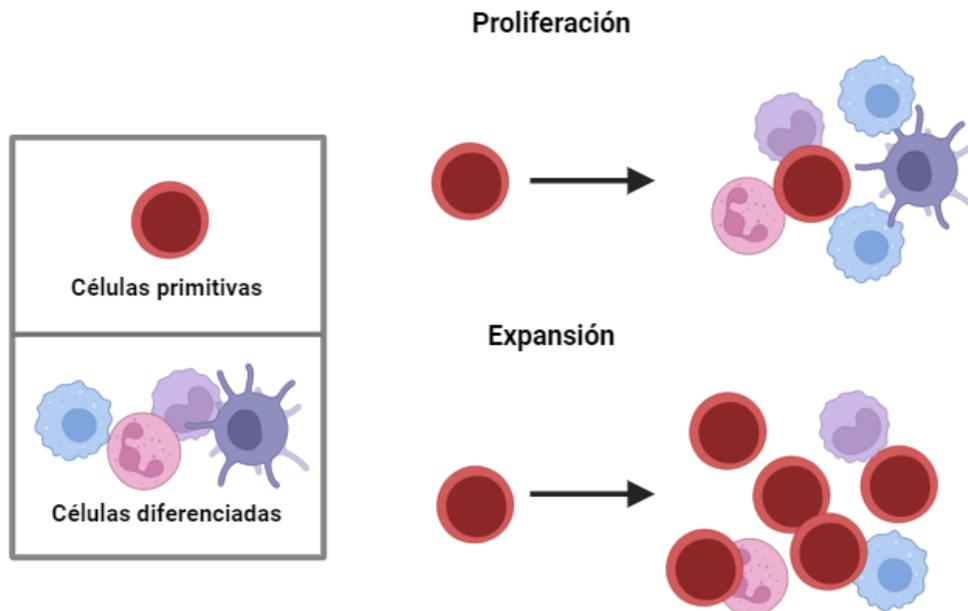
Sin embargo, el volumen obtenido de las muestras de SCU es mucho menor que el volumen de las otras dos fuentes, por lo que el número absoluto de células CD34<sup>+</sup> es el más bajo de las tres (aproximadamente un 15% menos que el número observado en MO y SPM). Esto aumenta el tiempo necesario para la reconstitución del sistema hematopoyético, incrementando la susceptibilidad a infecciones y hemorragias que ponen en riesgo la vida de los pacientes. Además, aumenta los costos de hospitalización [63].

Para solucionar los problemas relacionados con el bajo número de CTPH en SCU, algunos grupos realizan trasplantes con dos unidades de SCU para alcanzar los números celulares mínimos necesarios por kilogramo de peso del paciente [64]. Otro enfoque utilizado es el co-trasplante de unidades hematopoyéticas con células estromales mesenquimales, las cuales pueden ayudar a evitar el desarrollo de EICH [65]. Finalmente, se han desarrollado protocolos experimentales para la expansión *ex vivo* de CTPH [66]–[70].

## 2. Antecedentes

### 2.1 Expansión *ex vivo*

Varios grupos de investigación se han dado a la tarea de desarrollar estrategias para incrementar el número de CTPH empleando cultivos *in vitro*. Existen tres características que deben ser evaluadas en los cultivos de CTPH: la proliferación, la expansión y la diferenciación (**Fig.3**). La proliferación puede ser definida como la capacidad de una célula de generar células hijas, sin importar el estado de maduración ni el tipo celular de estas. Por lo tanto, para medir la proliferación se evalúan los números celulares absolutos generados en el cultivo a lo largo del tiempo. La expansión es la capacidad de una célula de generar células hijas con características fenotípicas y funcionales similares a la célula de origen. Uno de los parámetros para medir la expansión de una CTPH es evaluar la cantidad de CFC generadas en cultivo [71]. En el caso de la diferenciación celular, se define como el proceso en el que una CTPH genera células maduras (diferenciadas). Para evaluar diferenciación celular, se puede determinar el inmunofenotipo, la morfología celular, o la funcionalidad de las células generadas en cultivo a través de ensayos *in vitro* descritos en el capítulo anterior.



**Figura 3.** Esquema de la definición de las características de interés de las poblaciones troncal y progenitora en cultivos *in vitro*.

Evidentemente, para incrementar los números de CTPH obtenidas de SCU se busca promover su expansión. En este sentido, el objetivo es expandir el número de células CD34<sup>+</sup> y/o el número de CFC. La presencia de citocinas en el medio es imprescindible para la supervivencia, proliferación y expansión de las poblaciones hematopoyéticas. La combinación más utilizada para la expansión de CTPH es IL-3, IL-6, SCF, TPO y FL [72], [73]. En años recientes, además de citocinas recombinantes, se han utilizado moléculas pequeñas, tales como el ligando de Notch Delta-1, StemReginina 1 (SR1), UM171, tetraetilenopentamina (TEPA), ácido valproico (VPA), nicotinamida, que actúan como ligandos de receptores o como modificadores epigenéticos y promueven la autorrenovación e inhiben la diferenciación de poblaciones primitivas [66]–[70], [74].

Adicionalmente, se ha demostrado la importancia de la organización espacial en los modelos *in vivo*. La matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) es una red de proteínas y polisacáridos secretados por las células estromales que es indispensable para dar forma, organización y dinámica en las estructuras multicelulares [75]. En la MO, la ECM está conformada principalmente por fibronectina, laminina y colágeno tipo II y IV [76]. De esta forma, se han implementado diferentes estrategias de cultivo donde diversas moléculas de ECM recubren las placas de cultivo (individual o grupalmente) [77], [78].

## 2.2 Densidad celular

### 2.2.1 Densidad celular en otras poblaciones celulares primitivas

Existen diversas variables que pueden afectar las características de las poblaciones celulares en las condiciones *in vitro*. Algunos ejemplos son la temperatura de incubación, el tiempo de cultivo, la composición del medio de cultivo y la densidad celular utilizada en los cultivos. Este último parámetro se define como la cantidad de células cultivadas en una determinada superficie o en un

determinado volumen de cultivo. Se ha demostrado que la densidad celular inicial es un factor importante en el resultado final del cultivo.

Existen estudios en el sistema mesenquimal en los que se reporta que una densidad celular alta al inicio de los cultivos promueve una mayor proliferación [79]. Sin embargo, disminuye la viabilidad celular, mientras que promueve la diferenciación y la senescencia celular [80]. Adicionalmente, se ha reportado que la densidad celular puede influir en la diferenciación de las células estromales mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) hacia ciertos linajes [81].

En el sistema nervioso central, se ha reportado que las células precursoras mesencefálicas proliferan más a corto plazo cuando la densidad celular inicial es alta, sin embargo se diferencian a neuronas dopaminérgicas y el cultivo se agota [82]. En los dos sistemas mencionados, fue demostrado que las células eran capaces de determinar la densidad en cultivo gracias a la concentración de citocinas secretadas en el medio o la cantidad de uniones intercelulares, respectivamente [79], [82].

En otro modelo de cultivo de células progenitoras vasculares (CPV) se reportó que las células sembradas en una densidad alta al inicio del cultivo presentaban una proliferación alta los primeros días y luego disminuía, mientras que las células sembradas a baja densidad proliferaban de manera más lenta pero constante [83].

### 2.2.2 Densidad celular en células hematopoyéticas

En el sistema hematopoyético, los estudios que evalúan el efecto de la densidad celular en los cultivos de células de SCU son principalmente de finales del siglo XX. En un estudio se demostró que el cultivo a corto plazo de las células mononucleares (CMN) de SCU a densidades altas generaba un aumento en el número celular en el cultivo, así como en el número de colonias [84].

En otro estudio se demostró que, al purificar las poblaciones primitivas, las células CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> de muestras congeladas de SCU en densidades de una y diez células por pozo comenzaban a proliferar después de 7 a 12 días, y alcanzaban su número celular máximo a los días 90 y 70 de cultivo, respectivamente [85]. En otro estudio, las CTPH fueron sembradas en una densidad de una célula por pozo y se demostró que las CTH tenían una mayor tasa de proliferación, conservaban la capacidad de generar colonias y mantenían la producción de CFCs en ensayos de LTC-IC a largo plazo, mientras que las CPH se agotaron en las primeras semanas de cultivo [86].

Estos estudios previos demuestran que las poblaciones hematopoyéticas cultivadas a una baja densidad celular inicial proliferan muy lentamente. Sin embargo, no se demuestra el efecto contrario a densidades altas. Por otro lado, se ha observado que la pureza de las poblaciones analizadas influye en la respuesta celular, principalmente en la proliferación y generación de progenitores hematopoyéticos [87], [88].

### **3. Planteamiento del problema**

Hasta donde sabemos, a la fecha no se ha publicado un trabajo en el que se analice el efecto de la densidad celular en la proliferación, expansión y diferenciación *in vitro* de las CTPH. Con esto en mente, en el presente estudio nos hemos planteado analizar el comportamiento biológico de las CTPH en función de la densidad a la que son cultivadas.

### **4. Hipótesis**

La alta densidad celular promoverá la proliferación y expansión *in vitro* de las CTPH de SCU a corto plazo, pero favorecerá su diferenciación a largo plazo. Mientras, la baja densidad celular promoverá la proliferación y expansión *in vitro* de las dos poblaciones de manera constante a largo plazo, inhibiendo la diferenciación.

### **5. Objetivos**

#### **5.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de distintas densidades celulares en la proliferación, expansión y diferenciación *in vitro* de las CTPH de SCU.

#### **5.2 Objetivos particulares**

1. Determinar el efecto de la densidad celular en la proliferación de las CTPH en cultivos líquidos suplementados con citocinas recombinantes a través de la determinación del número celular a lo largo de 21 días.
2. Determinar el efecto de la densidad celular en la expansión de las CTPH en cultivos líquidos suplementados con citocinas recombinantes a través de la determinación del número de colonias a lo largo de 21 días.
3. Determinar el efecto de la densidad celular en la diferenciación de las CTPH en cultivos líquidos suplementados con citocinas recombinantes a través de la determinación de la morfología celular a lo largo de 21 días.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Obtención de poblaciones celulares CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>

Se utilizaron muestras frescas y congeladas de SCU humana, proveniente de los bancos de sangre del Hospital General de la Raza y del Hospital Troncoso, ambos pertenecientes al IMSS. La SCU fue obtenida mediante punción de la vena umbilical y vaciada por gravedad en bolsas con anticoagulante por el personal del hospital correspondiente. La técnica de obtención de las muestras fue aprobada por el Comité de Ética del Centro Médico Nacional Siglo XXI. El procedimiento se llevó a cabo en una campana de flujo laminar. Las células mononucleares (CMN) provenientes de muestras frescas fueron obtenidas por medio de un gradiente de densidad usando Ficoll-Paque. Posteriormente las células fueron resuspendidas en amortiguador de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) con los antibióticos penicilina/ estreptomina (10 µg/ml) y gentamicina (10 µg/ml). El número celular y la viabilidad fueron calculados utilizando el diluyente de Turk y azul de tripano, respectivamente, con un hematocitómetro. Cuando alguna muestra de sangre tuvo un volumen menor a 50mL, se mezcló con otra muestra para purificar las CMN en conjunto (muestras en *pool*).

En el caso de muestras congeladas, se utilizaron dos métodos de descongelación: 1) el contenido de los viales fue resuspendido en medio RPMI previamente atemperado a 37°C, enriquecido con suero bovino fetal (FBS) al 10%, antibióticos (mencionados anteriormente) y DNAsa (20U/ml). Posteriormente fue centrifugado para eliminar el dimetil sulfóxido (DMSO) y sometido a un gradiente de densidad usando Ficoll-Paque. 2) Los viales fueron descongelados en baño María y resuspendidos en medio de descongelación (previamente descrito) y sometidos a gradiente de densidad con Ficoll-Paque. El segundo método se utilizó debido a que la viabilidad y la celularidad disminuyeron significativamente en las muestras descongeladas por el primer método.

Una vez obtenida la población mononuclear, se realizó un enriquecimiento de células Lin<sup>-</sup> por medio de selección negativa utilizando el kit Easysep Progenitor Cell Enrichment with Platelet Depletion (StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canadá). Este consistió en la incubación celular ( $6 \times 10^7$  cél/ml) con un coctel de anticuerpos (durante 15 minutos a temperatura ambiente), seguido de la incubación con un coloide magnético (durante 5 minutos a temp. ambiente). El coctel de anticuerpos incluía los siguientes antígenos de superficie: CD2, CD3, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD61, CD66b y Glicoforina A. Las células fueron colocadas en una columna magnética durante 10 minutos. Así, las células deseadas fueron recolectadas, centrifugadas y resuspendidas en buffer PBS con 3% de EDTA, para su posterior conteo.

### 6.2 Citometría de flujo

Las células Lin<sup>-</sup> fueron incubadas con los anticuerpos CD34-Alofocianina (APC) y CD38-Ficoeritrina (PE) y el colorante de viabilidad Vybrant DyeCycle Violet durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Para la detección de fluoróforos y la posterior separación de las poblaciones se utilizó el citómetro de flujo Influx BD. Utilizamos dos metodologías distintas para seleccionar las poblaciones de estudio, cuyo diseño está ilustrado en la **Figura 4**:

- 1) Método 1. Se seleccionaron las células con morfología linfoide (poca granularidad y poco tamaño) y posteriormente las células en las regiones CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> y CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>, para las CTH y CPH respectivamente ( $n = 3$ ). Ambas poblaciones se obtuvieron de una misma muestra procesada de SCU.
- 2) Método 2. Se seleccionaron las células con morfología linfoide (poca granularidad y poco tamaño), luego aquellas células en la región DyeCycle<sup>+</sup> (células vivas), y finalmente las

células en las regiones CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> o CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>, para las CTH o CPH respectivamente ( $n = 8$ , 4 para cada población). Cada población se obtuvo de una muestra procesada de SCU distinta.

Por medio de cell sorting, las poblaciones simple positiva o troncal (CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>) y la doble positiva o progenitora (CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>) fueron sembradas a diferentes densidades en placas de 96 pozos de fondo en forma de U ( $0.32\text{cm}^2$ ), o en placas de pozos con fondo plano ( $0.95\text{cm}^2$ ), dependiendo del experimento. Las densidades utilizadas en ambos casos fueron: 1, 10, 100 y 1000 células por pozo.

### 6.3 Cultivos celulares *in vitro*

Las células fueron incubadas en medio de cultivo Stemspan, con las citocinas IL-6, FL3, TPO y SCF (10 ng/ml) a una temperatura de 37°C, durante 21 días. El volumen de cultivo en las condiciones de 1 y 10 células fue de 50µl, para 100 células fue 100µl, y para 1000 células fue 200µl por pozo. Para prevenir la muerte celular por una elevada densidad celular, los cultivos de 1000 células fueron divididos en dos pozos de igual superficie ( $0.32\text{cm}^2$ ) al día 7 o el total de células se trasladó a pozos más grandes ( $0.95\text{cm}^2$ ) ( $n = 8$ ).

### 6.4 Conteo celular

Durante los días 0, 7, 14 y 21, se determinó el número de células en cada pozo de cada condición utilizando diluyente de Turk y la viabilidad celular fue determinada utilizando azul de tripano. En algunas ocasiones, principalmente en las condiciones de 1 y 10 células/pozo, el número celular era demasiado bajo para poder ser contado en un hematocitómetro. Para ello, se evaluaron el total de células con ayuda de fotografías analizadas con el programa ImageJ.

El incremento en veces se obtuvo al dividir el número celular de un pozo entre el número celular inicial -1,10,100,1000- según sea el caso. Los pozos proliferativos son aquellos cuyo incremento en veces es mayor a 1.1 con respecto al número celular inicial en cada condición -2, 11, 110 y 1100 células- en cada condición, respectivamente.

### 6.5 Ensayos de colonias

Se colocó un determinado número celular, que dependió de la cantidad de células encontradas en cada pozo, en un medio semisólido de metilcelulosa a una temperatura de 37°C por dos semanas. Si la población en el pozo del cultivo celular era menor a 500 células, toda la población se colocaba en un volumen de 100µl/pozo de metilcelulosa. Si la población era mayor a 500 células, se realizaba el cálculo para colocar únicamente 500 células en 500 µl/pozo de metilcelulosa. Una vez transcurrido el periodo de dos semanas, se realizó el conteo de colonias. Estas fueron clasificadas, dependiendo de su tamaño, color y composición, en granulocíticas, monocíticas, granulo-monocíticas, eritroides y mixtas. Cada colonia es originada por una célula progenitora existente al momento del inicio del ensayo, por lo que esta metodología determina el número de progenitores de una muestra. Debido a que no todos los ensayos tuvieron la misma cantidad celular al momento de sembrarlas, los datos se compararon por medio del porcentaje de formación de colonias con respecto al número celular inicial.

### 6.6 Ensayos de morfología celular

El volumen del cultivo (no mayor a 50 µl) fue centrifugado en CYTOSpin a 1000rpm por 5 minutos. Posteriormente, las laminillas fueron teñidas por medio del colorante Wright-Giemsa para evaluar el estado de maduración y el tipo celular de las poblaciones en las diferentes condiciones. Las células eran clasificadas, dependiendo de su tamaño, su granularidad y su tinción, como: i) linfocitoides o

primitivas, ii) blastocitos mieloides monocíticos y iii) granulocíticos, iv) blastocitos eritroides, v) células mieloides maduras monocíticas y vi) granulocíticas.

## 6.7 Estadística

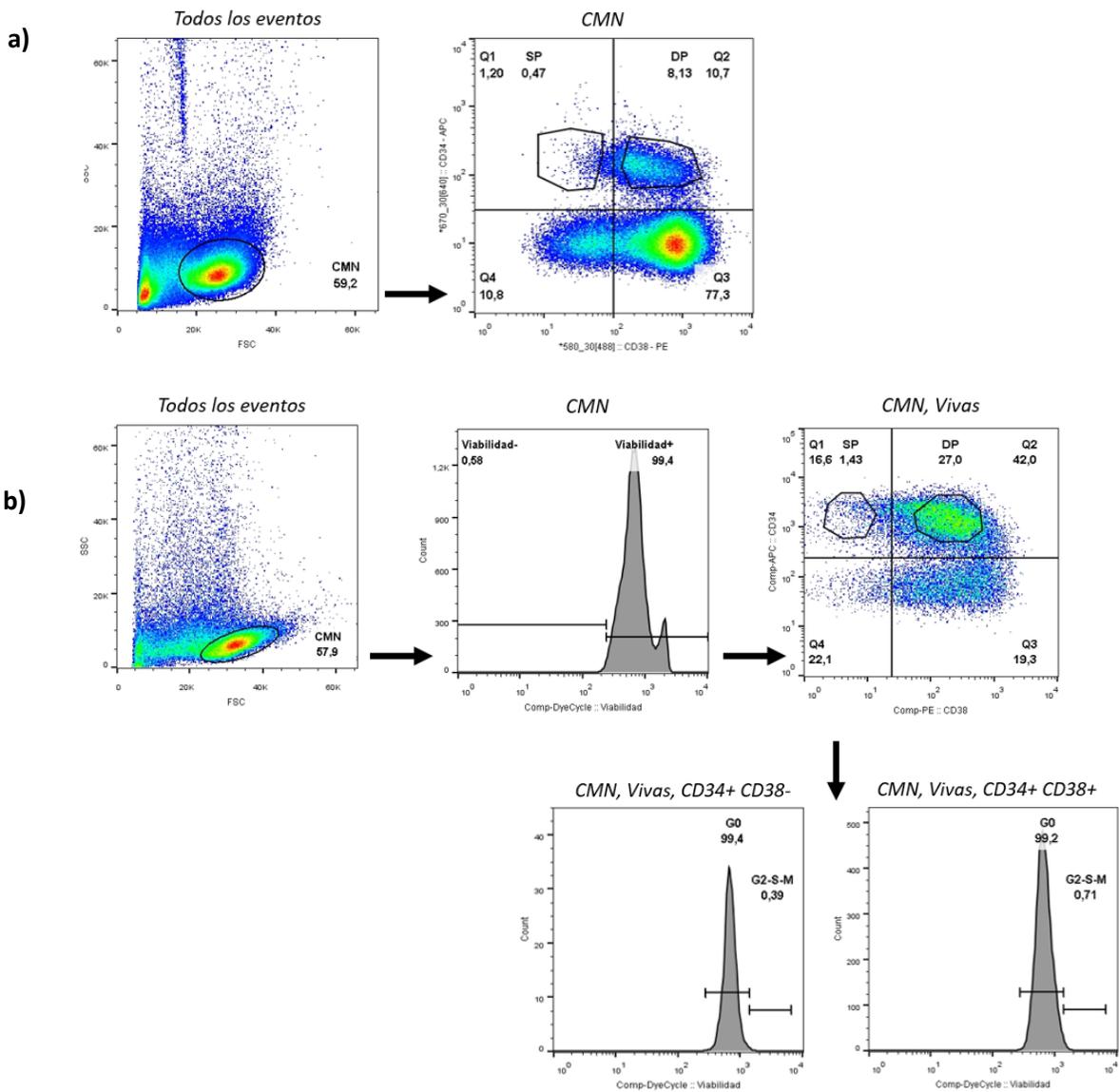
Los análisis estadísticos fueron realizados con los programas Microsoft Excel y GraphPad Prism 9.5 (versión 9.9). Se empleó la prueba de t y análisis de varianza (ANOVA) o modelo de efectos mixtos. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de  $p < 0.05$ . Los resultados presentados en las gráficas son el promedio  $\pm$  SEM.

