



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE SOPORTE LINFOPOYÉTICO DE LAS
CÉLULAS TRONCALES/ESTROMALES MESENQUIMALES PROVENIENTES DE
TEJIDO ADULTO Y NEONATAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. LUNA CAÑEDO IXEL

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

CD. MX., DICIEMBRE, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE SOPORTE LINFOPOYÉTICO DE LAS
CÉLULAS TRONCALES/ESTROMALES MESENQUIMALES PROVENIENTES DE
TEJIDO ADULTO Y NEONATAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. LUNA CAÑEDO IXEL

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., DICIEMBRE, 2019

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/1181/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **27 de mayo de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **LUNA CAÑEDO IXEL** con número de cuenta **307056980** con la tesis titulada "**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE SOPORTE LINFOPOYÉTICO DE LAS CÉLULAS TRONCALES/ESTROMALES MESENQUIMALES PROVENIENTES DE TEJIDO ADULTO Y NEONATAL**", realizada bajo la dirección del **DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Vocal: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ
Secretario: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO
Suplente: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
Suplente: DRA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 05 de noviembre de 2019

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos:

Agradecimientos:

Al posgrado de ciencias Biológicas de la UNAM, por la oportunidad y el apoyo otorgado.

Al CONACYT por apoyarme mediante una beca durante estos dos años de maestría.

A los miembros de mi comité tutor a la Dra. Rosana Pelayo Camacho por sus consejos y aportaciones en el área metodológica como de enfoque para este proyecto así mismo por abrirme las puertas de su laboratorio durante la maestría, al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por sus consejos y aportaciones desde el inicio hasta el final de éste proyecto.

A título personal...

Al mi tutor principal, el Dr. Juan José Montesinos por aceptarme para trabajar en su laboratorio, tiempo en el cual siempre me brindó su apoyo y me dio la oportunidad de crecer tanto profesional como personalmente.

Al Dr. Juan Carlos Balandrán y a la Dra. Guadalupe Fajardo Orduña por la paciencia y adiestramiento en la realización de cocultivos hematopoyéticos que fueron fundamentales en este proyecto.

Al M.C Víctor Adrián Cortes por su enseñanza en área de citometría de flujo y consejos en la parte experimental, pero sobre todo por su gran amistad y cariño.

Al técnico Martina por sus regaños, enseñanzas y consejos que me fueron de gran ayuda para mejorar mi forma de trabajo en el laboratorio, pero también por su gran cariño.

A la Dra. Pati Flores por brindarme muestras de sangre de cordón umbilical, así como su manipulación.

A Damián C., por su amistad, risas, consejos y apoyo incondicional, a Pilar, Lucero, Gaby, Keyra, Erika y Charly por ser un gran equipo de trabajo y convertirse en grandes amigos para mi, ya que hicieron del trabajo en el laboratorio más divertido.

A mis padres Héctor e Irma, mis logros siempre serán para ustedes y por ustedes, les estaré agradecida la vida entera, a mi hermana Alecita por su gran cariño y apoyo, los amo muchísimo, a JC por siempre estar a pesar de todo, este trabajo se los dedico a ustedes.

ÍNDICE

Índice de figuras

Índice de tablas

Lista de abreviaturas

I RESUMEN	1
II ABSTRACT	3
III INTRODUCCIÓN	4
1. Las células troncales.....	4
2. La medula ósea como órgano hematopoyético	6
2.1 Concepto de hematopoyesis.....	6
2.2 Sistema hematopoyético	6
2.3 Sistema estromal	8
3. Características del sistema hematopoyético.....	10
3.1 La mileopoyesis	10
3.1.1 Diferenciación eritroide-megacariocítica	11
3.1.2 Diferenciación gránulo-monocítica	12
3.2 Linfopoyesis.....	13
3.2.1 Progenitores linfoides tempranos.....	13
3.2.2 Diferenciación de células B	14
3.2.3 Diferenciación de células T	15
3.2.4 Diferenciación de células NK.....	16
3.2.5 Diferenciación de las células dendríticas	17
3.2.6 Linfopoyesis estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	18
4. Células troncales/estromales mesenquimales (MSCs)	20
4.1 Biología de las MSCs	20
4.2 Capacidad de soporte hematopoyético de las MSCs	20
4.2.1 Participación de las MSCs en la expansión y proliferación de HSCs (estudios <i>in vitro</i>)....	23
4.2.2 Soporte hematopoyético, estudios en modelos animales	23
4.2.3 Soporte hematopoyético en estudios clínicos	24
4.3 Fuentes alternativas de MSCs	26
IV ANTECEDENTES	29
V PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
VI HIPÓTESIS	30
VII OBJETIVOS	31
VIII METODOLOGÍA	31
IX RESULTADOS	36
X DISCUSIÓN	51
XI CONCLUSIONES	60
XII PERSPECTIVAS	61
XIII LITERATURA CITADA	62