## 7. Resultados

### 7.1 Enriquecimiento y obtención de las poblaciones celulares purificadas

Los resultados en este trabajo fueron obtenidos de 13 muestras de SCU humana. Para evaluar el efecto de la densidad en las diferentes características de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas, se enriqueció la población linaje negativo ( $Lin^-$ ) a partir de CMN, de donde se purificaron las poblaciones  $CD34^+ CD38^-$  (CTH) y  $CD34^+ CD38^+$  (CPH).

Las primeras 5 muestras procesadas fueron utilizadas para 3 experimentos en los que se purificaron ambas poblaciones celulares de una misma muestra (*Método 1*) (**Fig.4a**). En la **Tabla 1** se muestran los porcentajes de recuperación de las poblaciones purificadas con respecto al total de CMN detectadas por citometría, los cuales fueron de  $0.27 \pm 0.28\%$  y  $21.28\%$  para CTH y CPH, respectivamente. La población de CTH era muy reducida, por lo que en los primeros experimentos no se obtuvieron células suficientes para la condición de 1000 células/pozo.

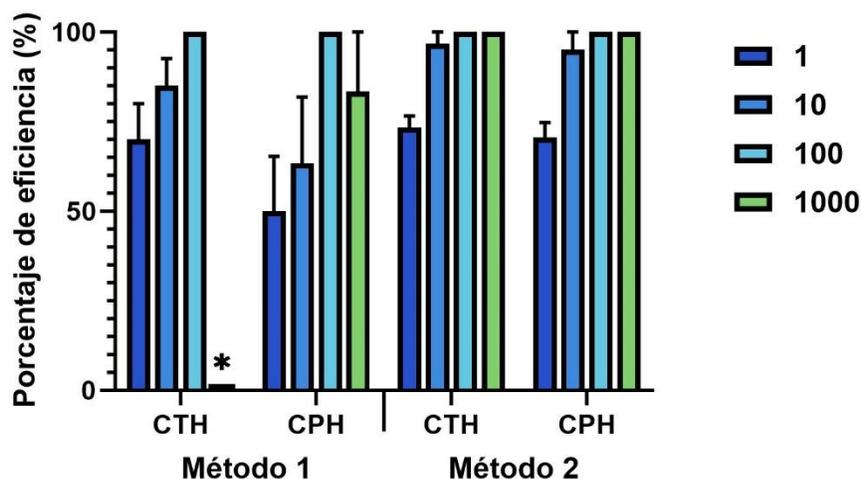


**Figura 4.** Paneles representativos del diseño de citometría de flujo de ambas metodologías. Las células mononucleares tienen una morfología similar a los linfocitos, lo cual permite ubicarlas con base en su granularidad (SSC: side scatter) y su tamaño (FSC: forward scatter); a partir de esta primera localización, se seleccionaron las poblaciones CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> (CTH) y CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> (CPH). a) Método 1, b) Método 2, que incluyó la selección de células vivas previo a las poblaciones celulares, y el análisis del contenido de DNA. CTH: Células troncales hematopoyéticas, CPH: Células progenitoras hematopoyéticas.

Una vez que las células fueron sembradas a las distintas densidades después de ser seleccionadas por citometría de flujo, se comprobó su presencia en los pozos de cultivo de manera visual. Denominamos porcentaje de eficiencia al porcentaje de pozos en los que se confirmó la presencia de células (**Fig. 5**). Se observaron células en el  $70 \pm 17.32\%$  de los pozos de la condición de 1 célula/pozo y  $87.5 \pm 13.29\%$  de la condición de 10 células/pozo en las CTH. En el caso de las CPH, el  $50 \pm 26.4\%$  de los pozos de 1 célula/pozo,  $63.3 \pm 32.1\%$  de los de 10 células/pozo y  $83.3 \pm 28.86\%$  de los de 1000 células/pozo fueron confirmados con presencia de células. En el 100% de los pozos de la condición de 100 células/pozo de las CTH y CPH se encontraron células.

Características	Método 1 <i>n</i> = 3	Método 2 <i>n</i> = 6
Región indicada para CMN (%)	$40.6 \pm 16.15$	$18.87 \pm 17.85$
Células vivas (DyeCycle+) (%)	--	$93.92 \pm 5.54$
CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> (%)	$0.27 \pm 0.28$	$1.5 \pm 1.41$
CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> (%)	$21.28 \pm 14.98$	$29.07 \pm 10.58$

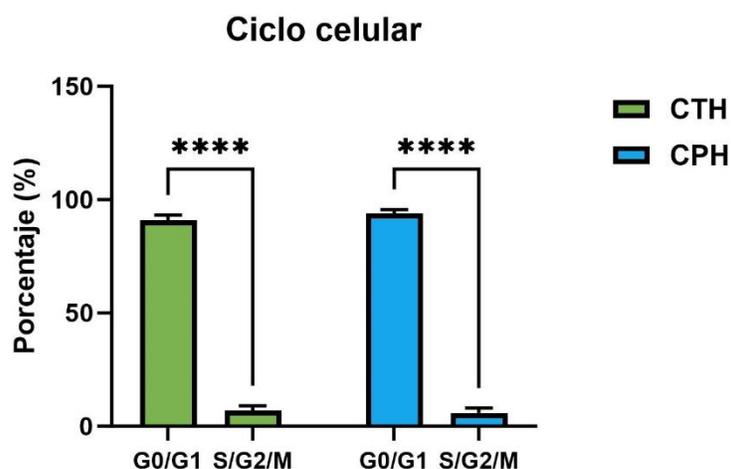
**Tabla 1.** Características de las regiones analizadas por citometría en distintas metodologías. Se presenta el promedio y el error estándar de 3 y 6 experimentos, cada método respectivamente. Prueba de t con la corrección de Welch y se consideraron diferencias significativas a partir de  $p < 0.05$ .



**Figura 5.** Porcentaje de pozos que fueron confirmados con la presencia de células de forma visual después de ser sembrados por citometría de flujo. CTH: células troncales hematopoyéticas; CPH: células progenitoras hematopoyéticas. Método 1, aislando las dos poblaciones celulares en de una misma unidad de SCU ( $n = 3$ ). Método 2, aislando cada población celular de una muestra distinta de SCU y agregando el colorante de viabilidad DyeCycle al panel de citometría ( $n = 4$ ). Se reporta el promedio y error estándar. \* No hay datos de 1000 células/pozo de CTH en el Método 1. ANOVA de dos vías, con diferencias significativas de  $p < 0.5$ .

Habiendo la posibilidad de que se estuvieran sembrando células no viables que expresaran en su membrana los marcadores elegidos, las siguientes 8 muestras se utilizaron en 4 experimentos distintos para seleccionar únicamente a la población CTH o la población CPH de cada muestra de SCU para evitar posibles daños por manejo, además de agregar un marcador de viabilidad al panel de citometría (*Método 2*). El colorante Vybrant DyeCycle Violet es una sustancia permeable a la membrana celular que se une a las cadenas de DNA de células vivas, y que no es citotóxico, por lo que nos permitió asegurar la viabilidad celular al momento de sembrarlas en cultivo. Con estos cambios, el porcentaje de recuperación de CTH aumentó a  $1.5 \pm 1.41\%$  y  $29.07 \pm 10.58\%$  (**Tabla 1**), lo cual se encuentra en el intervalo reportado previamente por nuestro grupo de investigación y en la literatura mundial [89]. Además, con estos cambios en la metodología se incrementó el porcentaje de eficiencia pasando a  $73.3 \pm 5.77\%$  de pozos de la condición de 1 célula/pozo,  $96.6 \pm 5.77\%$  de 10 células/pozo de CTH, mientras que para las CPH fue de  $70.5 \pm 8.42\%$  de 1 célula/pozo, y  $95 \pm 10\%$  de 10 células/pozo (**Fig.5**). El 100% de los pozos en las condiciones de 100 y 1000 células/pozo de CTH y CPH fueron confirmados con células. A pesar de que los datos del porcentaje de recuperación y de eficiencia no son significativos, la certeza de la viabilidad celular al inicio del cultivo permitió una mayor supervivencia a lo largo de los experimentos.

Además, el colorante de viabilidad nos permitió evaluar la etapa del ciclo celular en el que se encontraban las poblaciones de interés, basado en el contenido de DNA (**Fig.6**). Se observó que más del 90% de las células, tanto CTH como CPH, se encuentran en fase G0/G1.

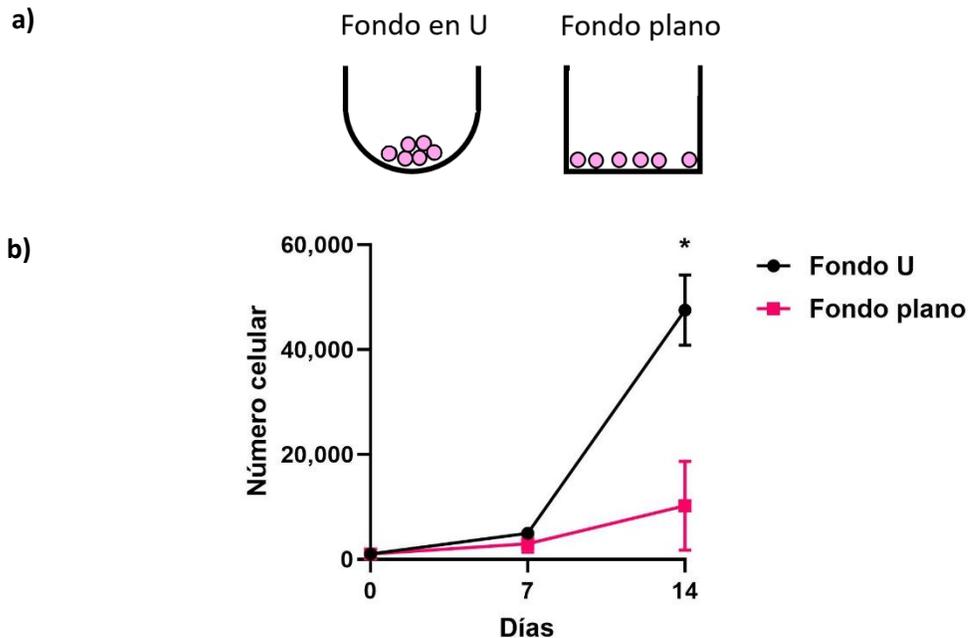


**Figura 6.** Fase del ciclo celular de las poblaciones purificadas (CTH y CPH) basado en el contenido de DNA detectado con el colorante de viabilidad ( $n = 7$ ). Se reporta promedio y error estándar. ANOVA de dos vías. \*\*\*\*Diferencia significativa  $p < 0.0001$ .

## 7.2 Proliferación celular

Las células obtenidas por selección mediante citometría de flujo fueron sembradas a diferentes densidades en cultivo. Debido a que el número celular utilizado en este trabajo fue muy bajo, medimos la proliferación en dos tipos de fondo de pozo de cultivo para evaluar si el espacio afectaba la tasa de respuesta. Para ello, sembramos 1000 células/pozo de la población CTH en pozos de fondo plano y pozos de fondo U (placas de 96 pozos) durante 14 días, con las características de cultivo empleadas para el resto de los ensayos (ver Metodología) (**Fig.7**). Visualmente, las células

sembradas en pozos con fondo plano se dispersaron a lo largo del mismo, mientras que en pozos de fondo U se concentraron en el fondo del pozo (**Fig.7a**). La **Figura 7b** muestra las cinéticas de cultivo de ambas condiciones, donde encontramos que la proliferación fue más alta cuando las células fueron sembradas en pozos de fondo U, es decir, en un espacio que las mantiene juntas los primeros días de cultivo.



**Figura 7. Efecto del tipo de fondo de pozo en la proliferación celular.** a) Esquema de la distribución celular en los distintos pozos, donde en los pozos de fondo U las células se concentran en el fondo, mientras que en los pozos de fondo plano se encuentran dispersas a lo largo de la superficie. b) Número celular en cultivo a lo largo del tiempo en cada tipo de pozo ( $n = 2$ ). Se reporta promedio y error estándar. ANOVA de dos vías. \*Diferencia significativa  $p = 0.0315$ .

Una vez establecido el tipo de pozo a utilizar (fondo U), se evaluó la proliferación de las dos poblaciones celulares purificadas durante 21 días (**Fig.10,11 y 12**). Definimos proliferación como el incremento del número celular final obtenido con respecto al número celular inicial, sin importar el fenotipo de las células. La proliferación es expresada de forma cuantitativa por el incremento en veces (IV), que evalúa la relación del número celular final con respecto al número de células sembradas al día cero. Entonces, un IV menor o igual a 1 indicaría que la población no proliferó o se mantuvo sin cambios, mientras que un IV mayor a 1 significaría que existió proliferación. En las **Figuras 8 y 9** se muestran imágenes de los cultivos de ambas poblaciones en todas las condiciones a lo largo del tiempo.

En la población de CTH, hubo proliferación en todas las densidades celulares (**Fig.10a**). En la densidad de 1 célula/ pozo, el punto máximo de proliferación se alcanzó al día 7, con un incremento en veces promedio de  $44.2 \pm 8.99$ , a partir del cual la proliferación decayó, hasta llegar a  $21.21 \pm 21.21$  al día 21. En las densidades de 10, 100 y 1000 células por pozo, el punto máximo se alcanzó en el día 14, con un incremento en veces de  $240.2 \pm 113.5$ ,  $90.8 \pm 70.6$  y  $28.8 \pm 18.6$ ,

respectivamente. En la densidad de 10 células por pozo, la proliferación se mantuvo hasta el día 21, mientras que para las densidades de 100 y 1000 el IV decayó hasta 10 y 6.9 al día 21, respectivamente.

CTH

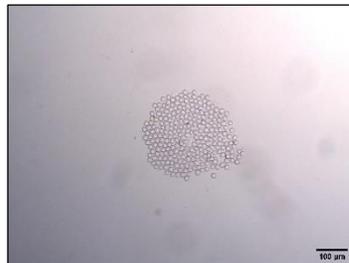
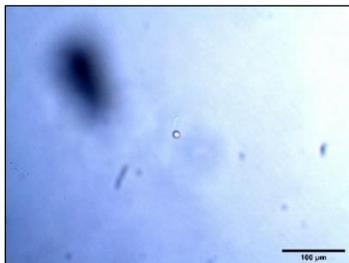
Día 0

Día 7

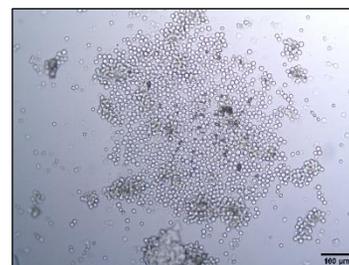
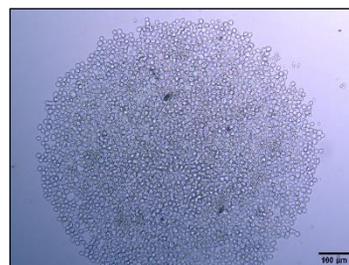
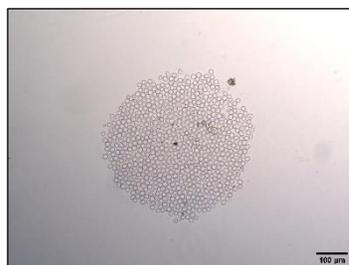
Día 14

Día 21

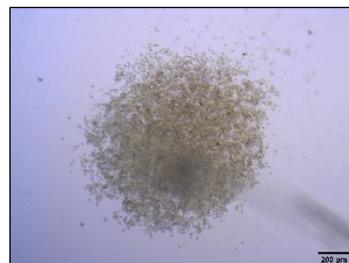
1



10



100



1000



Figura 8. Imágenes representativas de los cultivos de CTH en las diferentes condiciones a lo largo del tiempo.