Índice de Figuras

Figura 1. Potencialidad de las células	5
Figura 2. Esquema del sistema hematopoyético.....	7
Figura 3. Sistema estromal de la médula ósea	8
Figura 4. Diferenciación eritroide-megacariocítica	12
Figura 5. Diferenciación gránulo-monocítica.....	13
Figura 6. Desarrollo temprano de células B y su regulación.....	15
Figura 7. El desarrollo de células NK.....	17
Figura 8. Las MSCs y su distribución en el nicho hematopoyético	22
Figura 9. Fotografías representativas de la morfología de las MSCs.....	37
Figura 10. Diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica.....	39
Figura 11. Evaluación de poblaciones linfoides en muestras enriquecidas de SCU	40
Figura 12. Proliferación de células hematopoyéticas totales	41
Figura 13. Presencia de células CD45+ en cocultivo.....	43
Figura 14. Diferenciación dendrítico-monocítica	44
Figura 15. Diferenciación NK	47
Figura 16. Diferenciación IKDC	49
Figura 17. Diferenciación linfoide B.....	50

Índice de Tablas

Tabla 1. Moléculas secretadas por las MSCs que participan en la hematopoyesis.....	21
Tabla 2. Estudios clínicos con el uso de MSCs de MO	26
Tabla 3. Moléculas que regulan la hematopoyesis secretadas y expresadas por las MSCs	28
Tabla 4. Inmunofenotipo de las MSCs	38
Tabla 5. Porcentajes de enriquecimiento de las muestras de SCU	39

Lista de abreviaturas

Ang-1:	angiopoyetina-1
CAFC:	células formadoras de áreas de adoquines*
Células CAR:	células reticulares que secretan altos niveles de CXCL12*
CD	grupo de diferenciación*
CFC:	célula formadora de colonias
CFC-E:	célula formadora de colonias eritroides
BFC-E:	célula formadora de explosión eritroide*
CFC-M:	célula formadora de colonias de monocitos
CFC-Mixta:	célula formadora de colonia mixta
CFC-GM:	célula formadora de colonias de granulocitos y monocitos
CLP	Progenitor linfoide común
CMNs:	células mononucleares
CMP	progenitor mieloide común
CPH:	células progenitoras hematopoyéticas
DCs	células dendríticas*
EICH:	enfermedad de injerto contra hospedero
ELP:	progenitor linfoide temprano*
ETP:	progenitor temprano de timo*
FGF:	factor de crecimiento de fibroblastos
Flt-3L:	ligando del receptor tirosina cinasa parecido a c-fms tipo 3*
FTOC	cultivos de órganos tímicos fetales*
G-CSF:	factor estimulador de colonias de granulocitos*
GM-CSF:	factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos*
GMP:	progenitor de granulocitos y macrófagos
GW:	gelatina de Wharton
HPC:	célula progenitora hematopoyética*
HSC:	célula troncal hematopoyética*
ICAM:	molécula de adhesión intracelular*
IKDCs:	células dendríticas asesinas productoras de interferon γ *
IL:	Interleucina
ISCT:	sociedad internacional de terapia celular*
LFA-3:	antígeno asociado a la función leucocitaria*
Lin:	linaje

LIF	factor inhibidor de leucemia*
LMPP	progenitor multipotente primado a linaje linfoide*
LSP	progenitor L selectina+*
LTC-IC:	células iniciadoras de cultivos a largo plazo*
PL:	placenta
MEC:	matriz extracelular
MEP:	progenitor eritroide-megacariocítico
MLP:	progenitor multilinfoide*
MO:	médula ósea
MPP:	progenitor multipotente*
MSC:	célula troncal mesenquimal*
NKs:	células asesinas naturales*
NKP:	progenitor de células NK
SCF:	factor de células troncales*
SCU	sangre de cordón umbilical
TCR	receptor de células T*
TNF α	factor de necrosis tumoral α