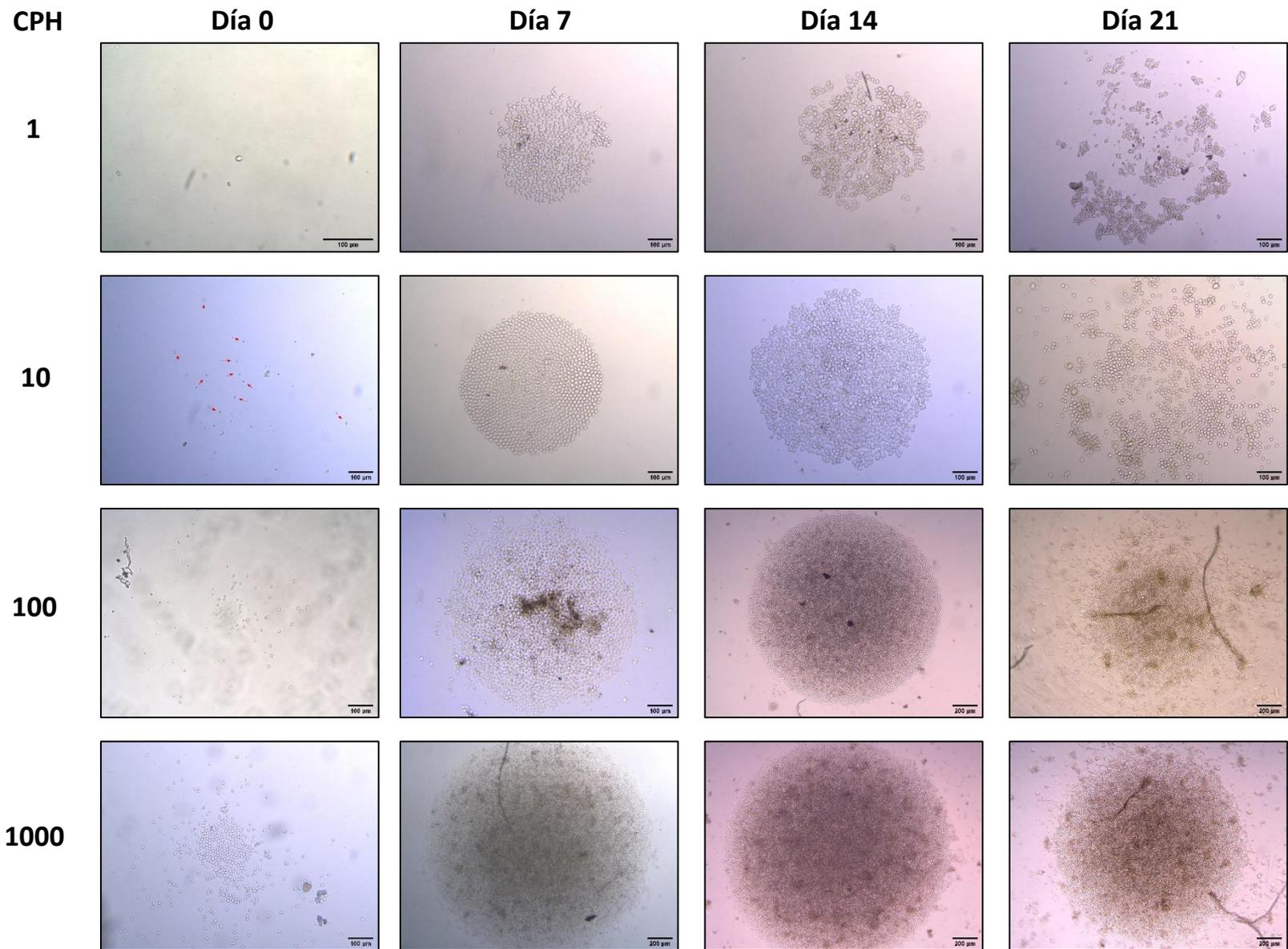
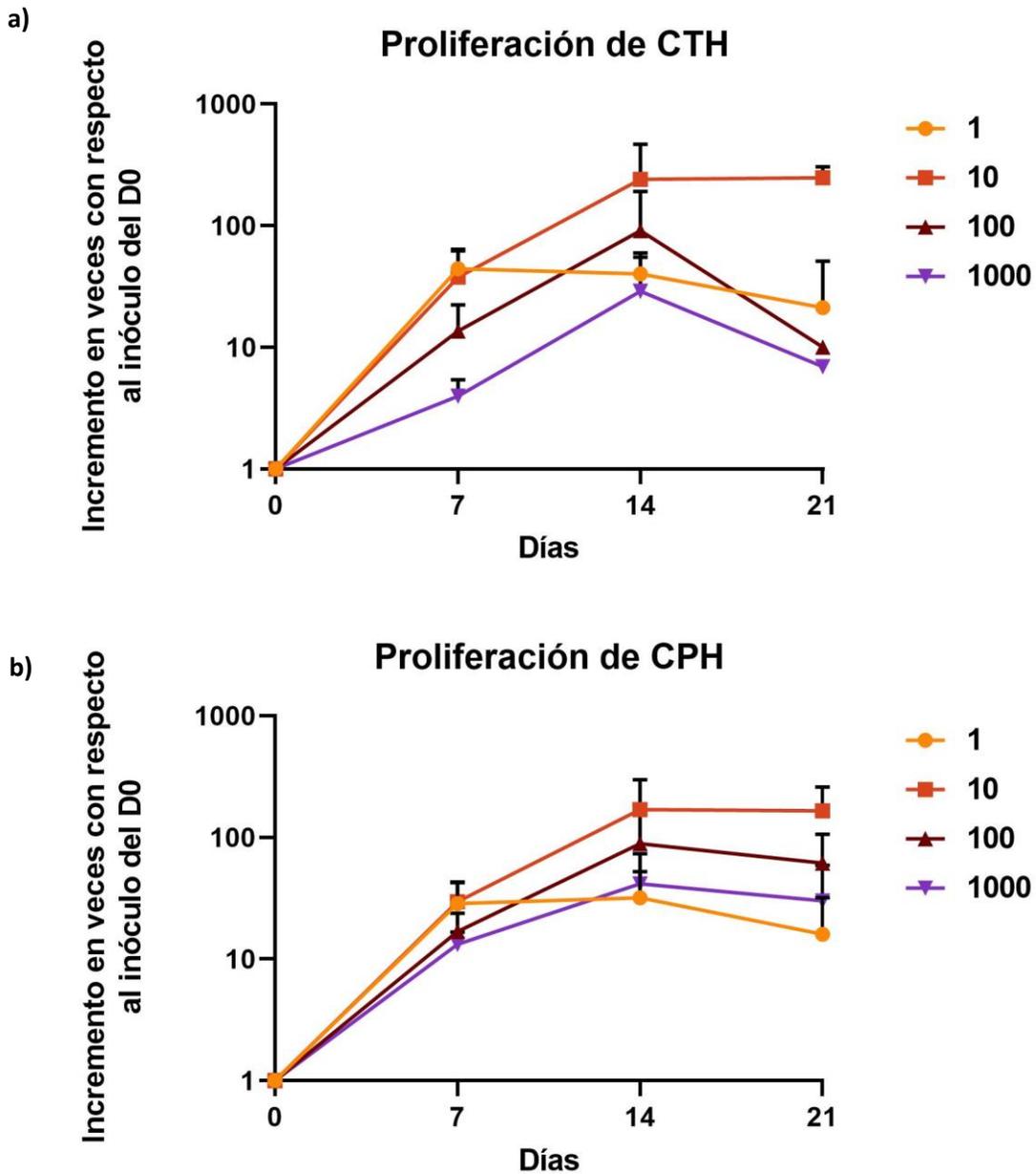


Figura 9. Imágenes representativas de los cultivos de CPH en las diferentes condiciones a lo largo del tiempo.



**Figura 10. Efecto de la densidad celular inicial en la proliferación celular.** Incremento en veces (IV) del número celular en cultivo a lo largo del tiempo de cada densidad celular (1,10,100,1000) en a) la población de CTH ( $n = 4$ ) y b) de CPH ( $n = 4$ ). La gráfica se presenta en escala logarítmica. Se reporta promedio y error estándar. Modelo de efectos mixtos. \* Diferencia significativa  $p = 0.0328$ .

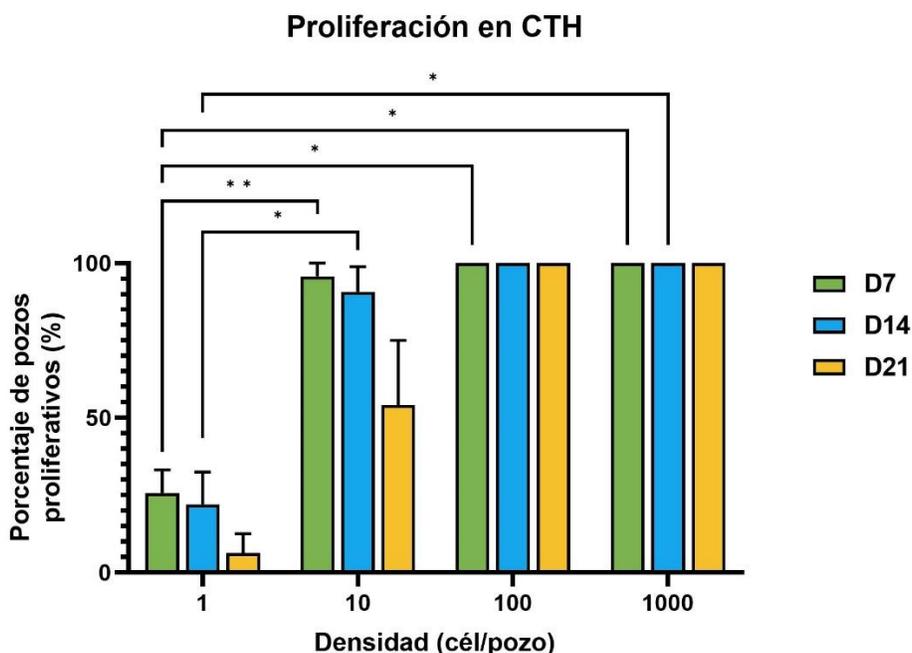
Para la población de CPH, hubo proliferación en todas las densidades celulares (**Fig.10b**) y todas alcanzaron su punto máximo de proliferación al día 14, con un IV de  $31.9 \pm 20.3$  en 1 célula/pozo,  $168.9 \pm 128.2$  en 10 células/pozo,  $88.8 \pm 75.3$  en 100 células/pozo y  $41.5 \pm 32.05$  en 1000 células/pozo. Este IV no disminuyó significativamente para el día 21.

Ahora bien, los datos presentados en la **Figura 10** corresponden al promedio de la proliferación de todos los pozos sembrados al día cero. Sin embargo, se observó un número constante de pozos en cada experimento que no proliferó (tuvo un IV igual o menor a 1). Por ello, para calcular el porcentaje de pozos que consideramos como proliferativos, se tomaron en cuenta aquellos cuyo IV fue mayor a 1.1, esto es, los pozos tenían más de 2, 11, 110 y 1100 células, con respecto a la densidad inicial (**Fig.11**).

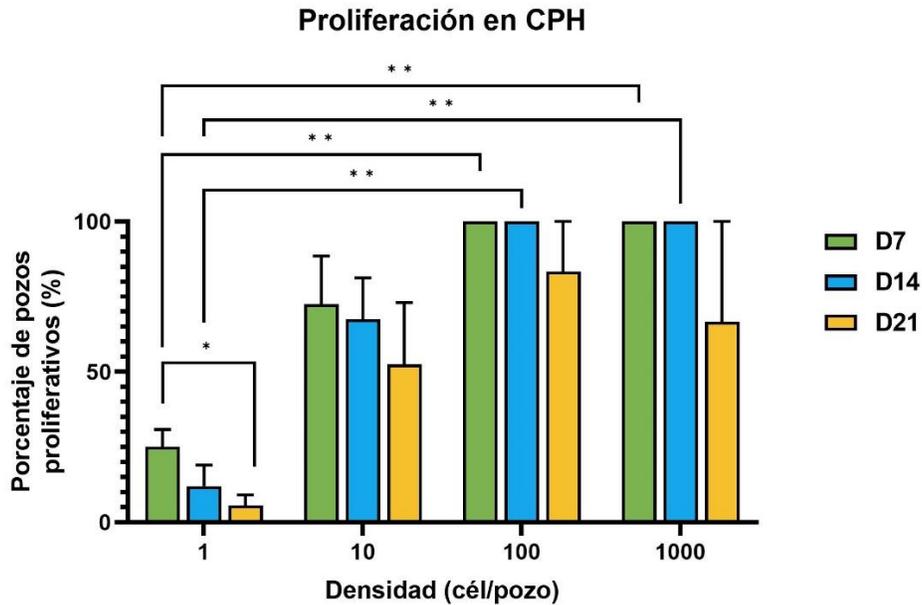
Con este enfoque, el porcentaje de pozos proliferativos de la población de CTH se incrementó conforme aumentó la densidad celular inicial (**Fig.11a**). En la condición de 1 célula/pozo, únicamente el  $25.7 \pm 7.5\%$  de los pozos fueron positivos a proliferación al día 7, mientras que en la condición de 10 células/pozo, el  $95.8 \pm 4.1\%$  de los pozos proliferó. Sin embargo, estos porcentajes disminuyeron con el tiempo, hasta llegar a  $6.25 \pm 6.2\%$  y  $54.1 \pm 20.8\%$ , respectivamente para el día 21. En contraste, el 100% de los pozos de las condiciones de 100 y 1000 células/pozo se consideraron proliferativos al día 7 y el porcentaje se mantuvo hasta el día 21.

En el caso de la población de CPH, el porcentaje de pozos proliferativos también aumentó conforme se incrementó con la densidad de sembrado inicial (**Fig.11b**). Pero a diferencia de las CTH, cuya respuesta proliferativa disminuyó con el tiempo en las densidades menores, para las CPH el porcentaje disminuyó con el tiempo en todas las densidades. En las condiciones de 100 y 1000 células/pozo, el porcentaje disminuyó del 100% hasta  $83.3 \pm 16.6\%$  y  $66.6 \pm 33.3\%$  al día 21, respectivamente.

a)



b)

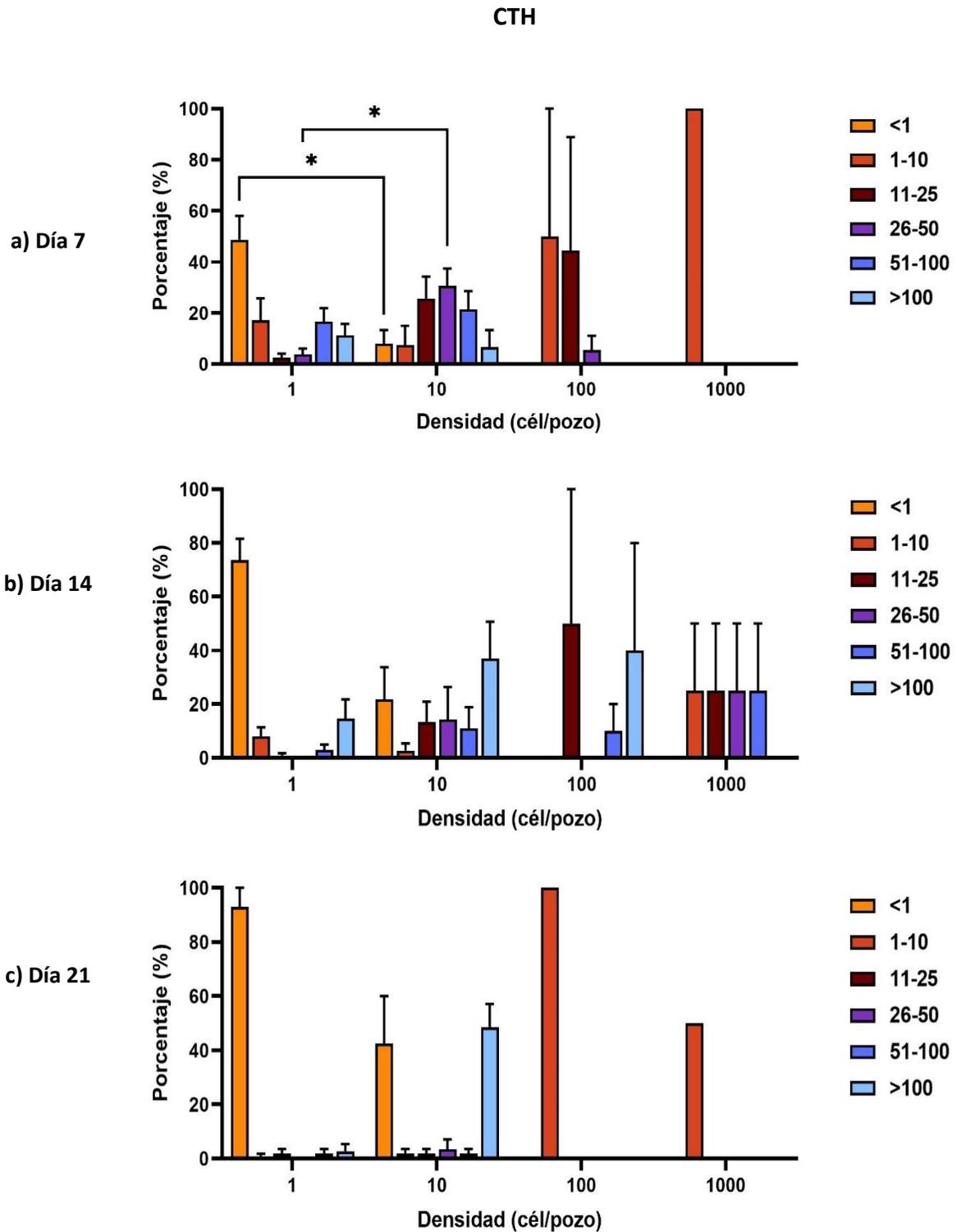


**Figura 11. Porcentaje de pozos proliferativos en cultivo.** Porcentaje de pozos proliferativos de a) la población de CTH ( $n = 4$ ) y b) población de CPH ( $n = 4$ ), definido como aquellos con un IV igual o mayor a 1.1. D: Día; cél/pozo: célula/pozo. Se reporta promedio y error estándar. Modelo de efectos mixtos. \*Diferencia significativa  $p < 0.0332$ , \*\*  $p < 0.0021$ .

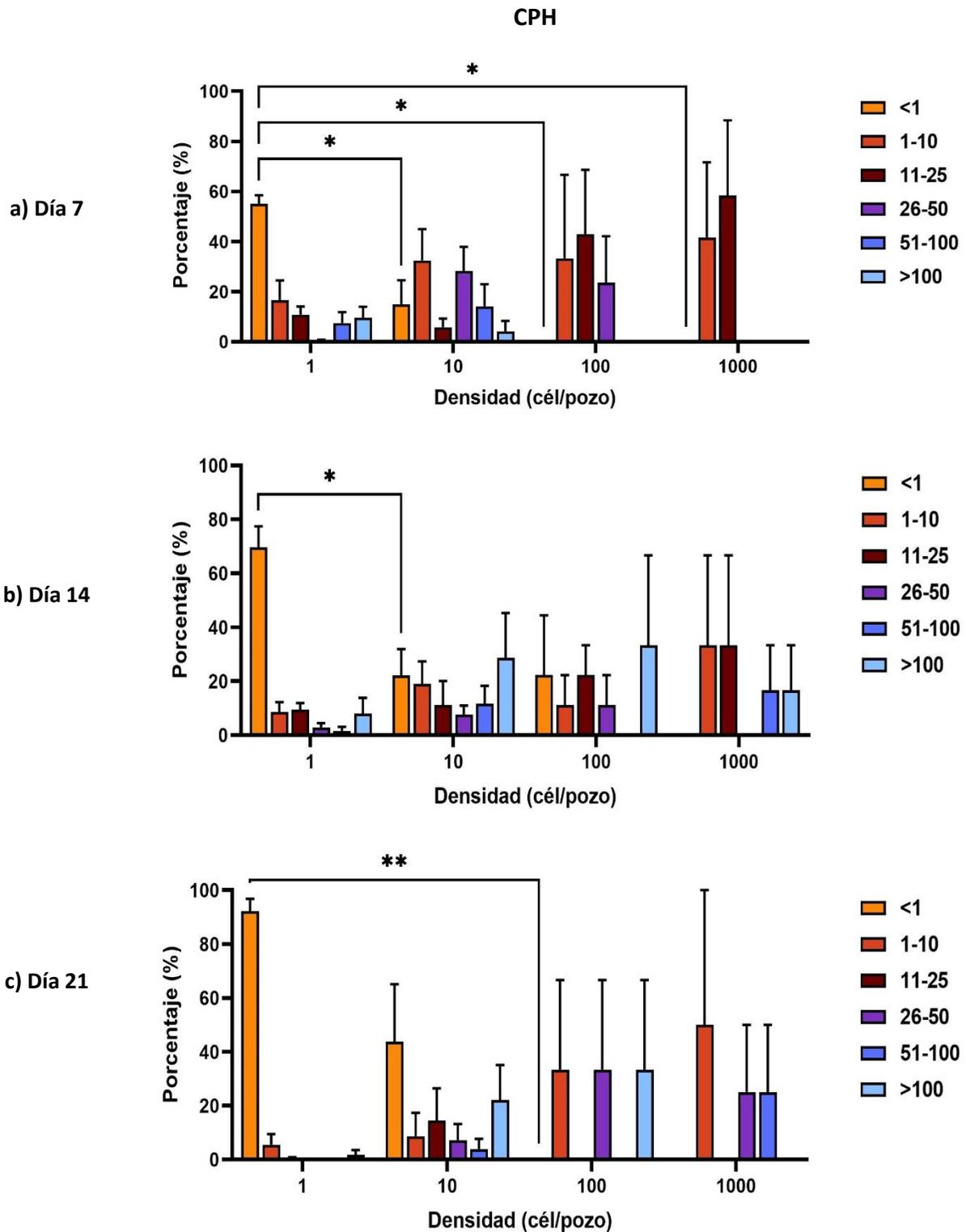
A pesar de que las poblaciones purificadas eran inmunofenotípicamente homogéneas con los marcadores que utilizamos, hubo grandes diferencias en la respuesta entre pozos de las mismas densidades celulares. Por ello, los datos obtenidos fueron agrupados en histogramas con respecto al incremento en veces observado en cada densidad celular (**Fig.12 y 13**).

La presencia de pozos que no proliferaron solo se detectó en las densidades bajas de ambas poblaciones celulares a lo largo del cultivo. Al día 7, la mitad de los pozos de la condición de 1 célula/pozo tuvieron un IV menor a 1 (el  $49 \pm 19\%$  para CTH y  $55 \pm 7\%$  para CPH) mientras que solo el  $8 \pm 11\%$  (CTH) y el  $15 \pm 19\%$  (CPH) en 10 células/pozo lo tuvieron (**Fig.12a y 13a**). El resto de los pozos se distribuyó en distintos rangos de IV, pudiendo incluso alcanzar IV de más de 100.

En contraste, en las densidades de 100 y 1000 células/pozo al día 7 no se registraron pozos con IV menor a 1, pero tampoco se registraron pozos con IV mayor a 100, sino que se mantuvieron predominantemente en un rango de 1 a 50 (**Fig.12a y 13a**). Para el día 21, el porcentaje de pozos que no proliferaron a densidades bajas aumentó en ambas poblaciones (**Fig.12c y 13c**). Durante todo el cultivo, en las densidades menores la heterogeneidad fue más notoria, ya que encontramos pozos con IV muy diversos en CTH y CPH, datos que no se registraron en las densidades altas.