*por sus siglas en inglés

I. RESUMEN

La hematopoyesis es el proceso mediante el cual se forman las células de la sangre y tiene lugar en la médula ósea (MO). Es un proceso altamente regulado por el microambiente de la MO, principalmente por las células troncales/estromales mesenquimales (MSCs *por sus siglas en inglés Mesenchymal Stem/Stromal Cells*). Se ha visto tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos murinos que las MSCs de MO (MSC-MO), de placenta (MSC-PL), de sangre de cordón umbilical (MSC-SCU) y de gelatina de Wharton (MSC-GW), favorecen la expansión de HPCs (*por sus siglas en inglés Hematopoietic Progenitor Cells*) mieloides. Por otro lado, poco se conoce acerca de la linfopoyesis en humanos y lo que se sabe proviene de estudios en modelos humanizados de ratón o mediante el uso de cocultivos con células estromales murinas. Muy pocos estudios han evaluado la capacidad de las MSCs para favorecer la formación de células linfopoyéticas y ello se ha realizado únicamente con MSC-MO, particularmente sobre la producción de precursores linfoides tempranos B T/NK a partir de HPCs. En este trabajo se pretende evaluar la generación de diversos linajes linfoides a partir de una población hematopoyética con fenotipo troncal CD34+CD38-Lin-, utilizando como monocapa alimentadora hematopoyética MSCs provenientes de MO (tejido adulto), así como de tejidos neonatales (SCU, PL, y GW). Para ello utilizamos dos sistemas de co-cultivo: a) en el primero (sistema 1), además de utilizar monocapas de MSCs de las diferentes fuentes, se utilizó un coctel de citocinas 1 (C1) constituido por IL-7, SCF, Flt3-L e IL-15 y con lo cual se evaluó la generación de subpoblaciones de células NK, células dendríticas asesinas productoras de interferón gama (IKDCs *por sus siglas en inglés interferon killer dendritic cells*) y algunas poblaciones de origen mieloides como células dendríticas convencionales y monocitos no clásicos; b) en el segundo (sistema 2), además de las MSCs se utilizó otro coctel, coctel 2 (C2) constituido por IL-7, SCF y Flt3-L, con lo cual se analizó la linfopoyesis de linfocitos B. Con el sistema 1 de cocultivo se observó que en presencia de citocinas (C1), las MSCs de fuentes neonatales favorecieron significativamente la expansión de células IKDCs CD56^{low} CD11c^{low} en comparación con las MSCs de MO. Además, en esta misma condición de cocultivo, observamos que únicamente las MSCs de PL y SCU favorecieron la generación de monocitos no clásicos CD16⁺. La generación de IKDCs y monocitos no clásicos favorecida por MSCs de tejidos neonatales, parece estar relacionada con características biológicas proinflamatorias de este tipo de MSCs a diferencia de aquellas de MO. Asimismo, y de manera interesante, en estos co-cultivos observamos que las MSC-SCU favorecieron los mayores rendimientos en la generación de células dendríticas convencionales, mientras que MSCs de SCU y PL favorecieron la generación de prácticamente todas las subpoblaciones de NKs CD56^{low/-} a diferencia de aquellas provenientes de MO y GW. Por su parte las NKs CD56^{hi} CD16⁻ productoras de citocinas fueron generadas por todas las fuentes de MSCs a excepción de las MSCs de GW. Por otra parte, empleando el sistema 2 de cocultivo en presencia de citocinas (C2), se observó que las MSCs de PL y SCU fueron las únicas que favorecieron significativamente la generación de la fracción que engloba a los precursores de linfocitos B, linfocitos B inmaduros y maduros (PreB)/iB-mB), en comparación con aquellas MSCs de MO y GW. Sin embargo, las MSCs de MO solo fueron capaces de generar progenitores de células B (Pro B), al igual que aquellas de SCU. Con estos resultados podemos concluir que las MSCs de fuentes neonatales en especial las MSCs de PL y SCU bajo los sistemas de cocultivo analizados, tienen mayor capacidad linfopoyética en comparación con aquellas provenientes de MO y GW. Esta característica biológica puede repercutir en el uso clínico de las MSCs de SCU y PL en procedimientos de terapia celular. Finalmente, en este trabajo fueron generados dos nuevos sistemas

de cocultivo utilizando fuentes de MSCs neonatales humanas como soporte para la generación de linfocitos, lo cual es una gran aportación para el estudio de la linfopoyesis.

II. ABSTRACT

Hematopoiesis is the process through which blood cells are generated in bone marrow (BM). This process is highly regulated by the microenvironment of BM mainly by Mesenchymal Stem Cells (MSCs). It has been demonstrated that MSCs from BM (BM-MSCs), placenta (PL-MSCs), umbilical cord blood (UCB-MSCs) and Wharton's jelly (WJ MSCs) favour the expansion of Hematopoietic Progenitor Cells (HPCs) of myeloid lineage, both in vitro and in vivo murine models. On the other hand, little is known about human lymphopoiesis, and all about it comes from results obtained of humanized mouse models or cocultures with murine stromal cells. Few studies with BM-MSCs have evaluated the role of MSCs to support lymphopoiesis and only regarding to generation of B T/NK early precursors from HPCs. In this study we decided to evaluate the generation of diverse lymphoid lineages from hematopoietic progenitor/stem cell with primitive phenotype CD34⁺CD38⁻Lin⁻ by using MSCs feeder layer from BM (adult tissue) and UCB, PL and WJ (neonatal tissues). We used two co-culture systems: a) the system 1, which consisted of MSCs monolayers from different sources and a cytokine cocktail 1 (C1) constituted with IL-7, SCF, Flt3-L and IL-15. In this system we evaluated the generation of natural killer cells subpopulations (NKs), interferon killer dendritic cells (IKDCs) and some populations of myeloid origin as conventional dendritic cells and non-classical monocytes; b) the system 2, consisted of MSCs monolayers and cytokine cocktail 2 (C2) constituted of IL-7, SCF, Flt3-L through which we evaluated lymphopoiesis B. Using system 1 of culture we observed that neonatal MSCs favored significantly the expansion of CD56^{low} CD11c^{low} IKDCs compared with BM-MSCs. In addition we observed that only MSCs from UCB and PL favored generation of CD16⁺ non-classical monocytes. The generation of IKDCs and non-classical monocytes favored by neonatal MSCs, seems to be associated with a proinflammatory characteristic of such MSCs in contrast to BM-MSCs. Interestingly, we observed that UCB-MSCs favored the generation of higher yields of conventional dendritic cells, meanwhile MSCs from PL and UCB favored the generation of practically all subpopulations of CD56^{low/-} NKs in contrast to BM-MSCs and WJ-MSCs. CD56^{hi} CD16⁻ NKs producers of cytokines, were generated by all cocultures with MSCs in the presence of cytokines except MSCs from WJ. On the other hand, using system 2, we observed that MSCs from PL and UCB were the only that favored significantly the generation of B cells precursors, immature B cells and mature B cells (Pre B/iB-mB) fraction. In fact, BM-MSCs and UCB-MSCs only were able to generate B cells progenitors (Pro B). In conclusion, under the co-culture systems used, MSCs from neonatal tissues, especially those of PL and UCB, have a higher lymphopoietic support capacity compared to MSCs from BM and WJ. This biological characteristic of MSCs from UCB and PL may have implications to their potential clinical use in cell therapy. Finally we generate two new coculture systems supported with neonatal MSCs for generation of lymphoid cells, which is a great contribution for lymphopoiesis study.

III. INTRODUCCIÓN

1. Las Células Troncales

Una célula troncal es definida por su capacidad de autorenovación y de diferenciación a distintos linajes, es decir tiene la capacidad de generar células con sus mismas características y células diferenciadas con una función más específica (Lanza & Atala 2009).

La autorenovación requiere del control del ciclo celular y el mantenimiento de la potencialidad. Las células troncales aunque tienen gran capacidad para autorrenovarse, su capacidad proliferativa es baja, es decir se encuentran en fase de quiescencia, lo cual les permite mantener por largos periodos el reservorio de células troncales. A la capacidad de diferenciación de una célula se le conoce como potencialidad (Marín-Llera & Chimal Monroy 2017).

Existen distintos tipos de células troncales de acuerdo con su potencialidad para originar diferentes linajes celulares y se dividen en: pluripotentes, multipotentes y unipotentes. Las células troncales pluripotentes se obtienen de la masa celular interna del blastocisto y pueden diferenciarse *in vitro* a linajes de las tres capas germinales (Grigor'eva et al, 2011), estas células también han sido denominadas células troncales embrionarias (ESC del inglés *embryonic stem cells*) y aunque *in vivo* no existe evidencia de que puedan autorrenovarse, *in vitro* si lo pueden hacer y por ello son consideradas células troncales (Marín-Llera & Chimal Monroy 2017). Las células troncales multipotentes se diferencian a distintos linajes de una misma capa germinal, un ejemplo de ellas son las células troncales hematopoyéticas (HSC del inglés, *Hematopoietic Stem Cells*)(Marín-Llera & Chimal Monroy 2017). Las células troncales unipotentes son capaces de diferenciarse a un linaje de solo una capa germinal un ejemplo de ellas son las espermatogonias, que solo dan origen a los espermatozoides (Nickkholgh et al, 2014) (Figura 1).