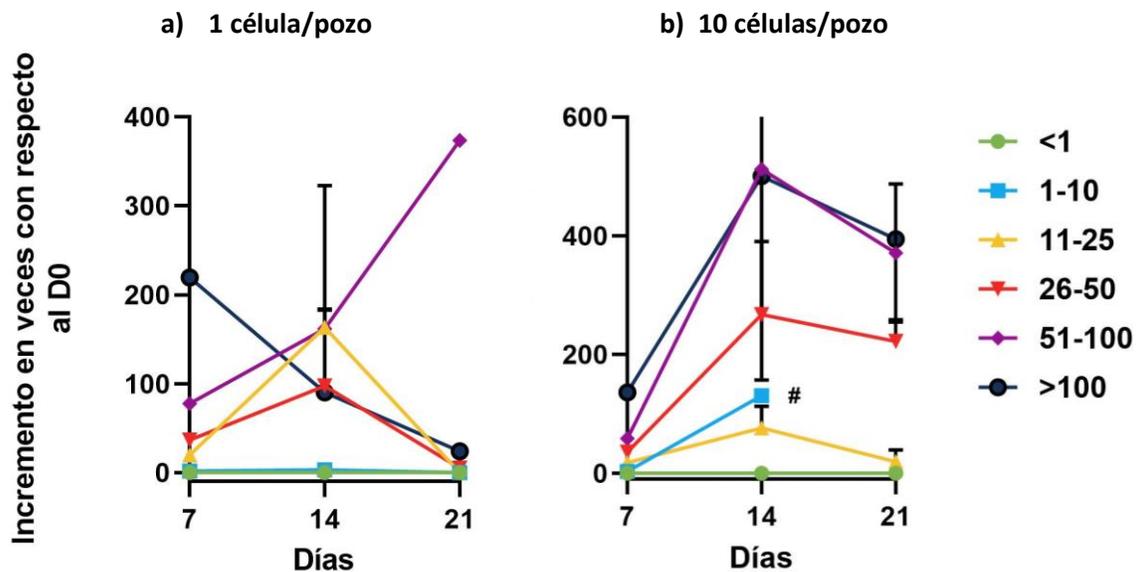
**Figura 12. Porcentaje de pozos con un IV determinado en cultivo de CTH.** Histogramas de IV de la población de CTH a lo largo del tiempo y en las distintas condiciones a) al día 7, b) día 14 y c) día 21 ( $n = 4$ ). Cél/pozo: célula/pozo. Se reporta promedio y error estándar. Modelo de efectos mixtos. \*Diferencia significativa  $p < 0.0332$ .



**Figura 13. Porcentaje de pozos con un IV determinado en cultivo de CPH.** Histogramas de IV de la población de CPH a lo largo del tiempo y en las distintas condiciones a) al día 7, b) día 14 y c) día 21 ( $n = 4$ ). Cél/pozo: célula/pozo. Se reporta promedio y error estándar. Modelo de efectos mixtos. \*Diferencia significativa  $p < 0.0332$ .

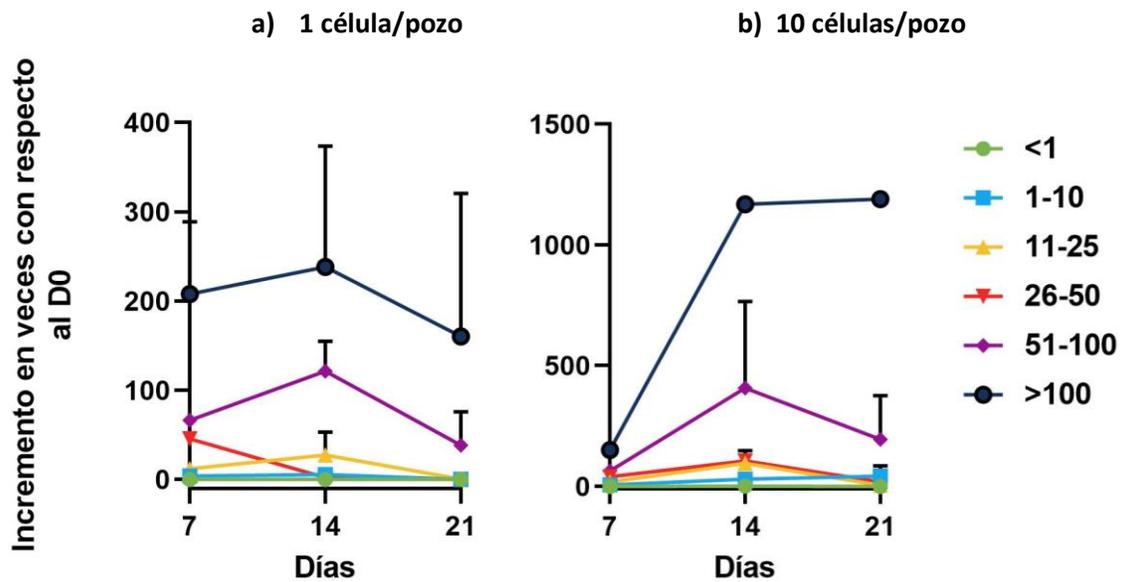
Para evaluar si el tipo de respuesta observado a los 7 días influyó en su comportamiento posterior en cultivo, seguimos los pozos de las densidades menores agrupándolos según el IV registrado al día 7 (**Fig.14 y 15**). En el caso de las CTH, podemos observar que los pozos de 1 célula/pozo con un IV menor a 1 o entre 1 y 10 veces no proliferaron en los días posteriores (**Fig.14a**). Los pozos cuyo IV al día 7 se encontró entre 10 y 25 y entre 25 y 50 veces proliferaron para el día 14 y abruptamente decayeron para el día 21. Los pozos cuyo IV fue entre 50 a 100 veces al día 7 fueron los únicos que aumentaron su número celular durante el resto del cultivo, alcanzando un IV de 373.5 para el día 21. Sin embargo, los pozos cuyo IV fue mayor a 100 no proliferaron, registrando un IV de 24.1 al día 21.

Por otro lado, en la condición de 10 células/pozo, mientras mayor IV hubo al día 7, mayor proliferación al día 14, incluso aquellos cuyo IV fue de más de 100, que lograron alcanzar un incremento de  $512.4 \pm 615.7$  (**Fig.14b**). Sin embargo, todos los pozos en esta condición disminuyeron la proliferación para el día 21.



**Figura 14. Proliferación de los pozos de CTH agrupados según el IV registrado al día 7.** ( $n = 4$ ). Se reporta promedio y error estándar. # Datos del IV del grupo de 1-10 veces al día 21 no determinados. Modelo de efectos mixtos.

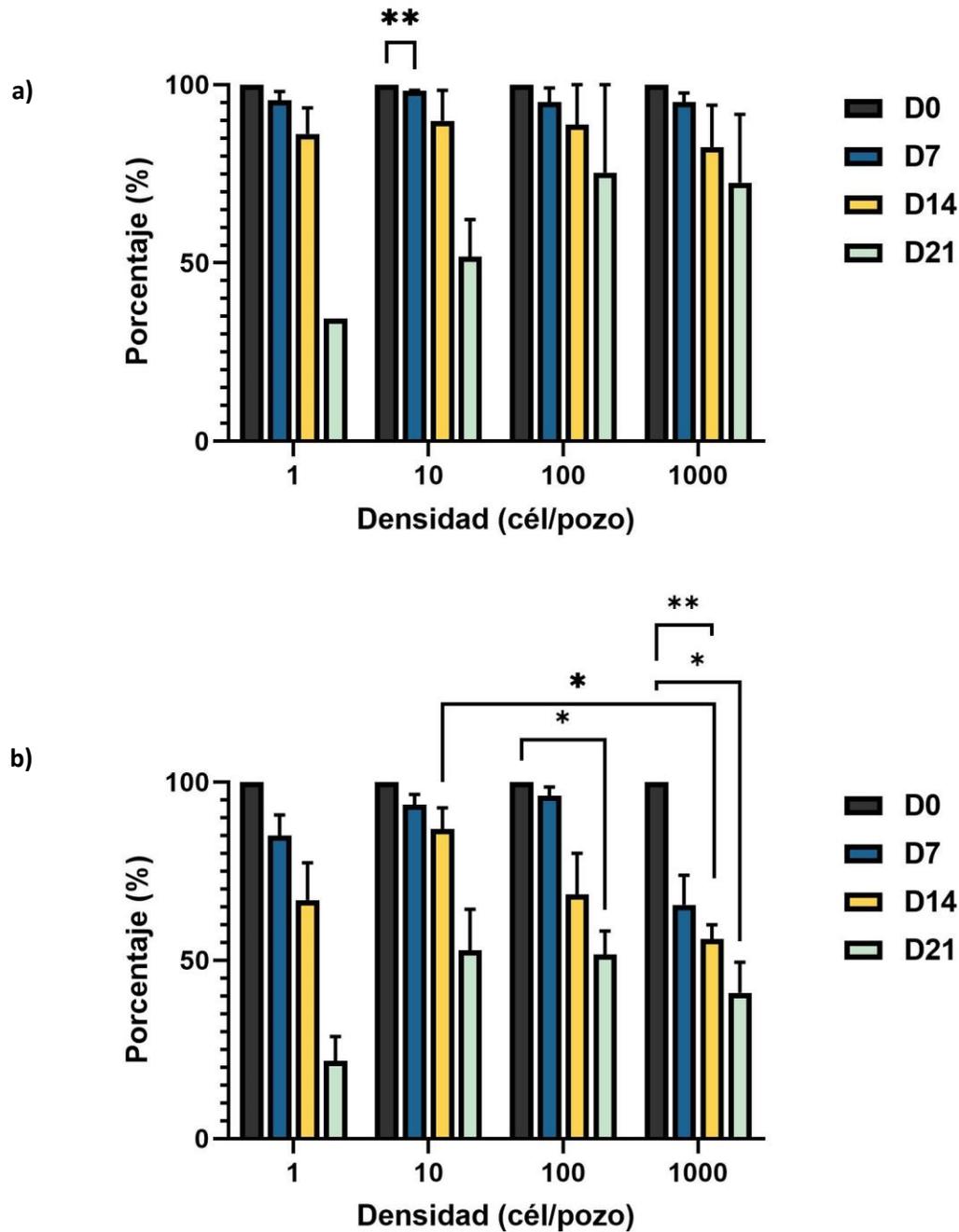
Para la población de CPH ocurrió el mismo fenómeno en los pozos de 1 y 10 células/pozo: mientras más alto fuera el incremento en los primeros 7 días, mayor la respuesta al día 14 (**Fig.15**). Para el día 21, independientemente de la tasa de proliferación inicial, el IV de todos los pozos decayó.



**Figura 15. Proliferación de los pozos de CPH según su IV al día 7.** ( $n = 4$ ). Se reporta promedio y error estándar. Modelo de efectos mixtos.

También se midió la viabilidad de los pozos que proliferaron en ambas poblaciones (**Fig.16**). La metodología seguida para la selección de las dos poblaciones celulares aseguraba que el 100% de las células se encontraban vivas al momento de ser sembradas al día cero. En todas las condiciones de CTH, la viabilidad se mantuvo arriba del 90% al día 7, pero disminuyó con el tiempo: en las condiciones de 1 y 10 células/pozo, la viabilidad alcanzó menos del 50%, mientras que llegó a 68% en las condiciones de 100 y 1000 células/pozo, para el día 21 (**Fig.16a**).

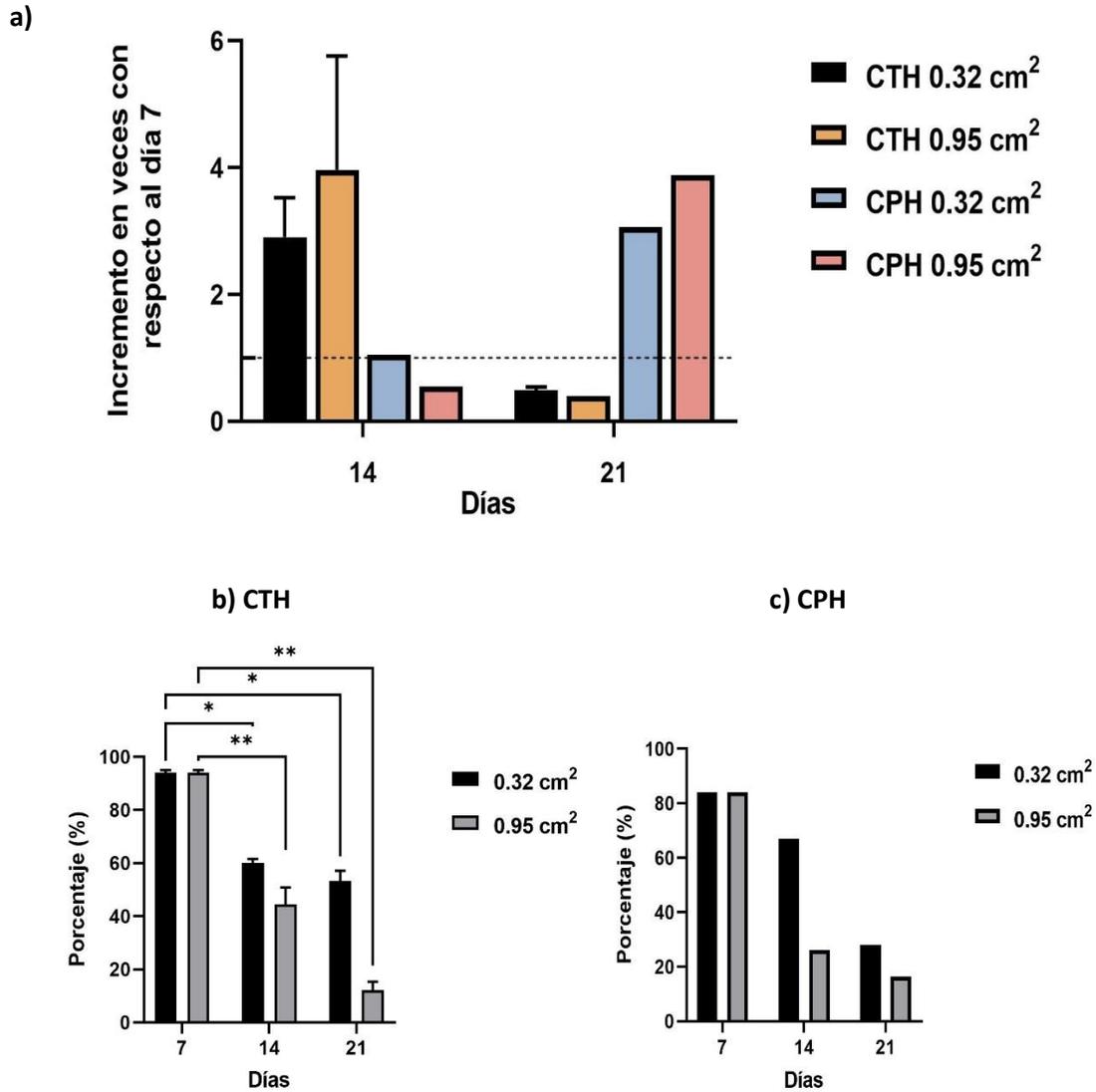
En la población de CPH, la viabilidad se mantuvo arriba del 80% en las condiciones de 1, 10 y 100 células/pozo al día 7, y disminuyó paulatinamente a lo largo del tiempo (**Fig.16b**). Sin embargo, en el caso de la densidad de 1000 células/pozo, la viabilidad se mantuvo en poco más de 50% durante todo el cultivo. Estos resultados demuestran que las poblaciones de CTH y CPH disminuyeron su viabilidad de manera independiente a la densidad celular, pudiendo ser esta una característica intrínseca de las poblaciones.



**Figura 16. Viabilidad celular en cultivo.** Porcentaje de viabilidad en a) la población de CTH ( $n = 4$ ) y b) la población de CPH ( $n = 4$ ) a lo largo del tiempo en las distintas densidades celulares. Se reporta promedio y error estándar. Modelo de efectos mixtos. \*Diferencia significativa  $p < 0.0332$ , \*\*  $p < 0.0021$ .

Para evaluar si la superficie de cultivo afectaba la viabilidad celular, dividimos en dos el número de células recuperadas de algunos pozos de 1000 células/pozo al día 7 (para ambas poblaciones) y sembramos cada mitad en pozos de  $0.32 \text{ cm}^2$  y  $0.95 \text{ cm}^2$ , respectivamente (**Fig.17**). Los resultados de cada población fueron muy distintos. En el caso de las CTH, no hubo diferencias significativas entre mantener las células en pozos de  $0.32 \text{ cm}^2$  y cambiarlas a pozos de mayor superficie, debido

a que mostraron un IV similar en ambas condiciones en los días 14 y 21 (**Fig.17a**). Sin embargo, aunque la viabilidad fue de  $94.05 \pm 2.13\%$  al día 7, en los pozos de  $0.32 \text{ cm}^2$  disminuyó a  $53.34 \pm 6.57\%$  al día 21, mientras que alcanzó  $12.14 \pm 5.38\%$  en los pozos de  $0.95 \text{ cm}^2$  (**Fig.17b**).



**Figura 17. Efecto de la superficie de cultivo en la proliferación y viabilidad celular.** a) Incremento en veces del cultivo de 1000 células/pozo a los días 14 y 21 ( $n = 1$ ) para las poblaciones de CTH ( $n = 3$ ) y CPH ( $n = 1$ ) en dos tipos de pozos, con respecto al IV del día 7 (línea punteada). b) Viabilidad celular en los cultivos de 1000 células/pozo de CTH ( $n = 3$ ) y c) de CPH en los distintos pozos ( $n = 1$ ). Se reporta promedio y error estándar. Modelo de efectos mixtos. \*Diferencia significativa  $p < 0.0332$ , \*\*  $p < 0.0021$ .

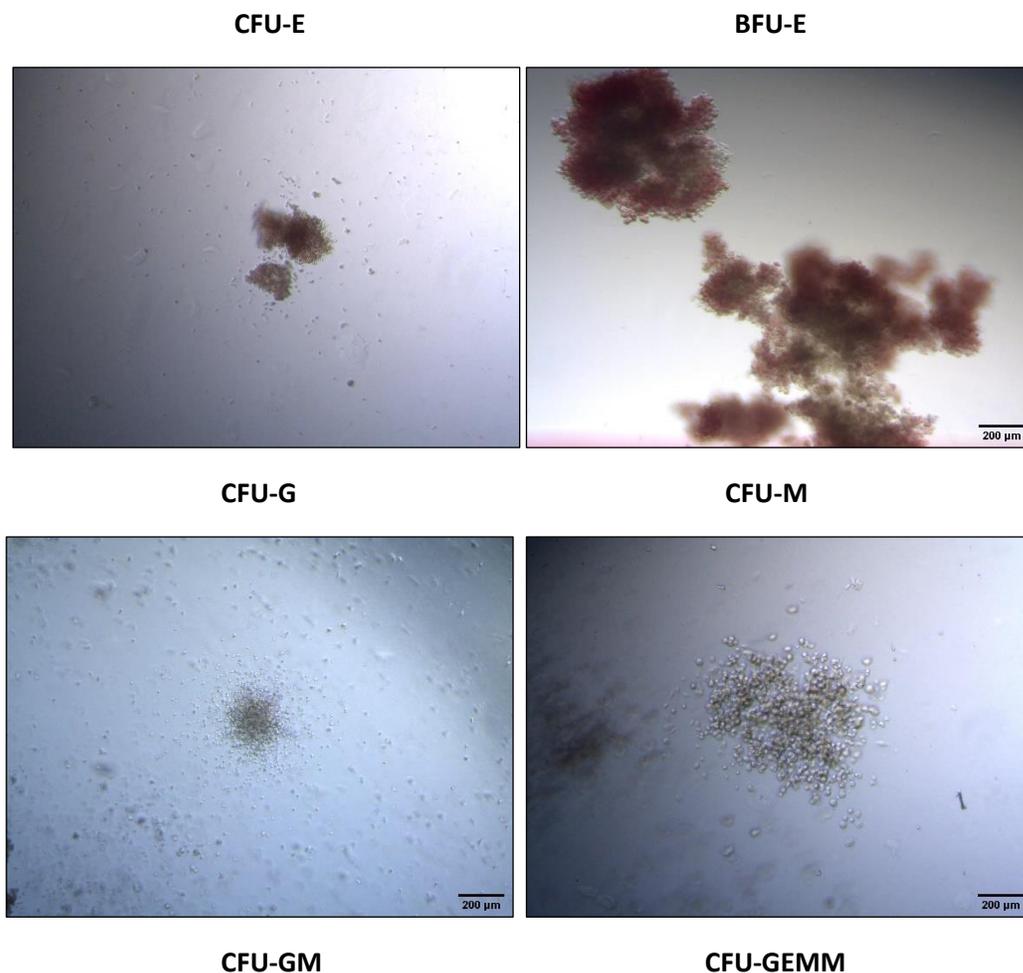
En las CPH se observó que la proliferación fue mayor en los pozos con mayor área de cultivo, aunque no hubo diferencias significativas (**Fig.17a**). Por otro lado, hubo diferencias en la viabilidad al día 14,

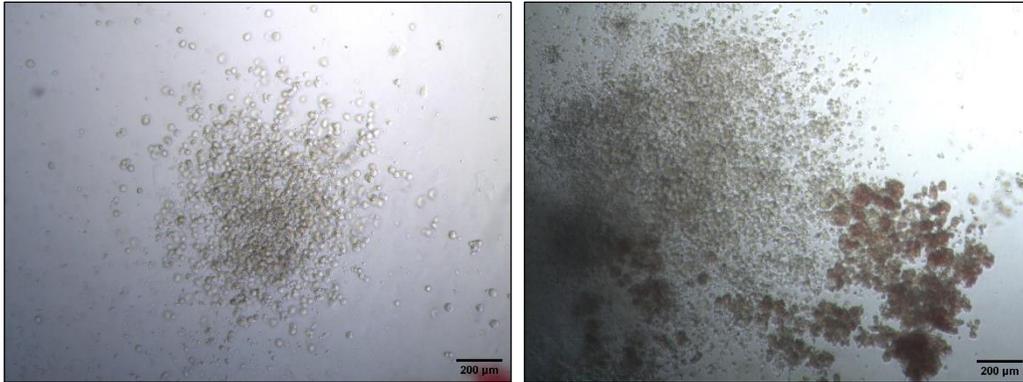
ya que se registró de 67.12% en pozos de  $0.32\text{ cm}^2$  y de 26.08% en pozos de  $0.95\text{ cm}^2$  (Fig.17c). Al día 21, la viabilidad disminuyó en ambas condiciones.

Los resultados muestran que, de forma independiente al espacio en el que crecen, las CTH alcanzaron su punto máximo de proliferación al día 14, mientras que las CPH siguen proliferando para el día 21. Sin embargo, aunque la viabilidad disminuyó con el tiempo en ambas condiciones, un mayor espacio de cultivo promovió la disminución de la viabilidad celular a una mayor velocidad.

### 7.3 Expansión celular

Definimos expansión celular como el incremento en el número de un tipo particular de células en cultivo que poseen características similares a las células sembradas originales. En este estudio, la expansión se cuantificó con base en la propiedad de las CTPH para formar colonias hematopoyéticas. En la **Figura 18** se muestran imágenes representativas de los tipos de colonias. Para medir la expansión, se siembra una cantidad conocida de células del cultivo en medio semisólido enriquecido con citocinas; 14 días después, se evalúa el número y tipo de colonias generadas, analizando si existió un incremento en veces de las CFCs con respecto al día cero (Fig.16 y 18).

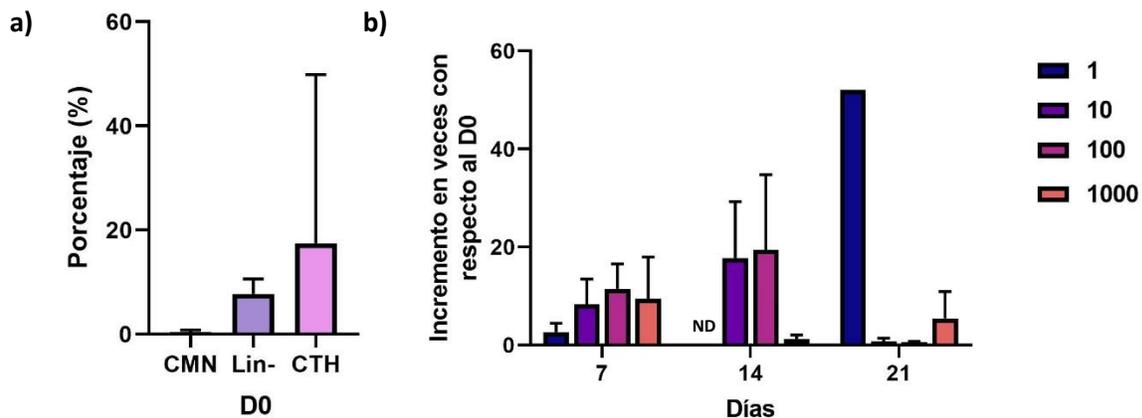




**Figura 18. Imágenes representativas de los tipos de colonias hematopoyéticas.** CFU-E, colonias eritroides tardías; BFU-E, colonias eritroides tempranas; CFU-G, colonias mieloides granulocíticas; CFU-M, colonias mieloides monocíticas; CFU-GM, colonias mieloides gránulo-monocíticas; CFU-GEMM, colonias granulocíticas, eritroides, megacariocíticas y de macrófagos.

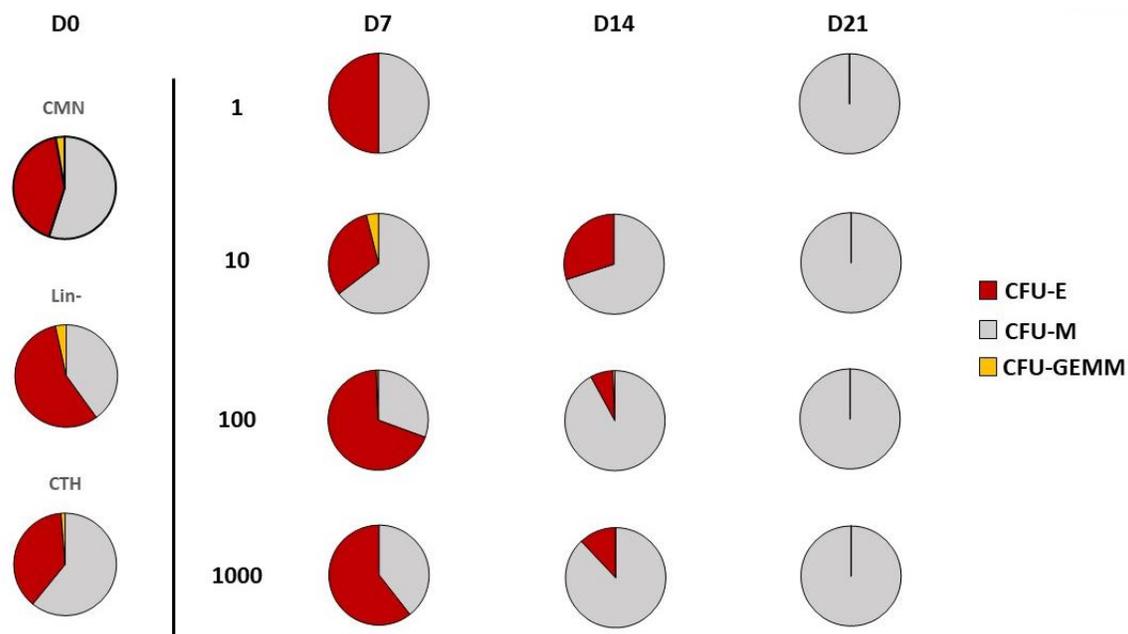
Al inicio del cultivo, el porcentaje de CFCs para las CTH fue de  $16.78 \pm 28.1\%$ , lo cual fue un incremento con respecto a las células  $\text{Lin}^-$  ( $7.75 \pm 2.8\%$ ) y las células mononucleares (CMN,  $0.44 \pm 0.4\%$ ). Esto demostró el enriquecimiento en cada uno de los pasos de la metodología para obtener a las CTH purificadas (**Fig.19a**).

Al día 7 de cultivo de CTH, se observó un incremento en el número de CFCs a mayor densidad celular, siendo el IV más alto de  $12.03 \pm 6.6$  en la condición de 100 células/pozo; sin embargo, no hay diferencias significativas entre las densidades probadas (**Fig.19b**). Al día 14, el mayor IV se observó en las condiciones de 10 y 100 células/pozo, alcanzando incrementos de  $17.77 \pm 19.1$  y de  $36.97 \pm 34.25$ , respectivamente. En contraste, las condiciones de 1 y 1000 células/pozo disminuyeron en comparación a su IV al día 7. Al día 21, el IV disminuyó drásticamente en todas las condiciones, excepto en 1 célula/pozo, el cual registró un incremento de 52 veces.



**Figura 19. Efecto de la densidad celular en la expansión de la población CTH.** A) Porcentaje de CFCs al día cero ( $n = 4$ ). B) Incremento en veces con respecto al día cero de CFCs encontradas en cultivo los días 7, 14 y 21 ( $n = 4$ ). CFC: célula formadora de colonias; CMN, células mononucleares;  $\text{Lin}^-$ : linaje negativo; ND: no determinado. Se reporta promedio y error estándar. Modelo de efectos mixtos.

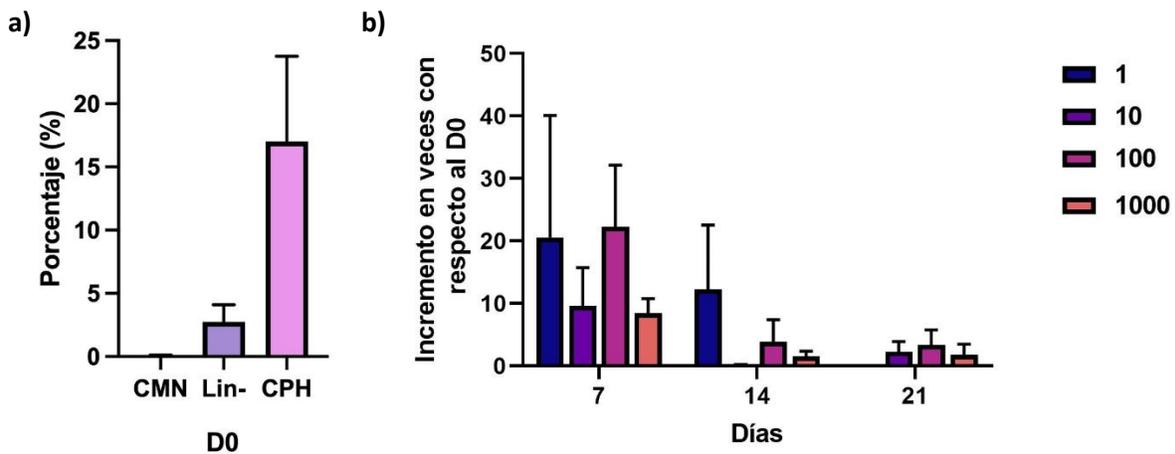
En cuanto al tipo de colonias observadas en las distintas condiciones para la población de CTH, la proporción de colonias del linaje mieloide fue similar a la del linaje eritroide al día cero, encontrándose un bajo porcentaje de colonias consideradas más primitivas (CFU-GEMM) (Fig.20). Al día 7, el porcentaje de colonias eritroides fue mayor en las densidades de 100 y 1000 células/pozo, mientras que para el día 14, el porcentaje de colonias mieloides comenzó a predominar en todas las densidades celulares, siendo el único tipo de colonia presente para el día 21. El efecto de la pérdida del linaje eritroide a lo largo de tiempo en este tipo de ensayos ya ha sido reportado anteriormente.



**Figura 20. Efecto de la densidad celular en el tipo de colonias formadas de la población de CTH.** Porcentaje de colonias eritroides (CFU-E), mieloides (CFU-M), y mixtas (CFU-GEMM), a lo largo del tiempo y en las distintas densidades celulares ( $n = 4$ ).

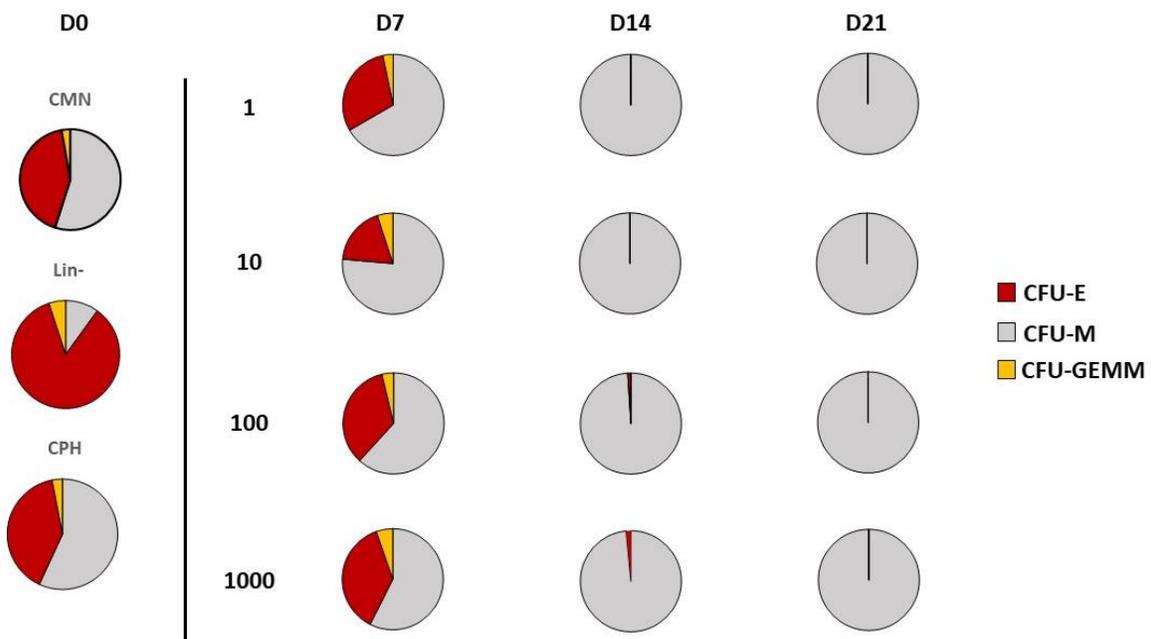
Para la población de CPH al día cero, el porcentaje de CFCs también fue mayor ( $17 \pm 13.51\%$ ), a comparación de las células  $\text{Lin}^-$  ( $2.73 \pm 2.36\%$ ) y la población CMN ( $0.095 \pm 0.05\%$ ) (Fig.21a). Es importante denotar que las muestras de SCU utilizadas para estos experimentos fueron distintas a las muestras utilizadas para los ensayos de la población de CTH. Debido a esto y por las características intrínsecas de cada muestra, el porcentaje de formación de colonias de la población  $\text{Lin}^-$  y mononuclear es distinto en las dos poblaciones, sin embargo, no hay diferencias significativas entre ambas.

Al día 7, no existió un patrón dependiente de la densidad celular, ya que las condiciones de 1 y 100 células/pozo tuvieron un incremento mayor a 20 veces, mientras que a 10 y 1000 células/pozo el incremento fue menor a 9 veces (Fig.21b). Al día 14, el IV disminuyó a mayores densidades: el IV más alto fue de la condición de 1 célula/pozo, con  $11.07 \pm 18.08$  veces, mientras que en 1000 células/pozo fue de  $1.99 \pm 2.93$  veces. Al día 21, el IV disminuyó en todas las condiciones. Estos resultados sugieren que la expansión celular en la población progenitora ocurre a corto plazo y la capacidad de formación de colonias se pierde con el tiempo.



**Figura 21. Efecto de la densidad celular en la expansión de la población de CPH.** A) Porcentaje de CFCs al día cero ( $n = 4$ ). B) Incremento en veces con respecto al día cero de CFCs encontradas en cultivo los días 7, 14 y 21 ( $n = 4$ ). CFC: célula formadora de colonias; CMN, células mononucleares; Lin<sup>-</sup>: linaje negativo. Se reporta promedio y error estándar. Modelo de efectos mixtos.

En cuanto a los tipos de colonias, la población Lin<sup>-</sup> de las unidades utilizadas para estos experimentos presentó colonias predominantemente de linaje eritroide, mientras que en las poblaciones CMN y CPH hubo un equilibrio entre linaje mieloide y eritroide al día cero (**Fig. 22**). Durante el cultivo, el linaje mieloide predominó desde el día 7 en todas las condiciones, aunque todavía se apreciaron colonias mixtas y de linaje eritroide. Sin embargo, para los días 14 y 21, solo se registraron colonias mieloides.



**Figura 22. Efecto de la densidad celular en el tipo de colonias formadas de la población de CTH.** Porcentaje de colonias eritroides (CFU-E), mieloides (CFU-M), y mixtas (CFU-GEMM), a lo largo del tiempo y en las distintas densidades celulares ( $n = 4$ ).

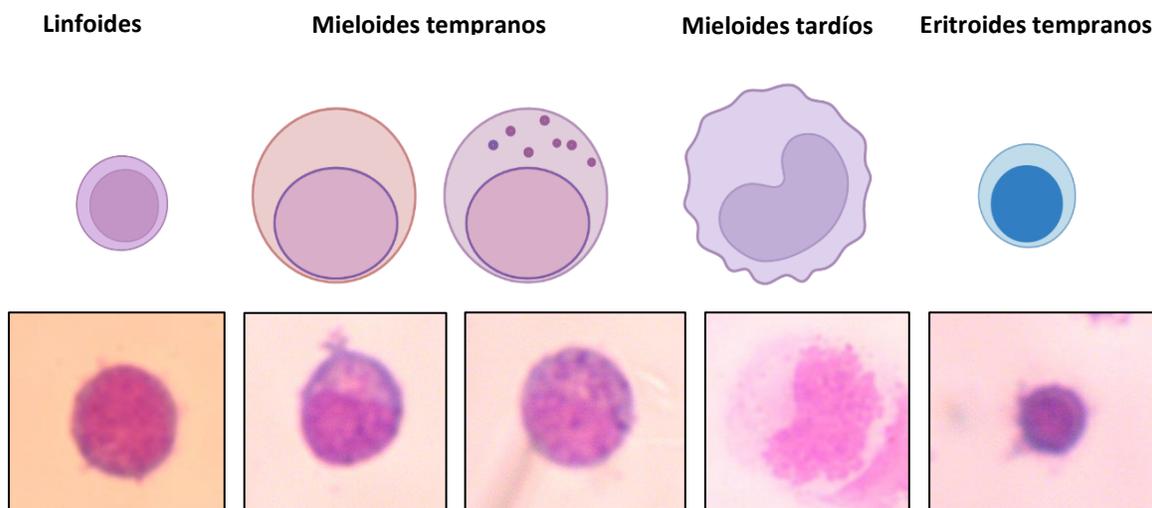
De esta manera, podemos concluir que las CTH se expanden durante todo el cultivo, mientras que las CPH solo se expanden la primera semana del cultivo, además, ambas poblaciones comienzan a perderse a largo plazo, independientemente de la densidad celular.

## 7.4 Diferenciación celular

Hemos demostrado que el sistema de cultivo fue eficiente para la supervivencia de las dos poblaciones. Así, en todas las condiciones hubo proliferación y expansión celular en cultivo a corto plazo, mientras que ambas características decayeron a largo plazo. Entonces, evaluamos si las células perdieron la capacidad de mantenerse en cultivo debido a que se diferenciaron con el tiempo. Debido a los bajos números celulares (menor a 20 mil células en la mayoría de los casos), no fue posible analizar las poblaciones por citometría de flujo. En cambio, analizamos la morfología celular a través de microscopía de luz a lo largo del tiempo tomando una muestra de cultivo de cada condición.