Aunque el cigoto claramente es una célula totipotencial con capacidad de dar origen a células embrionarias y extraembrionarias durante el desarrollo embrionario, no es considerado una célula troncal en el sentido estricto de la palabra, a pesar de que una de las características de la célula troncal es su capacidad de originar a todas las células de un organismo término acuñado por Haeckel, el concepto actual de célula troncal incluye la capacidad de autorenovación. Se sabe que durante el desarrollo embrionario temprano de los organismos animales, los embriones pueden presentar un desarrollo invariable, esto significa que los determinantes citoplasmáticos del huevo fertilizado son segregados en blastómeros distintos y cada blastómero da origen a una región del embrión. Incluso cuando hay un desarrollo embrionario regulador o variable en la cual hay una distribución homogénea de los determinantes citoplasmáticos que permite que durante las primeras divisiones se generen blastómeros con igual potencialidad, inclusive si son separados cada uno presenta la característica de

totipotencialidad y es capaz de formar a un individuo completo, sin embargo esto no significa que sea una célula troncal, ya que no hay evidencia de que los blastómeros tengan la capacidad de autorrenovación que permitan perpetuar su población (Marín-Llera & Chimal Monroy 2017).

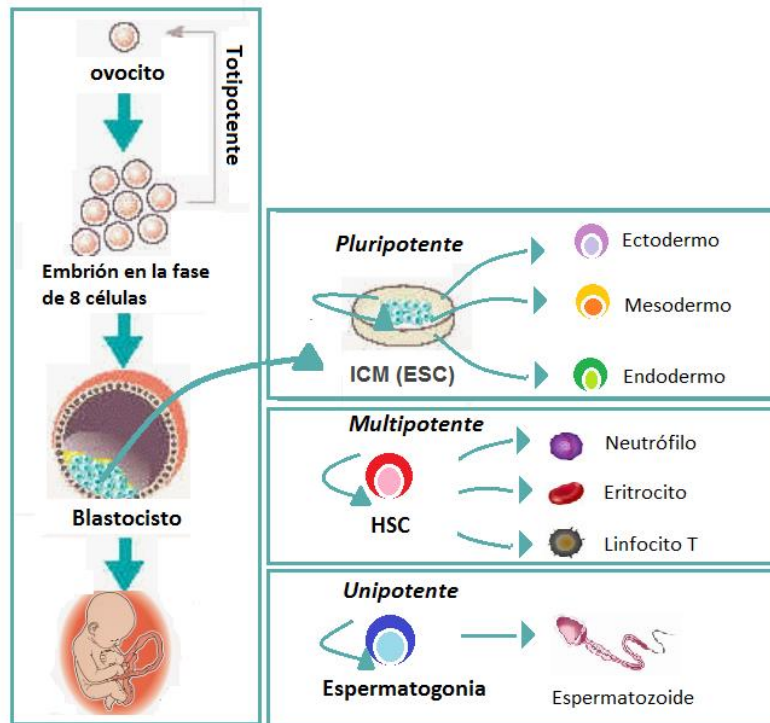


Figura 1. Potencialidad de las células. La potencialidad de las células depende de su origen embrionario y su especificación a lo largo del desarrollo embrionario, el cigoto es la única célula totipotente, la cual da origen a todos los tipos celulares del organismo, incluso el extraembrionario. Las células troncales pluripotentes se obtienen de la masa celular interna (ICM por sus siglas en inglés *inner cell mass*) del blastocisto y pueden diferenciarse *in vitro* a linajes de las tres capas germinales. Las células troncales multipotentes se diferencian a distintos linajes de una misma capa germinal, por ejemplo, las células troncales hematopoyéticas las cuales generan cualquier célula del linaje hematopoyético. Las células troncales unipotentes son capaces de diferenciarse a un linaje de sólo una capa germinal. Tomada y modificada de Marín Llera y Chimal-Monroy en *Células Troncales biología y aplicaciones en biomédicina*.

La frecuencia de células troncales en los tejidos es muy baja y no poseen características morfológicas que puedan utilizarse para su identificación, por lo tanto, en la actualidad la forma de reconocer a estas células incluye tanto análisis inmunofenotípico (es decir, la expresión de moléculas de membrana o intracelulares), como la expresión de genes que pueden actuar como marcadores. Sin embargo, son los ensayos funcionales, tanto *in vivo* como *in vitro*, los que determinan la identidad de toda célula troncal. En la mayoría de los tejidos entre las células troncales y su progenie totalmente diferenciada, existen poblaciones intermedias de células progenitoras y precursoras que no son capaces

de autorenovarse, pero que poseen capacidad de proliferación y un restringido potencial de diferenciación. Una de las principales funciones de esta población de células progenitoras es aumentar el número de células diferenciadas por cada división de células troncales (Pelayo & Vadillo 2011).

La auto-renovación, proliferación y diferenciación de las células troncales, son procesos que dependen de diversos factores, tanto intrínsecos como extrínsecos. Los primeros comprenden una variedad de moléculas presentes en las células de acuerdo con el tejido o linaje al que pertenece; los segundos, incluyen a todos los tipos celulares y sus productos que forman parte del microambiente en el que la célula se desarrolla. En otras palabras, la función de las células troncales depende de factores reguladores intrínsecos que son modulados por señales externas (Pelayo & Vadillo 2011). Un ejemplo claro de la regulación de las células troncales por su microambiente, es el caso de las células troncales hematopoyéticas en la médula ósea (MO), este órgano en etapa postnatal está compuesto por dos sistemas celulares principales: el sistema hematopoyético y el sistema estromal, quienes coexisten y trabajan conjuntamente (Bianco et al, 2001).

2. La médula ósea como órgano hematopoyético

2.1 Concepto de hematopoyésis

La MO se localiza dentro de las cavidades de los huesos largos y planos y es el órgano encargado de la hematopoyésis, proceso en el cual células troncales hematopoyéticas proliferan y se diferencian, dando lugar a distintos tipos de células maduras circulantes (i.e, eritrocitos, granulocitos, linfocitos, monocitos y plaquetas) (Mayani et al, 2007). Como se mencionó anteriormente la MO está formada por dos sistemas: El sistema hematopoyético y el sistema estromal.

2.2 El sistema hematopoyético

El sistema hematopoyético puede ser dividido con base en el grado de madurez de las células que lo conforman y a los distintos linajes celulares que se generan. De acuerdo con el grado de maduración celular se han identificado cuatro compartimentos. El primer compartimento corresponde a las células más primitivas o HSCs. Las HSCs constituyen el 0.01% del total de las células nucleadas presentes en la MO. Estas células expresan antígenos como CD34 y carecen de la expresión de antígenos específicos como CD45RA, marcadores de linaje como CD3, CD4, CD14, CD16, CD56, CD8, CD19, CD20, CD33, CD38, CD57, CD71 y glicoforina A (Wognum, et al, 2003; Doulatov et al, 2010). En ellas la expresión de CD90, CD117, CD133 y VEGFR las distingue de estadios más avanzados de diferenciación. (Balandrán JC & Pelayo, R. 2016) (Figura 2).

Las HSCs dan origen a las células progenitoras hematopoyéticas (HPCs del inglés, *hematopoietic progenitor cell*), las cuales han perdido su capacidad de autorrenovación pero conservan su potencial proliferativo. Estas pueden ser multipotenciales y diferenciarse a diversos linajes oligopotenciales, restringidos a 2 o 3 linajes (Pelayo et al, 2017). Las HPCs constituyen el segundo compartimiento del sistema hematopoyético, el cual corresponde a <0.5% del total de células de la MO; comparten ciertas características inmunofenotípicas con las HSCs, como la expresión del antígeno CD34, y comienzan a expresar CD38 y marcadores de linaje (Civin y Gore, 1993; Kondo M. et al, 2003) (Figura 2).

Las HPCs dan lugar a células precursoras comprometidas a linaje o unipotenciales y con elevada capacidad proliferativa, además de que son reconocibles por su morfología (tercer compartimento). Las células precursoras constituyen la gran mayoría de las células de la MO (>90% de las células hematopoyéticas residentes en la cavidad medular). Finalmente, el cuarto compartimento corresponde a las células en vías de maduración y maduras en MO y sangre periférica, las cuáles son funcionales, morfológica y fenotípicamente reconocibles (Mayani et al, 2007; Pelayo et al, 2017) (Figura 2).