Utilizamos una clasificación celular de 4 grupos basados en la morfología (**Fig. 20**):

- 1) **Células linfoides.** Su morfología asemeja a los linfocitos (poco citoplasma, núcleo grande) y que abarca a las células troncales y progenitoras, presentan color violeta en tinción Wright-Giemsa (WG).
- 2) **Células precursoras mieloides tempranas.** Son de mayor tamaño a comparación de las células linfoides, su núcleo está descentralizado. Se pueden subclassificar en células precursoras de granulocitos si presentan gránulos en el citoplasma, o precursoras de monocitos en ausencia de gránulos; presentan color violeta en la tinción WG.
- 3) **Células precursoras mieloides tardías.** Tienen una morfología parecida a células mieloides maduras.
- 4) **Células precursoras eritroides tempranas.** Son células pequeñas, con tinción azul en WG, las cuales no presentan gránulos. Los precursores tardíos no se encontraron en los cultivos puesto que la presencia de eritropoyetina (EPO) y de otros factores es necesaria para la generación de células eritroides en estadios de diferenciación más avanzados.

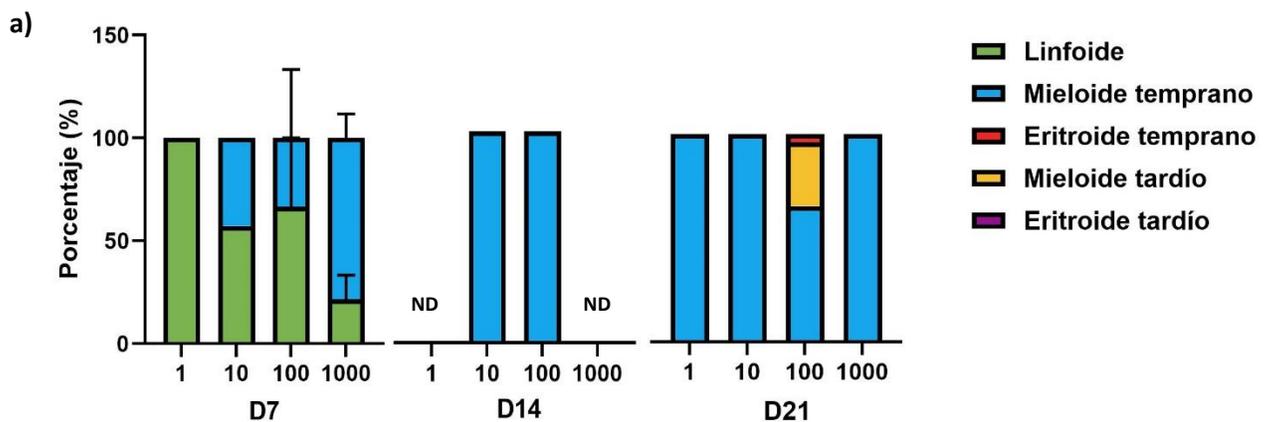


**Figura 23.** Esquema de la clasificación de morfología celular encontrada en los cultivos. Micrografías de células con tinción WG originadas en cultivos.

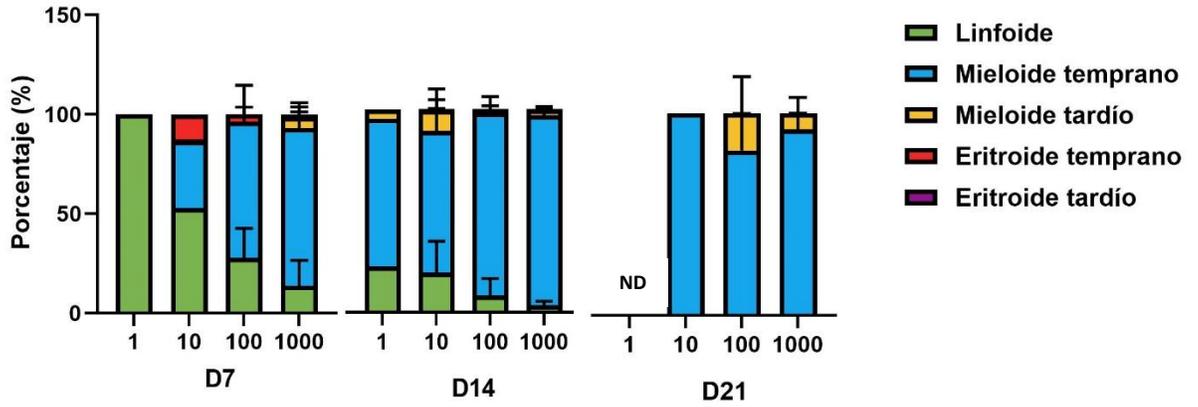
Basado en esta clasificación, se realizó el análisis morfológico correspondiente y en la **Figura 24** se muestran los porcentajes de los tipos de morfología encontrados en cultivo en los diferentes días de cultivo de ambas poblaciones celulares.

En el caso de las CTH, las células linfoides fueron observadas en todas las condiciones al día 7, aunque el porcentaje disminuyó a mayor densidad celular, con 100% en la condición de 1 célula/pozo y  $21.66 \pm 16.49\%$  en 1000 células/pozo (**Fig. 24a**). De manera simultánea, el porcentaje de precursores mieloides tempranos aumentó con la densidad celular, siendo 42.85% en la condición de 10 células/pozo y  $78.3 \pm 16.49\%$  en 1000 células/pozo. Para el día 14, el 100% de la morfología era de precursores mieloides tempranos, mientras que la presencia de precursores mieloides tardíos apareció al día 21, siendo el 30.76% de la condición de 100 células/pozo.

En el caso de la población de CPH, la presencia de células linfoides predominó en la densidad de 1 célula/pozo, pero disminuyó con la densidad celular, llegando a ser el  $20.17 \pm 30.8\%$  del total de células en 1000 células/pozo (**Fig. 24b**). Mientras tanto, el porcentaje de precursores tempranos de ambos linajes aumentó a mayores densidades. Este efecto se vio exacerbado para el día 14, en el que el porcentaje de células linfoides disminuyó hasta alcanzar  $2.74 \pm 3.19\%$  en la condición de 1000 células/pozo. Para el día 21, la morfología celular encontrada fue de precursores mieloides tempranos y tardíos. Por lo tanto, la diferenciación celular ocurre inherentemente en cultivos de ambas poblaciones, pero se ve promovido por la alta densidad celular.



b)



**Figura 24. Efecto de la densidad celular en la diferenciación.** A) Diferenciación de la población CTH ( $n = 2$ ) y b) CPH ( $n = 3$ ) a lo largo del tiempo en las distintas densidades. Porcentaje de células linfoides (Linf), precursores mieloides tempranos (Mie Temp) y tardíos (Mie Tard), precursores eritroides tempranos (Eri Temp) y tardíos (Eri Tard). ND: no determinado. Se reporta promedio y error estándar.

## 8. Discusión

Desde el punto de vista de su aplicación clínica, la investigación alrededor de la SCU se enfoca en solucionar su mayor desventaja: aumentar el bajo número de células CD34<sup>+</sup> que posee a comparación de las fuentes adultas para su uso en trasplantes hematopoyéticos. Existen múltiples factores de los cultivos *in vitro* que influyen en la respuesta celular [90]. En este estudio nos enfocamos en el efecto de la densidad celular sobre las características necesarias en una unidad de SCU para su uso en un trasplante exitoso, tales como la proliferación, expansión y diferenciación celular de las poblaciones hematopoyéticas troncal y progenitora.

Primero, se obtuvieron las poblaciones celulares de CTPH por medio de dos metodologías distintas (**Fig.4**). Aunque no hay diferencias significativas en los porcentajes de células CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> y CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> obtenidas entre ambas metodologías, la segunda es más estricta, al preseleccionar las células vivas con el colorante DyeCycle, asegurando su viabilidad al inicio del cultivo (**Tabla 1**). Además, el obtener únicamente una población por muestra de sangre nos permitió obtener la cantidad suficiente de células para la condición de 1000 células/pozo, con repetidos en cada experimento, principalmente en la población troncal.

Es importante recalcar que la pandemia de SARS-CoV-2 (2020-2022) impidió la obtención de muestras frescas de SCU. Debido a esto, optamos por utilizar muestras almacenadas (CMN) en nitrógeno líquido. La población progenitora purificada de muestras congeladas proliferó y expandió de forma parecida a las de muestras frescas, en contraste con la población troncal, cuyos experimentos realizados con muestras congeladas mostraban una proliferación y expansión mucho menor que las obtenidas de muestras frescas. En estudios previos, se ha reportado que las células CD34<sup>+</sup> (que incluye a las CTH y CPH) provenientes de muestras congeladas conservan sus características funcionales, e incluso pueden ser trasplantadas [56], [91]. También, se ha demostrado que conservan sus características después de varios días en cultivo *in vitro* [92], [93]. Sin embargo, en dichos estudios las condiciones de cultivo fueron diferentes a las del presente trabajo. Por ejemplo, toda la fracción CD34<sup>+</sup> fue sembrada como una sola población, es decir, sin separar a las células progenitoras de las troncales; las células fueron sembradas en mayor número celular (más de  $1 \times 10^6$  células por cultivo), con una mayor superficie de cultivo y adicionando moléculas pequeñas y diferentes citocinas en el medio para promover su supervivencia y proliferación. Por lo anterior, no es posible hacer una comparación directa entre nuestro estudio y los trabajos anteriores.

Por ello, una explicación de que las CTH obtenidas de muestras congeladas no hayan proliferado es que las condiciones de cultivo utilizadas, como el bajo número de células sembradas en cada condición y el uso exclusivo de citocinas de supervivencia, aunado al estrés del procedimiento de la descongelación celular, actuaron de manera negativa en la proliferación y supervivencia de esta población.

### Proliferación celular

Los cultivos celulares en diferentes tipos de pozos demostraron que la proliferación fue más alta cuando fueron sembrados en pozos de fondo U que en planos, es decir, en un espacio que los mantiene juntos los primeros días de cultivo (**Fig.7**). En la mayoría de los experimentos con estas poblaciones celulares se utilizan placas con pozos más grandes o con pozos planos [14], [94]. Sin

embargo, el mínimo número celular sembrado es  $1 \times 10^5$  células/pozo, lo que requiere mayor superficie de cultivo al inicio del experimento que el que utilizamos en este estudio. Esto parece apuntar a que la cercanía de las células es necesaria en cultivos con una densidad inicial celular relativamente baja (1000 células/pozo) para promover la supervivencia y proliferación a corto plazo.

Encontramos que en todas las condiciones hubo proliferación (**Fig.10**), pero el comportamiento depende de la densidad celular inicial, por lo que clasificamos el comportamiento de proliferación como *baja densidad* a las condiciones de 1 y 10 células/pozo, y como *alta densidad* a las de 100 y 1000 células/pozo.

A bajas densidades, las dos poblaciones tienen una tasa de proliferación muy rápida, mientras que, a densidades altas, la tasa de proliferación es más lenta. Estos resultados se respaldan con los datos de proliferación generados en modelos matemáticos cuando hay alguna perturbación en el sistema hematopoyético, donde mientras más grande sea la perturbación mayor es la respuesta proliferativa generada por las CTPH [95], [96]. En ese contexto, una densidad celular inicial baja (de 1 o 10 células por pozo) es una gran perturbación ya que provoca una proliferación abrupta, mientras que una densidad alta (de 100 o 1000 células) provoca una proliferación más lenta en ambas poblaciones. Además, esta respuesta de proliferación observada es causada por la densidad inicial, puesto que las células sembradas se encontraron en fase G0 o G1 al inicio del cultivo (**Fig. 6**).

Estos comportamientos son el promedio de la proliferación de todos los pozos sembrados al día cero. Al evaluar el porcentaje de pozos proliferativos a corto plazo, encontramos que a densidades altas todos los pozos proliferaron, mientras que muy pocos pozos presentaron proliferación a densidades bajas en las dos poblaciones (**Fig.11**). Estos resultados sugieren que no todas las células en el cultivo proliferan, lo cual se apoya en los estudios que demuestran que un subgrupo de células troncales es el que mantiene la hematopoyesis en un organismo [97]. Entonces, este fenómeno podría estar ocurriendo en los cultivos de densidades altas también, sin embargo, al haber más de una célula inicial, la probabilidad de que alguna célula en el cultivo prolifere es más alta. Así, el alto porcentaje de pozos proliferativos en densidades altas no necesariamente significa que la densidad celular promueve la proliferación, sino que existieron células que proliferaron y enmascararon a aquellas que no respondieron. Esto ya se ha reportado en células  $\text{Lin}^- \text{CD34}^+$  de SCU, en los que solo un porcentaje del número total de células se encontró en fase S durante el cultivo [98]. Se han propuesto algunos marcadores para identificar las células proliferativas en cultivo. Para el caso de las CTH, el marcador CD48 fue propuesto para identificar a las células proliferativas de ratón, la cual es una molécula de adhesión asociada a la proliferación y activación de células T [99]. Es interesante notar que en el mismo estudio reportan que esta población tiene una firma transcripcional parecida a las CTH de corto plazo (ST-HSC, por sus siglas en inglés) y a las CTH de hígado fetal, mientras que las células que no proliferan se parecen transcripcionalmente a las CTH de largo plazo (LT-HSC, por sus siglas en inglés) y a las CTH adultas.

A pesar de que no hay un marcador propuesto exclusivamente para las CPH, se ha visto que la expresión de Ki-67 en la población  $\text{CD34}^+ \text{CD45}^-$  (que abarca a las CTPH) puede identificar eficientemente las células proliferativas, ya que es una proteína nuclear y nucleolar que se expresa a partir de la fase G<sub>1</sub> tardía, y continúa hasta la fase M [100]. Serán necesarios estudios posteriores en los que se evalúe la efectividad de estos candidatos en la expansión celular clínica.

Adicionalmente, al separar la respuesta proliferativa en histogramas, encontramos que existe heterogeneidad en las poblaciones inmunofenotípicamente iguales (**Fig.12 y 13**), puesto que no todas responden de la misma manera al mismo estímulo, lo cual ya ha sido observado anteriormente [101]. Estos resultados sugieren que existen factores en los cultivos de ambas poblaciones celulares que no consideramos en este estudio y que juegan un papel crucial en la respuesta proliferativa durante todo el cultivo, como puede ser el estado celular transcriptómico, metabólico, epigenético, entre otros [102], [103].

Observamos también que la respuesta de proliferación inicial determina el comportamiento posterior en cultivo: las células que no responden los primeros siete días no proliferan después (**Fig. 14 y 15**). El comportamiento predominante en las densidades bajas de ambas poblaciones fue que, a mayor tasa de proliferación al día 7 mayor proliferación al día 14; sin embargo, todos los pozos dejaron de proliferar para el día 21. Este efecto es similar a la determinación celular a un linaje específico, en donde una célula se compromete de manera irreversible a un destino celular y, por lo tanto, que no se modifica por estímulos externos. En este contexto, las células que respondieron proliferando a corto plazo, continuaron a largo plazo también. Se sabe que la determinación celular es un proceso controlado por reguladores epigenéticos, como la metilación de DNA, por lo que es posible que la respuesta proliferativa al estímulo de densidad celular también lo sea [104], [105]. Para poder evaluar este fenómeno con más detalle es necesaria alguna metodología que permita identificar a cada célula en cultivo a lo largo del tiempo. Un ejemplo es la utilizada en Rodríguez-Fraticelli, et al., donde marcaron con un código lentiviral a las células para poder seguir su progenie en trasplantes [106].

Aunado a esto, la viabilidad de las dos poblaciones disminuyó significativamente a densidades bajas (**Fig. 16**). Esto se apoya en la evidencia acerca de que los contactos célula-célula entre las células hematopoyéticas y las del nicho son necesarias para la supervivencia de las poblaciones troncal y progenitora [107] y podría sugerir que los contactos intercelulares entre las propias células hematopoyéticas también tienen un papel importante en su supervivencia *in vitro* y posiblemente *in vivo* también.

Por otro lado, a densidades altas la viabilidad de las dos poblaciones fue muy alta a corto plazo, mientras que solo disminuyó en la población progenitora a largo plazo (**Fig. 16**). Debido a que esto ocurrió independientemente de la densidad celular, puede ser una característica intrínseca de las poblaciones celulares. Se conoce que el tiempo promedio de vida de una célula troncal puede ser prolongado debido a su capacidad por permanecer quiescente, mientras que una célula progenitora, al tener como función principal generar linajes hematopoyéticos específicos, su promedio de vida es menor [23], [108].

Una posible explicación a la baja tasa de proliferación (comparado con las otras densidades) y la disminución paulatina de la viabilidad observada en la densidad más alta de las poblaciones puede ser la competencia por el espacio en el cultivo. Tanto las CTH como las CPH se cultivan en suspensión celular y no se adhieren al fondo de la caja de cultivo, pero al realizarse los cultivos en placas de 96 pozos con fondo en U, que equivale a un área de cultivo de  $0.32 \text{ cm}^2$ , el espacio podría haber afectado la viabilidad.

Por esta razón, dividimos pozos de cultivo en dos y sembramos cada mitad en un tipo de pozo de diferente tamaño (**Fig. 17**). Encontramos que, independientemente de la superficie de cultivo, la

proliferación de las CTH disminuye, mientras que para la de las CPH aumenta. Además, los resultados sugieren que el espacio de cultivo no afecta la proliferación celular, sino afecta la viabilidad, ya que a mayor espacio menor viabilidad celular en ambas poblaciones, lo cual se complementa con lo discutido previamente. Las diferencias de comportamiento en cultivo entre cada población pueden ser causadas por factores intrínsecos al tipo celular, que influyan en un agotamiento de las CTH y en una mayor proliferación en CPH, a costa de la viabilidad del cultivo.

### **Expansión celular**

Para analizar la expansión en los cultivos, analizamos el número de colonias hematopoyéticas formadas por las poblaciones celulares en las distintas condiciones. Encontramos que no hay un efecto significativo de la densidad en la expansión celular de las dos poblaciones (**Fig. 19 y 21**). Sin embargo, hay una tendencia en la que hay una mayor expansión en las densidades de 10 y 100 células/pozo en la población troncal, mientras que en la población progenitora, es la densidad más baja (de 1 célula/pozo) la que más se expande. Aunque ambas son poblaciones primitivas y ambas necesitan citocinas y contactos celulares con el nicho para expandirse, se ha reportado que el coctel de citocinas necesario para cada población es distinto. Por ejemplo, las progenitoras se expanden mejor con una coctel de SCF, TPO y FGF-1 en co-cultivo con MSCs, mientras que para las troncales es FL, SCF, IL-6 y TPO y no es necesaria la presencia de otros tipos celulares *in vitro* [109], [110]. Con base en esto, las condiciones de cultivo utilizadas promueven la expansión de las CTH, pero no de CPH. Esto se complementa con que la población troncal presentó su pico máximo en la segunda semana, mientras que para la progenitora se presentó en la primera semana, para después disminuir. Otro punto a considerar es el estrés celular generado por las condiciones del cultivo, ya que puede afectar negativamente la expansión hematopoyética [111]–[113]. La curva de rápida proliferación y la disminución de la viabilidad de la población progenitora podrían sugerir que las condiciones de una densidad muy baja o alta respectivamente pueden causar estrés suficiente para inhibir la expansión.

Adicionalmente, se conoce que las células cultivadas *in vitro* durante varias semanas pierden la capacidad de generar células de linaje eritroide [Hernández-Barrientos et al, *datos no publicados*] [114]. Esto también ocurre por la ausencia de eritropoyetina (EPO), necesaria para la generación de células eritroides. Sin embargo, observamos que las densidades altas aceleran el proceso de pérdida del linaje eritroide, siendo más rápido el efecto en la población progenitora (**Fig. 20 y 22**). En conjunto, independientemente de la densidad celular, las poblaciones celulares se expanden, pero a diferentes tiempos, los cuales pueden depender de características propias de cada población y otros elementos del cultivo diferentes a la densidad, además de perder la capacidad de generar el linaje eritroide.

### **Diferenciación celular**

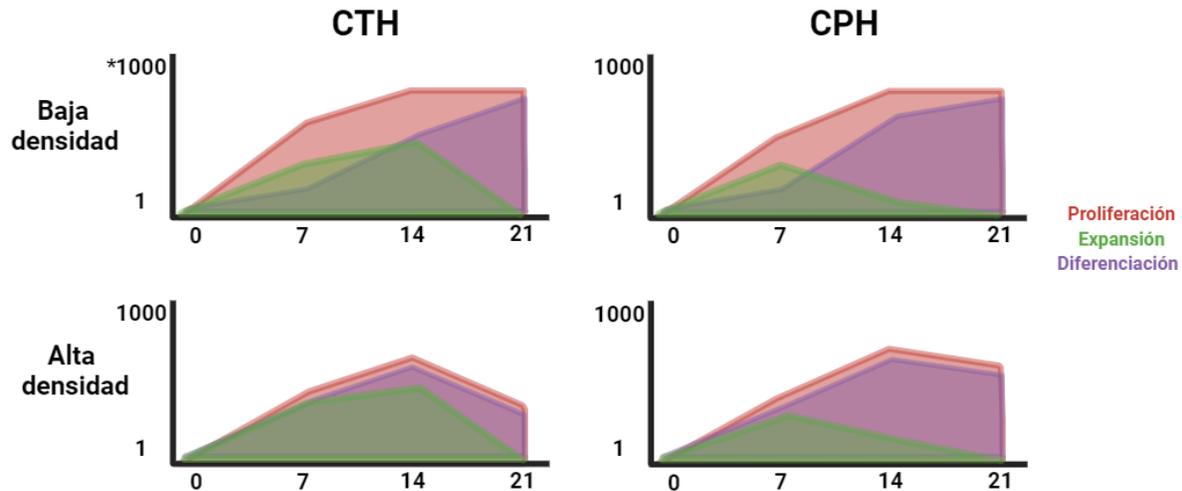
Por otro lado, analizamos la morfología de las células generadas en cultivo para evaluar el posible efecto de la densidad celular en los patrones de diferenciación de ambas poblaciones celulares **Fig. 24**). Para ello, utilizamos la clasificación celular establecida previamente por nuestro grupo de investigación [115]. Nuestros resultados muestran que la densidad celular alta promueve una diferenciación celular más rápida, probablemente como resultado de interacciones celulares (contacto celular y secreción de citocinas). Como era de esperarse, el proceso de diferenciación terminal se ve acelerado en la población progenitora.

Es probable que la diferenciación se haya visto favorecida por la presencia de IL-6 en cultivo. IL-6 es una citocina proinflamatoria que se ha demostrado que tiende a promover la diferenciación [116] y que afecta a la población progenitora, pero no a la troncal [117]. Por otra parte, el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) es secretado principalmente por células pertenecientes al nicho hematopoyético, pero también por monocitos y macrófagos. Al aumentar el número de células diferenciadas, principalmente del linaje mieloide, es posible que la concentración de G-CSF aumente en los cultivos y esto promueva la diferenciación de las células primitivas, como se ha observado en otros estudios [118]. Finalmente, es importante hacer notar que la presencia de células diferenciadas en cultivo no favorece la expansión de las células primitivas [119], por lo que la generación de células maduras en nuestro sistema experimental seguramente tuvo efectos sobre la expansión celular.

La pérdida eventual del cultivo debido a la alta tasa de proliferación y a la diferenciación de las poblaciones es un fenómeno observado en pacientes con complicaciones de enfermedades infecciosas, que derivan en supresión de la MO y pancitopenia. Las CTH estimuladas con señales inflamatorias salen de su estado de quiescencia, lo cual provoca daño a DNA, y presentan una proliferación acelerada que las lleva a la diferenciación, por lo que ya no son capaces de mantener la hematopoyesis [120][121]. Por lo tanto, vislumbrar el mecanismo por el que esto ocurre tiene relevancia clínica.

## 9. Conclusiones y perspectivas

En el presente trabajo pudimos comprobar que la densidad celular inicial afecta el comportamiento de las poblaciones hematopoyéticas troncal y progenitora *in vitro*. Tomando en consideración los resultados de las tres características celulares evaluadas, generamos modelos que describen el comportamiento de ambas poblaciones observado en cultivo en función de la densidad celular inicial (**Fig. 22**). De acuerdo con nuestro modelo, las bajas densidades promueven una rápida proliferación y una expansión a corto plazo, hasta que los cultivos se agotan por diferenciación celular. En el caso de las densidades altas, estas promueven una lenta proliferación y expansión a corto plazo, hasta que los cultivos se agotan porque las células diferenciadas invaden el cultivo.



**Figura 22. Comportamiento observado en los cultivos de células troncales (izquierda) y progenitoras (derecha) en las condiciones de baja densidad (1 y 10 células/pozo) de alta densidad (100 y 1000 células/pozo). Eje X, tiempo; eje Y, incremento en veces (\*en escala logarítmica)**

En nuestras condiciones de cultivo, las dos poblaciones celulares decayeron con el tiempo independientemente de la densidad celular. Este es un fenómeno que ha sido ampliamente descrito por nosotros y otros grupos. Es probable que este comportamiento se debe a causas distintas en función de la densidad celular. Es decir, a bajas densidades, las poblaciones celulares parecen agotarse debido a que desarrollan una respuesta proliferativa abrupta en los primeros días. Por otro lado, a densidades altas, las poblaciones se agotan por una acumulación excesiva en cultivo, la cual, seguramente, va acompañada de la acumulación de inhibidores y productos de desecho celulares, así como la escasez de nutrientes en el medio [90].

El presente estudio deja ver que las células hematopoyéticas responden a los estímulos del microambiente en cultivo en función de la densidad celular inicial. En este sentido, una de las perspectivas más importantes es encontrar el mecanismo por el cual esto ocurre. Se ha demostrado ampliamente la importancia del contacto directo célula-célula entre las células del nicho y las CTPH para la supervivencia y expansión de las últimas. Los resultados encontrados en este estudio sugieren un papel importante de los contactos entre las CPTH entre sí para su mantenimiento *in vitro*. Por ejemplo, podría abordarse al analizar la densidad de receptores de contacto en las poblaciones celulares generadas en cultivo, ya que se ha demostrado que la disminución de estas

moléculas en células del nicho afecta la proliferación hematopoyética [122]. Por otro lado, se conoce que la secreción de ciertas citocinas inflamatorias inhibe la proliferación hematopoyética [123], [124]. Por lo tanto, analizar el sobrenadante de los cultivos de cada condición podría desvelar el mecanismo.

Finalmente, estos resultados pueden ser útiles en la expansión clínica de las CTPH. El objetivo de los cultivos *in vitro* previo al trasplante es lograr la proliferación y expansión de las CTPH. Enfrentamos varios retos importantes en los cultivos *in vitro* de las CTPH de SCU, como la tendencia a la diferenciación, la pérdida de las poblaciones primitivas con el tiempo, así como la falta del número suficiente de CTPH. Por lo tanto, se busca una proliferación y expansión a corto plazo, para evitar la diferenciación. En las condiciones estudiadas, observamos que la proliferación es más rápida a densidades bajas, el pico de expansión es entre 7 y 14 días y la diferenciación aumenta a los 14 días.

Por lo tanto, proponemos como siguiente paso un cultivo de números totales mayores de CTPH (10,000 o más células/pozo) con una densidad celular baja (según cada modelo de expansión) para generar una proliferación acelerada, durante un periodo corto (de 7 días) para observar expansión y mantener el porcentaje de diferenciación bajo. Sin embargo, es importante evaluar si el comportamiento de la proliferación, expansión y diferenciación observados en este trabajo es el mismo a números celulares mayores, para poder ser utilizado como protocolo de expansión clínica.

## 10. Bibliografía

- [1] J. C. Balandrán, J. Enciso, and R. Pelayo, "El sistema hematopoyético como paradigma de la diferenciación celular," in *Celulas Troncales. Biología y aplicaciones en biomedicina*, 1st ed., Lito-Grapo, Ed. Mexico city, 2017, pp. 209–238.
- [2] F. Notta *et al.*, "Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny," *Science (80-. )*, vol. 351, no. 6269, pp. 1–22, 2016, doi: 10.1126/science.aab2116.
- [3] E. M. Pietras, M. R. Warr, and E. Passegué, "Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells," *J. Cell Biol.*, vol. 195, no. 5, pp. 709–720, 2011, doi: 10.1083/jcb.201102131.
- [4] J. Punt, S. A. Stranford, P. P. Jones, and J. A. Owen, *Kuby. Inmunología*, 8th ed. McGraw-Hill, 2020.
- [5] H. Cheng, Z. Zheng, and T. Cheng, "New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation," *Protein Cell*, vol. 11, no. 1, pp. 34–44, 2020, doi: 10.1007/s13238-019-0633-0.
- [6] M. Ramalho-santos and H. Willenbring, "On the Origin of the Term "Stem Cell,"" *Cell Stem Cell Comment.*, vol. 1, pp. 35–38, 2007, doi: 10.1016/j.stem.2007.05.013.
- [7] A. Maximow, "Untersuchungen uber blut und bindegewebe 1. Die fruhesten entwicklungsstadien der blut- und binde- gewebzellan beim saugtierembryo, bis zum anfang der blutbildung und der leber," *Arch. fur Mikroskopische Anat.*, 1909.
- [8] J. Till and E. McCulloch, "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow," *Radiat. Res.*, vol. 14, pp. 213–222, 1961.
- [9] A. J. Becker, E. A. McCulloch, and J. E. Till, "Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells," *Nature*, vol. 197, no. 4866, pp. 452–454, 1963, doi: 10.1038/197452a0.
- [10] A. M. Wu, J. E. Till, L. Siminovitch, and E. A. McCulloch, "Cytological evidence for a relationship between normal hematopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system," *J. Exp. Med.*, vol. 127, no. 3, pp. 455–464, 1968, doi: 10.1084/jem.127.3.455.
- [11] F. Notta, S. Doulatov, E. Laurenti, A. Poepl, I. Jurisica, and J. E. Dick, "Isolation of Single Human Hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment," *Science (80-. )*, vol. 333, no. July, pp. 218–222, 2011.
- [12] P. Tajer, K. Pike-Overzet, S. Arias, M. Havenga, and F. Staal, "Ex Vivo Expansion of Hematopoietic Stem Cells for Therapeutic Purposes: Lessons from Development and the Niche," *Cells*, vol. 8, no. 2, p. 169, 2019, doi: 10.3390/cells8020169.
- [13] H. Mayani and P. M. Lansdorp, "Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells," *Stem Cells*, vol. 16, no. 3, pp. 153–165, 1998, doi: 10.1002/stem.160153.
- [14] N. Pineault and A. Abu-Khader, "Advances in umbilical cord blood stem cell expansion and clinical translation," *Exp. Hematol.*, vol. 43, no. 7, pp. 498–513, 2015, doi: 10.1016/j.exphem.2015.04.011.

- [15] L. Strauss, S. Rowley, V. La Russa, S. Sharkis, R. Stuart, and C. Civin, "Antigenic analysis of hematopoiesis. V. Characterization of My-10 antigen expression by normal lymphohematopoietic progenitor cells," *Exp. Hematol.*, vol. 14, no. 9, pp. 878–886, 1986.
- [16] K. Sumide *et al.*, "A revised road map for the commitment of human cord blood CD34-negative hematopoietic stem cells," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, 2018, doi: 10.1038/s41467-018-04441-z.
- [17] Y. Matsuoka *et al.*, "Prospectively isolated human bone marrow cell-derived mscs support primitive human CD34-negative hematopoietic stem cells," *Stem Cells*, vol. 33, no. 5, pp. 1554–1565, 2015, doi: 10.1002/stem.1941.
- [18] S. Doulatov, F. Notta, E. Laurenti, and J. E. Dick, "Hematopoiesis: A human perspective," *Cell Stem Cell*, vol. 10, no. 2, pp. 120–136, 2012, doi: 10.1016/j.stem.2012.01.006.
- [19] M. Bhatia, J. C. Y. Wang, U. Kapp, D. Bonnet, and J. E. Dick, "Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 10, pp. 5320–5325, 1997, doi: 10.1073/pnas.94.10.5320.
- [20] Z. L. Piedra-Quintero, Z. Wilson, P. Nava, and M. Guerau-de-Arellano, "CD38: An Immunomodulatory Molecule in Inflammation and Autoimmunity," *Front. Immunol.*, vol. 11, no. November, pp. 3–6, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.597959.
- [21] L. W. M. M. Terstappen, S. Huang, M. Safford, P. M. Lansdorp, and M. R. Loken, "Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells," *Blood*, vol. 77, no. 6, pp. 1218–1227, 1991, doi: 10.1182/blood.v77.6.1218.1218.
- [22] C. I. Civin, G. Almeida-Porada, M. J. Lee, J. Olweus, L. W. M. M. Terstappen, and E. D. Zanjani, "Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells in vivo," *Blood*, vol. 88, no. 11, pp. 4102–4109, 1996, doi: 10.1182/blood.v88.11.4102.bloodjournal88114102.
- [23] S. Scala and A. Aiuti, "In vivo dynamics of human hematopoietic stem cells: Novel concepts and future directions," *Blood Adv.*, vol. 3, no. 12, pp. 1916–1924, 2019, doi: 10.1182/bloodadvances.2019000039.
- [24] P. Flores-Guzmán, "Proliferación y expansión in vitro de células progenitoras hematopoyéticas humanas presentes en la sangre de cordón umbilical," Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.
- [25] H. Mayani, "Human Hematopoietic Stem Cells: Concepts and Perspectives on the Biology and Use of Fresh Versus In Vitro-Generated Cells for Therapeutic Applications," *Curr. Stem Cell Reports*, 2019, doi: 10.1007/s40778-019-00162-1.
- [26] O. J. Borge, V. Ramsfjell, L. Cui, and S. E. W. Jacobsen, "Ability of early acting cytokines to directly promote survival and suppress apoptosis of human primitive CD34+CD38- bone marrow cells with multilineage potential at the single-cell lever: Key role of thrombopoietin," *Blood*, vol. 90, no. 6, pp. 2282–2292, 1997, doi: 10.1182/blood.v90.6.2282.2282\_2282\_2292.
- [27] H. Mayani, W. Dragowska, and P. M. Lansdorp, "Lineage commitment in human hemopoiesis involves asymmetric cell division of multipotent progenitors and does not

- appear to be influenced by cytokines," *J. Cell. Physiol.*, vol. 157, no. 3, pp. 579–586, 1993, doi: 10.1002/jcp.1041570318.
- [28] S. Babovic and C. J. Eaves, "Hierarchical organization of fetal and adult hematopoietic stem cells," *Exp. Cell Res.*, vol. 329, no. 2, pp. 185–191, 2014, doi: 10.1016/j.yexcr.2014.08.005.
- [29] M. Majumdar, M. Thiede, S. Haynesworth, S. Bruder, and S. Gerson, "Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages," *J. Hematother. Stem Cell Res.*, vol. 9, no. 6, pp. 841–848, 2000.
- [30] P. Flores-Guzmán *et al.*, "Individual and combined effects of mesenchymal stromal cells and recombinant stimulatory cytokines on the in vitro growth of primitive hematopoietic cells from human umbilical cord blood," *Cytotherapy*, vol. 11, no. 7, pp. 886–896, 2009, doi: 10.3109/14653240903180076.
- [31] C. Dessels, M. Alessandrini, and M. S. Pepper, "Factors Influencing the Umbilical Cord Blood Stem Cell Industry: An Evolving Treatment Landscape," *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 7, no. 9, pp. 643–650, 2018, doi: 10.1002/sctm.17-0244.
- [32] J. Styczyński *et al.*, "Death after hematopoietic stem cell transplantation: changes over calendar year time, infections and associated factors," *Bone Marrow Transplant.*, vol. 55, no. 1, pp. 126–136, 2020, doi: 10.1038/s41409-019-0624-z.
- [33] H. Broxmeyer *et al.*, "Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells," *PNAS*, vol. 10, pp. 3828–3832, 1989.
- [34] G. Kolios and Y. Moodley, "Introduction to Stem Cells and regenerative medicine," *Respiration*, vol. 85, no. 1, pp. 3–10, 2013, doi: 10.1159/000345615.
- [35] G. M. Crane, E. Jeffery, and S. J. Morrison, "Adult haematopoietic stem cell niches," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 17, pp. 573–590, 2017, doi: 10.1038/nri.2017.53.
- [36] C. Lee, N. Hirasawa, K. García, D. Ramanathan, and K. Kim, "Stem and progenitor cell microenvironment for bone regeneration and repair," *Renegative Med.*, vol. 14, no. 7, pp. 693–702, 2019.
- [37] S. Pinho and P. S. Frenette, "Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 20, no. 5, pp. 303–320, 2019, doi: 10.1038/s41580-019-0103-9.
- [38] P. Singh, K. S. Mohammad, and L. M. Pelus, "CXCR4 expression in the bone marrow microenvironment is required for hematopoietic stem and progenitor cell maintenance and early hematopoietic regeneration after myeloablation," *Stem Cells*, vol. 38, no. 7, pp. 849–859, 2020, doi: 10.1002/stem.3174.
- [39] T. Sugiyama, H. Kohara, M. Noda, and T. Nagasawa, "Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches," *Immunity*, vol. 25, no. 6, pp. 977–988, 2006, doi: 10.1016/j.immuni.2006.10.016.
- [40] S. R. Panch, J. Szymanski, B. N. Savani, and D. F. Stroncek, "Sources of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Methods to Optimize Yields for Clinical Cell Therapy," *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 23, no. 8, pp. 1241–1249, 2017, doi: 10.1016/j.bbmt.2017.05.003.

- [41] E. D. Thomas, H. Lochte, W. Lu, and J. Ferrebee, "Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy," *N. Engl. J. Med.*, vol. 257, no. 11, pp. 491–6, 1957.
- [42] J. W. Goodman and George Hodgson, "Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. Blood. 1962;19(6):702-714," *Blood*, vol. 127, no. 22, p. 2653, 2016, doi: 10.1182/blood-2016-03-704866.
- [43] D. E. Wright, A. J. Wagers, A. Pathak Gulati, F. L. Johnson, and I. L. Weissman, "Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells," *Science (80-. )*, vol. 294, no. 5548, pp. 1933–1936, 2001, doi: 10.1126/science.1064081.
- [44] M. Budkowska *et al.*, "A Circadian Rhythm in both Complement Cascade (ComC) Activation and Sphingosine-1-Phosphate (S1P) Levels in Human Peripheral Blood Supports a Role for the ComC–S1P Axis in Circadian Changes in the Number of Stem Cells Circulating in Peripheral Blood," *Stem Cell Rev. Reports*, vol. 14, no. 5, pp. 677–685, 2018, doi: 10.1007/s12015-018-9836-7.
- [45] S. Méndez-Ferrer, D. Lucas, M. Battista, and P. S. Frenette, "Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations," *Nature*, vol. 452, no. 7186, pp. 442–447, 2008, doi: 10.1038/nature06685.
- [46] I. G. Winkler *et al.*, "Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs," *Blood*, vol. 116, no. 23, pp. 4815–4828, 2010, doi: 10.1182/blood-2009-11-253534.
- [47] J. P. Lévesque, Y. Takamatsu, S. K. Nilsson, D. N. Haylock, and P. J. Simmons, "Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor," *Blood*, vol. 98, no. 5, pp. 1289–1297, 2001, doi: 10.1182/blood.V98.5.1289.
- [48] H. E. Broxmeyer *et al.*, "Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist," *J. Exp. Med.*, vol. 201, no. 8, pp. 1307–1318, 2005, doi: 10.1084/jem.20041385.
- [49] J. Hoggatt *et al.*, "Differential stem- and progenitor- cell trafficking by prostaglandin E2," vol. 495, no. 7441, pp. 365–369, 2013, doi: 10.1038/nature11929.Differential.
- [50] M. Domingues, S. Nilsson, and B. Cao, "New agents in HSC mobilization," *Int J Hematol.*, vol. 105, pp. 141–152, 2017.
- [51] L. J. Burns *et al.*, "Recovery of Unrelated Donors of Peripheral Blood Stem Cells versus Recovery of Unrelated Donors of Bone Marrow: A Prespecified Analysis from the Phase III Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network Protocol 0201," *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 22, no. 6, pp. 1108–1116, 2016, doi: 10.1016/j.bbmt.2016.02.018.
- [52] M. Körbling and E. J. Freireich, "Twenty-five years of peripheral blood stem cell transplantation," *Blood*, vol. 117, no. 24, pp. 6411–6416, 2011, doi: 10.1182/blood-2010-12-322214.
- [53] S. Knudtzon, "In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood," *Blood*, vol. 43, no. 3, pp. 357–361, 1974, doi: 10.1182/blood.v43.3.357.357.