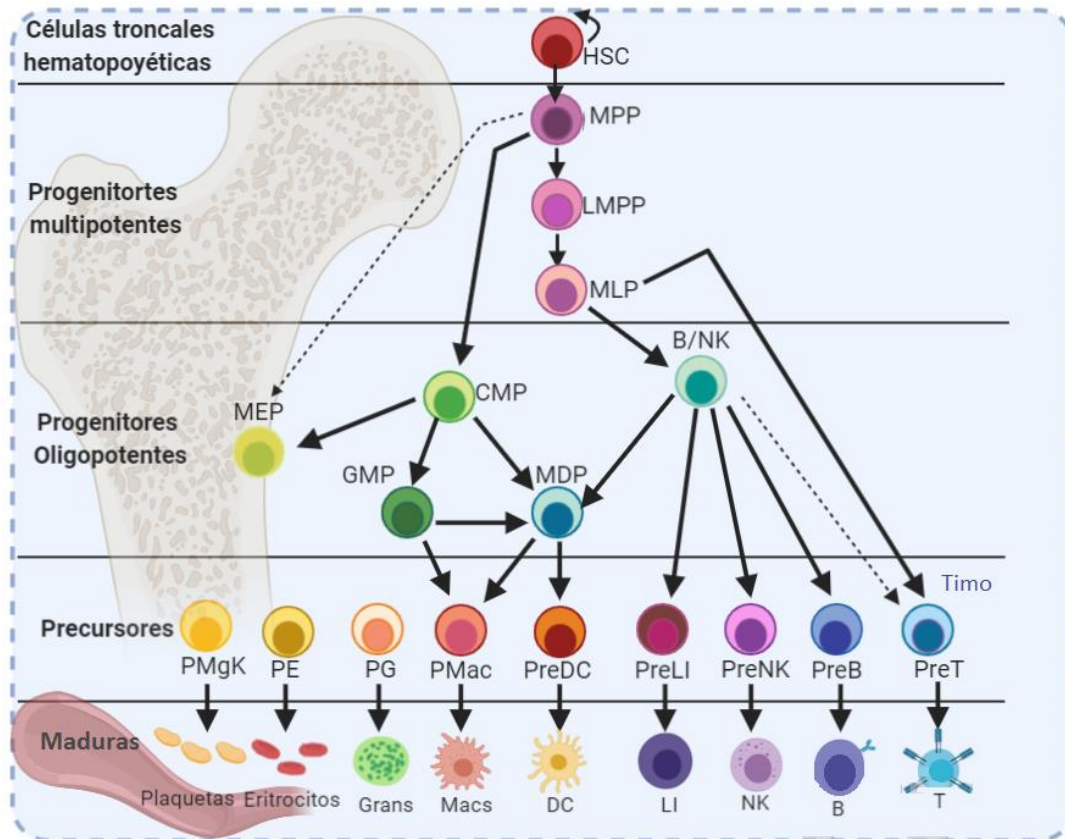


Figura 2. Esquema del sistema hematopoyético con los cuatro compartimientos jerárquicos. Imagen modificada de Balandran y Pelayo, 2016.

2.3 El Sistema estromal

El sistema estromal está conformado por varios tipos celulares que en conjunto producen proteínas de la matriz extracelular (MEC), moléculas de adhesión y citocinas que regulan las hematopoyesis. Las células que conforman al sistema estromal son: los adipocitos, las células endoteliales, los macrófagos, las células reticulares, los osteoblastos y las células troncales/estromales mesenquimales (MSCs del inglés, *Mesenchymal Stem Cells*). Estas últimas, además de formar parte del microambiente de la MO también pueden diferenciarse a células que forman el estroma, como los adipocitos, osteoblastos y células reticulares (Figura 3).