- [54] E. Gluckman *et al.*, "Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling," *N. Engl. J. Med.*, vol. 321, no. 17, pp. 1174–1178, 1989.
- [55] A. O. Gupta and J. E. Wagner, "Umbilical Cord Blood Transplants: Current Status and Evolving Therapies," *Front. Pediatr.*, vol. 8, no. October, pp. 1–11, 2020, doi: 10.3389/fped.2020.570282.
- [56] H. E. Broxmeyer *et al.*, "Hematopoietic stem/progenitor cells, generation of induced pluripotent stem cells, and isolation of endothelial progenitors from 21- to 23.5-year cryopreserved cord blood," *Blood*, vol. 117, no. 18, pp. 4773–4777, 2011, doi: 10.1182/blood-2011-01-330514.
- [57] K. Ballen, "Umbilical cord blood transplantation: Challenges and future directions," *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 6, no. 5, pp. 1312–1315, 2017, doi: 10.1002/sctm.17-0069.
- [58] Á. Guerra-Márquez, K. Peñafior, and H. Mayani, "Cord Blood Banking and Transplantation at the Mexican Institute of Social Security: Thirteen Years of Experience," *Arch. Med. Res.*, vol. 51, no. 1, pp. 54–62, 2020, doi: 10.1016/j.arcmed.2019.12.006.
- [59] H. Mayani, "The regulation of hematopoietic stem cell populations," *Research*, vol. 5, pp. 2–7, 2016, doi: 10.12688/f1000research.8532.1.
- [60] P. M. Lansdorp, W. Dragowska, and H. Mayani, "Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells," *J. Exp. Med.*, vol. 178, no. 3, pp. 787–791, 1993, doi: 10.1084/jem.178.3.787.
- [61] J. C. Y. Wang, M. Doedens, and J. E. Dick, "Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay," *Blood*, vol. 89, no. 11, pp. 3919–3924, 1997, doi: 10.1182/blood.v89.11.3919.
- [62] A. Ruggeri, A. Paviglianiti, E. Gluckman, and V. Rocha, "Impact of HLA in cord blood transplantation outcomes," *Hla*, vol. 87, no. 6, pp. 413–421, 2016, doi: 10.1111/tan.12792.
- [63] S. Schonberger *et al.*, "Transplantation of hematopoietic stem cells derived from cord blood, bone marrow or peripheral blood: a single centre matched-pair analysis in heterogeneous risk population," *Klin. Padiatr.*, vol. 216, no. 6, pp. 356–363, 2004.
- [64] A. Scaradavou *et al.*, "Double unit grafts successfully extend the application of umbilical cord blood transplantation in adults with acute leukemia," *Blood*, vol. 121, no. 5, pp. 752–758, 2013, doi: 10.1182/blood-2012-08-449108.
- [65] L. A. Kuzmina *et al.*, "Multipotent mesenchymal stromal cells for the prophylaxis of acute graft-versus-host disease-A phase II study," *Stem Cells Int.*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/968213.
- [66] T. Peled *et al.*, "Nicotinamide, a SIRT1 inhibitor, inhibits differentiation and facilitates expansion of hematopoietic progenitor cells with enhanced bone marrow homing and engraftment," *Exp. Hematol.*, vol. 40, no. 4, pp. 342–355.e1, 2012, doi: 10.1016/j.exphem.2011.12.005.
- [67] C. Delaney, S. Heimfeld, C. Brashem-Stein, H. Voorhies, R. L. Manger, and I. D. Bernstein,

- “Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution,” *Nat. Med.*, vol. 16, no. 2, pp. 232–236, 2010, doi: 10.1038/nm.2080.
- [68] M. de Lima *et al.*, “Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: A phase I/II clinical trial,” *Bone Marrow Transplant.*, vol. 41, no. 9, pp. 771–778, 2008, doi: 10.1038/sj.bmt.1705979.
- [69] J. E. Wagner *et al.*, “Phase I/II Trial of StemRegenin-1 Expanded Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells Supports Testing as a Stand-Alone Graft,” *Cell Stem Cell*, vol. 18, no. 1, pp. 144–155, 2016, doi: 10.1016/j.stem.2015.10.004.
- [70] S. Cohen *et al.*, “Hematopoietic stem cell transplantation using single UM171-expanded cord blood: a single-arm, phase 1–2 safety and feasibility study,” *Lancet Haematol.*, vol. 7, no. 2, pp. e134–e145, 2020, doi: 10.1016/S2352-3026(19)30202-9.
- [71] P. Flores-Guzmán, V. Fernández-Sánchez, and H. Mayani, “Concise Review: Ex Vivo Expansion of Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem and Progenitor Cells: Basic Principles, Experimental Approaches, and Impact in Regenerative Medicine,” *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 2, no. 11, pp. 830–838, 2013, doi: 10.5966/sctm.2013-0071.
- [72] S. Koestenbauer, A. Zisch, G. Dohr, and N. H. Zech, “Protocols for hematopoietic stem cell expansion from umbilical cord blood,” *Cell Transplant.*, vol. 18, no. 10–11, pp. 1059–1068, 2009, doi: 10.3727/096368909X471288.
- [73] L. Qiu, R. Meagher, S. Welhausen, M. Heye, R. Brown, and R. H. Herzig, “Ex vivo expansion of CD34+ umbilical cord blood cells in a defined serum-free medium (QBSF-60) with early effect cytokines,” *J. Hematotherapy Stem Cell Res.*, vol. 8, no. 6, pp. 609–618, 1999, doi: 10.1089/152581699319777.
- [74] Y. Zhang and Y. Gao, “Novel chemical attempts at ex vivo hematopoietic stem cell expansion,” *Int. J. Hematol.*, vol. 103, no. 5, pp. 519–529, 2016, doi: 10.1007/s12185-016-1962-x.
- [75] B. Alberts *et al.*, *Molecular biology of the cell*, 6th ed. New York, NY: Garland Science, 2015.
- [76] S. K. Nilsson, M. E. Debatis, M. S. Dooner, J. A. Madri, P. J. Quesenberry, and P. S. Becker, “Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ,” *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 46, no. 3, pp. 371–377, 1998, doi: 10.1177/002215549804600311.
- [77] B. Çelebi, D. Mantovani, and N. Pineault, “Effects of extracellular matrix proteins on the growth of haematopoietic progenitor cells,” *Biomed. Mater.*, vol. 6, no. 5, 2011, doi: 10.1088/1748-6041/6/5/055011.
- [78] V. Deutsch *et al.*, “Mimicking the haematopoietic niche microenvironment provides a novel strategy for expansion of haematopoietic and megakaryocyte-progenitor cells from cord blood,” *Br. J. Haematol.*, vol. 149, no. 1, pp. 137–149, 2010, doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.08041.x.
- [79] M. Wiesner, O. Berberich, C. Hoefner, T. Blunk, and P. Bauer-Kreisel, “Gap junctional intercellular communication in adipose-derived stromal/stem cells is cell density-dependent and positively impacts adipogenic differentiation,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 233, no. 4, pp. 3315–3329, Apr. 2018, doi: 10.1002/jcp.26178.

- [80] D. S. Kim *et al.*, “Cell culture density affects the proliferation activity of human adipose tissue stem cells,” *Cell Biochem. Funct.*, vol. 34, no. 1, pp. 16–24, 2016, doi: 10.1002/cbf.3158.
- [81] R. Xue, J. Y. S. Li, Y. Yeh, L. Yang, and S. Chien, “Effects of matrix elasticity and cell density on human mesenchymal stem cells differentiation,” *J. Orthop. Res.*, vol. 31, no. 9, pp. 1360–1365, 2013, doi: 10.1002/jor.22374.
- [82] J.-Y. Ko, J.-Y. Lee, C.-H. Park, and S.-H. Lee, “Effect of cell-density on in-vitro dopaminergic differentiation of mesencephalic precursor cells,” *Neuroreport*, vol. 16, no. 5, pp. 499–503, 2004, [Online]. Available: <https://journals.lww.com/neuroreport>.
- [83] S. J. Singh, W. Turner, D. E. Glaser, K. E. McCloskey, and F. V. Filipp, “Metabolic shift in density-dependent stem cell differentiation,” *Cell Commun. Signal.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–12, 2017, doi: 10.1186/s12964-017-0173-2.
- [84] M. R. Koller, I. Manchel, R. J. Maher, K. L. Goltry, R. D. Armstrong, and A. K. Smith, “Clinical-scale human umbilical cord blood cell expansion in an automated perfusion culture system,” *Exp. Hematol.*, vol. 25, no. 8, p. 826, 1997.
- [85] H. Tian, S. Huang, F. Gong, L. Tian, and Z. Chen, “Karyotyping, immunophenotyping, and apoptosis analyses on human hematopoietic precursor cells derived from umbilical cord blood following long-term ex vivo expansion,” *Cancer Genet. Cytogenet.*, vol. 157, no. 1, pp. 33–36, 2005, doi: 10.1016/j.cancergencyto.2004.06.003.
- [86] E. A. De Wynter, G. Nadali, L. H. Coutinho, and N. G. Testa, “Extensive amplification of single cells from CD34+ subpopulations in umbilical cord blood and identification of long-term culture-initiating cells present in two subsets,” *Stem Cells*, vol. 14, no. 5, pp. 566–576, 1996, doi: 10.1002/stem.140566.
- [87] P. Flores-Guzmán, E. Flores-Figueroa, G. Martínez-Jaramillo, and H. Mayani, “In vitro characterization of two lineage-negative CD34+ cell-enriched hematopoietic cell populations from human UC blood,” *Cytotherapy*, vol. 7, no. 4, pp. 334–344, 2005, doi: 10.1080/14653240500238228.
- [88] P. Flores-Guzman, V. Fernandez-Sanchez, I. Valencia-Plata, L. Arriaga-Pizano, G. Alarcon-Santos, and H. Mayani, “Comparative in vitro analysis of different hematopoietic cell populations from human cord blood: In search of the best option for clinically oriented ex vivo cell expansion,” *Transfusion*, vol. 53, no. 3, pp. 668–678, 2013, doi: 10.1111/j.1537-2995.2012.03799.x.
- [89] A. Muñoz-Rivera-Cambas, P. Flores-Guzmán, and H. Mayani, “The in vitro growth of a cord blood-derived cell population enriched for CD34+ cells is influenced by its cell cycle status and treatment with hydroxyurea,” *Cytotherapy*, vol. 20, no. 11, pp. 1345–1354, 2018, doi: 10.1016/j.jcyt.2018.09.002.
- [90] L. Douay, “Experimental culture conditions are critical for ex vivo expansion of hematopoietic cells,” *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research*, vol. 10, no. 3, 2001, doi: 10.1089/152581601750288948.
- [91] G. H. Kim *et al.*, “High integrity and fidelity of long-term cryopreserved umbilical cord blood for transplantation,” *J. Clin. Med.*, vol. 10, no. 2, pp. 1–13, 2021, doi:

10.3390/jcm10020293.

- [92] C. Schaniel *et al.*, “Evaluation of a clinical-grade, cryopreserved, ex vivo-expanded stem cell product from cryopreserved primary umbilical cord blood demonstrates multilineage hematopoietic engraftment in mouse xenografts,” *Cytotherapy*, vol. 23, no. 9, pp. 841–851, 2021, doi: 10.1016/j.jcyt.2021.04.001.
- [93] M. Jones, A. Cunningham, N. Frank, and D. Sethi, “The monoculture of cord-blood-derived CD34+ cells by an automated, membrane-based dynamic perfusion system with a novel cytokine cocktail,” *Stem Cell Reports*, vol. 17, no. 12, pp. 2585–2594, 2022, doi: 10.1016/j.stemcr.2022.10.006.
- [94] P. Yadav, R. Vats, A. Bano, and R. Bhardwaj, “Hematopoietic Stem Cells Culture , Expansion and Differentiation : An Insight into Variable and Available Media,” vol. 13, no. 3, pp. 326–334, 2020.
- [95] E. Shochat, “Human Haematopoiesis in Steady State and Following Intense Perturbations,” *Bull. Math. Biol.*, vol. 64, pp. 861–886, 2002, doi: 10.1006/bulm.2002.0305.
- [96] E. Manesso, J. Teles, D. Bryder, and C. Peterson, “Dynamical modelling of haematopoiesis : an integrated view over the system in homeostasis and under perturbation,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 10, no. 80, 2013, doi: 10.1098/rsif.2012.0817.
- [97] M. Cavazzana-Calvo, A. Fischer, F. D. Bushman, E. Payen, S. Hacein-Bey-Abina, and P. Leboulch, “Is normal hematopoiesis maintained solely by long-term multipotent stem cells?,” *Blood*, vol. 117, no. 17, pp. 4420–4424, 2011, doi: 10.1182/blood-2010-09-255679.
- [98] A. Alvarado-Moreno, A. Chávez-González, A. Cérbulo, L. Arriaga, and H. Mayani, “In vitro cell cycle dynamics of primitive hematopoietic cells from human umbilical cord blood,” *Hematology*, vol. 15, no. 1, pp. 11–20, 2010, doi: 10.1179/102453310X12583347010016.
- [99] T. A. Venezia *et al.*, “Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells,” *PLoS Biol.*, vol. 2, no. 10, 2004, doi: 10.1371/journal.pbio.0020301.
- [100] K. P. H. Nies *et al.*, “Determination of the proliferative fractions in differentiating hematopoietic cell lineages of normal bone marrow,” *Cytom. Part A*, vol. 93, no. 11, pp. 1097–1105, 2018, doi: 10.1002/cyto.a.23564.
- [101] A. C. Wilkinson, R. Ishida, H. Nakauchi, and S. Yamazaki, “Long-term ex vivo expansion of mouse hematopoietic stem cells,” *Nat. Protoc.*, vol. 15, no. 2, 2020, doi: 10.1038/s41596-019-0263-2.
- [102] I. H. Oh and R. K. Humphries, “Concise review: Multidimensional regulation of the hematopoietic stem cell state,” *Stem Cells*, vol. 30, no. 1, pp. 82–88, 2012, doi: 10.1002/stem.776.
- [103] S. Ayhan, E. Nemitlu, D. U. Çetinkaya, S. Kır, and R. K. Özgül, “Characterization of human bone marrow niches with metabolome and transcriptome profiling,” *J. Cell Sci.*, vol. 134, no. 6, 2021, doi: 10.1242/jcs.250720.
- [104] D. Ehnes, S. Levy, and H. Ruohola-Baker, “Epigenetics and regenerative medicine,” in *Medical Epigenetics*, 2nd ed., 2021, pp. 853–872.
- [105] V. W.C. Yu *et al.*, “Epigenetic memory underlies cell-autonomous heterogeneous behavior

- of hematopoietic stem cells," *Physiol. Behav.*, vol. 165, no. 5, pp. 944–945, 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.02.010.Epigenetic.
- [106] A. E. Rodriguez-Fraticelli *et al.*, "Single-cell lineage tracing unveils a role for TCF15 in haematopoiesis," *Nature*, vol. 583, no. 7817, pp. 585–589, 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2503-6.
- [107] Y. Jung *et al.*, "Cell-to-cell contact is critical for the survival of hematopoietic progenitor cells on osteoblasts," *Cytokine*, vol. 32, no. 3–4, pp. 155–162, 2005, doi: 10.1016/j.cyto.2005.09.001.
- [108] H. B. Sieburg, G. Cattarossi, and C. E. Muller-Sieburg, "Lifespan Differences in Hematopoietic Stem Cells are Due to Imperfect Repair and Unstable Mean-Reversion," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 9, no. 4, 2013, doi: 10.1371/journal.pcbi.1003006.
- [109] T. Walenda *et al.*, "Synergistic effects of growth factors and mesenchymal stromal cells for expansion of hematopoietic stem and progenitor cells," *Exp. Hematology*, vol. 39, pp. 617–628, 2011, doi: 10.1016/j.exphem.2011.02.011.
- [110] G. Sauvageau, N. N. Iscove, and R. K. Humphries, "In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells," *Oncogene*, vol. 23, no. 43 REV. ISS. 6. 2004, doi: 10.1038/sj.onc.1207942.
- [111] L. Papa, M. Djedaini, and R. Hoffman, "Ex vivo HSC expansion challenges the paradigm of unidirectional human hematopoiesis," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1466, no. 1, pp. 39–50, 2020, doi: 10.1111/nyas.14133.
- [112] J. M. Bernitz, H. S. Kim, B. MacArthur, H. Sieburg, and K. Moore, "Hematopoietic Stem Cells Count and Remember Self-Renewal Divisions," *Cell*, vol. 167, no. 5, pp. 1296–1309.e10, 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.10.022.
- [113] Q. Ma, Y. Wang, A. S. Y. Lo, E. M. Gomes, and R. P. Junghans, "Cell density plays a critical role in ex vivo expansion of T cells for adoptive immunotherapy," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2010, 2010, doi: 10.1155/2010/386545.
- [114] N. Mende, S. Rahmig, and C. Waskow, "Multilineage readout after HSC expansion – erythrocytes matter," *Cell Cycle*, vol. 15, no. 8. 2016, doi: 10.1080/15384101.2016.1156904.
- [115] R. Dircio-Maldonado *et al.*, "Functional Integrity and Gene Expression Profiles of Human Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Generated In Vitro," *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 7, no. 8, pp. 602–614, 2018, doi: 10.1002/sctm.18-0013.
- [116] S. Bari *et al.*, "Expansion and Homing of Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem and Progenitor Cells for Clinical Transplantation," *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 21, no. 6, pp. 1008–1019, 2015, doi: 10.1016/j.bbmt.2014.12.022.
- [117] C. M. Schürch, C. Riether, and A. F. Ochsenbein, "Cytotoxic CD8+ T cells stimulate hematopoietic progenitors by promoting cytokine release from bone marrow mesenchymal stromal cells," *Cell Stem Cell*, vol. 14, no. 4, pp. 460–472, 2014, doi: 10.1016/j.stem.2014.01.002.
- [118] D. N. Haylock, L. B. To, T. L. Dowse, C. A. Juttner, and P. J. Simmons, "Ex vivo expansion and

maturation of peripheral blood CD34+ cells into the myeloid lineage," *Blood*, vol. 80, no. 6, 1992, doi: 10.1182/blood.v80.6.1405.1405.

- [119] P. Flores-Guzmán, G. Martínez-Jaramillo, J. J. Montesinos, I. Valencia, and H. Mayani, "Growth kinetics of progenitor cell-enriched hematopoietic cell populations in long-term liquid cultures under continuous removal of mature cells," *Cytotherapy*, vol. 8, no. 3, pp. 299–307, 2006, doi: 10.1080/14653240600735776.
- [120] K. A. Matatall *et al.*, "Chronic Infection Depletes Hematopoietic Stem Cells through Stress-Induced Terminal Differentiation," *Cell Rep.*, vol. 17, no. 10, pp. 2584–2595, 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.031.
- [121] D. Walter *et al.*, "Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells," *Nature*, vol. 520, no. 7548, pp. 549–552, 2015, doi: 10.1038/nature14131.
- [122] V. Fernández-Sánchez *et al.*, "In vitro effects of stromal cells expressing different levels of Jagged-1 and Delta-1 on the growth of primitive and intermediate CD34 + cell subsets from human cord blood," *Blood Cells, Mol. Dis.*, vol. 47, no. 4, pp. 205–213, 2011, doi: 10.1016/j.bcmed.2011.08.003.
- [123] H. Mayani, M. T. Little, W. Dragowska, G. Thornbury, and P. M. Lansdorp, "Differential effects of the hematopoietic inhibitors MIP-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ , and TNF- $\alpha$  on cytokine-induced proliferation of subpopulations of CD34+ cells purified from cord blood and fetal liver," *Exp. Hematol.*, vol. 23, no. 5, 1995.
- [124] H.-W. Snoeck *et al.*, "Interferon  $\gamma$  Selectively Inhibits Very Primitive CD34<sup>+</sup> + CD38<sup>-</sup> and Not More Mature CD34 + CD38 + Human Hematopoietic Progenitor Cells," *J. E.*, vol. 180, pp. 1177–1182, 1994.
- [125] S. Schicktanz, "Xenotransplantation," *Encycl. Appl. Ethics Vol. 1-4, Second Ed.*, vol. 1–4, pp. 565–574, Jan. 2012, doi: 10.1016/B978-0-12-373932-2.00052-1.
- [126] B. García-De-Teresa, A. Rodríguez, and S. Frias, "Chromosome instability in fanconi anemia: From breaks to phenotypic consequences," *Genes (Basel)*, vol. 11, no. 12, pp. 1–35, 2020, doi: 10.3390/genes11121528.