CÉLULAS ESTROMALES Y MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS

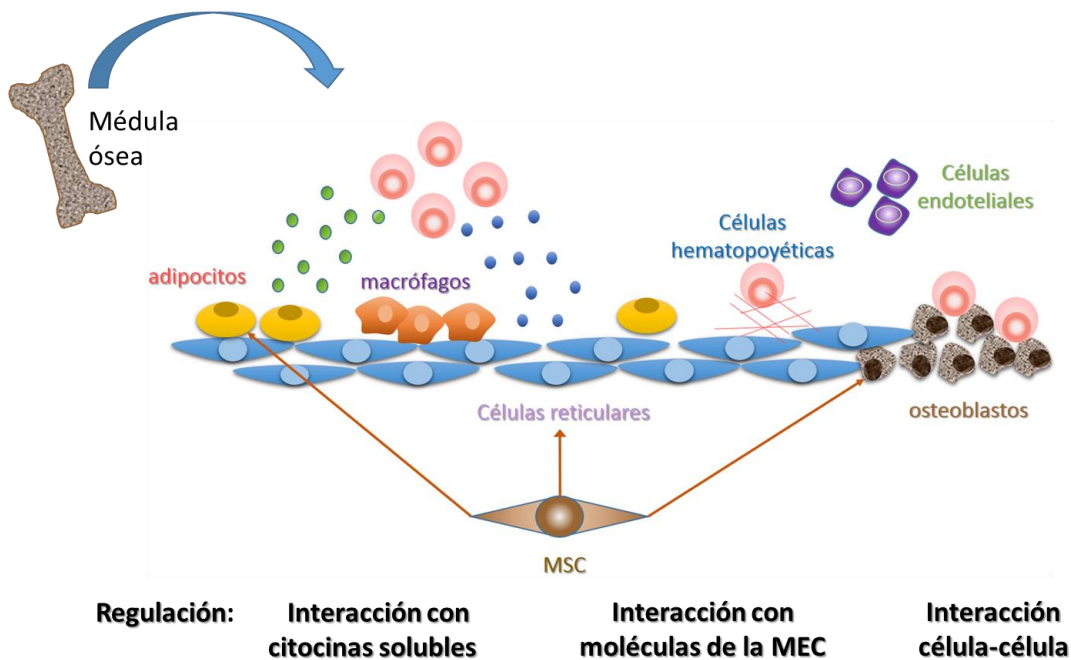


Figura 3. Sistema estromal de la médula ósea. Esquema representativo de las células que conforman el sistema estromal de la MO. Los adipocitos, células endoteliales, macrófagos, células reticulares, osteoblastos y las MSCs forman parte del microambiente de la MO y regulan la proliferación, supervivencia, maduración, autorrenovación y migración de las células hematopoyéticas a través de tres mecanismos: (1) secreción de citocinas y quimiocinas, (2) la interacción a través de matriz extracelular y (3) el contacto célula-célula mediante moléculas de adhesión y morfógenos. Modificado de Mayani et al, 2007.

Los adipocitos en la MO se incrementan con la edad, y llegan a ocupar el 50% de las cavidades en la MO. El aumento de tejido adiposo resulta en una disminución de la actividad hematopoyética (Naveiras et al, 2009; Tuljapurkar et al, 2011). Sin embargo, varios experimentos evidencian que los

adipocitos soportan la hematopoyesis de manera positiva (Corre et al, 2004 2006; Di Mascio et al, 2007; Gainsford et al, 1996; Laharrague et al, 1998; Poloni et al, 2015). Se ha propuesto que los adipocitos contribuyen junto con otras células del microambiente de la MO para mantener la regulación y supervivencia de las HSCs, protegiéndolas de un estímulo excesivo de proliferación y diferenciación que pudiera llevar a un agotamiento de las reservas de HSCs (Mattiucci et al, 2018). Los adipocitos secretan adiponectina que aumenta la proliferación de HSCs *in vitro* (Di Mascio et al, 2007), otros estudios han demostrado que esta molécula está asociada con la regulación de HSCs (Cawthorn et al, 2014). Además, los adipocitos secretan otras moléculas importantes para la proliferación y diferenciación de HSCs como leptina, CXCL12, IL-3, IL-8, el factor estimulante de colonias 3 (CSF3 del inglés, *colony-stimulating factor 3*), y el factor inhibidor de leucemia (LIF del inglés, *leukemia inhibitory factor*) (Mattiucci et al, 2018).

Las células endoteliales expresan muchos genes implicados en el mantenimiento de las HSCs, incluyendo CXCL12, stem cell factor (SCF) y angiopoyetina, que inducen la proliferación de HSCs *in vitro* (Chute, et al, 2006). Se ha demostrado que la delección de la molécula de adhesión endotelial E-selectina resulta en un incremento de la quiescencia de las HSCs, sugiriendo que las células endoteliales participan en la proliferación de HSCs (Winkler et al, 2012). Además, las células endoteliales participan en el mantenimiento de HSCs mediante la secreción de SCF (ligando c-kit) (Ding et al, 2012).

Los macrófagos regulan la hematopoyésis mediante la secreción de factores hematopoyéticos como el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF del inglés, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF por sus siglas en inglés, *macrophage colony-stimulating factor*) e interleucinas IL-10, IL-3, IL-6, IL-8 y TNF α (Taichman et al, 1996). Por otro lado, ayudan al mantenimiento del nicho endosteal ya la permanencia de HSCs en el mismo (Winkler et al, 2012).

Las células reticulares productoras de CXCL12 o células CAR (por sus siglas en inglés, *CXCL12-abundant reticular*), son células progenitoras mesenquimales que tienen la capacidad de diferenciarse hacia adipocitos y osteoblastos (Omatsu et al, 2010). Éstas células son requeridas para la proliferación de células progenitoras eritroides y de células B, así como para el mantenimiento de HSCs en estado indiferenciado (Sugiyama et al, 2006; Omatsu et al, 2010). Además, las células CAR son las de mayor producción de SCF y CXCL12 en la MO (Anthony & Link, 2014).

Los osteoblastos producen CXCL12 y osteopontina involucradas en la retención y mantenimiento de las HSCs en MO, así como angiotensina (Ang-1), trombopoyetina (TPO) y SCF que mantienen a las HSCs en estado quiescente (Nagasawa et al, 2011). Se sabe que el número de HSCs incrementa conforme aumenta conforma aumenta el número de osteoblastos y que las HSCs se encuentran adjuntas a células ósteoblásticas sobre la superficie del hueso (Zhang et al, 2003).

Las MSCs además de dar origen a la mayoría de los diversos tipos celulares estromales que componen la MO (Figura 3), tienen la capacidad de autorrenovarse, secretan diversas moléculas que participan en la hematopoyésis como IL-6, IL-11, M-SCF, GM-SCF, SCF, ligando de la tirosina fetal 3 (FLT-3L del inglés, *Fms-related tyrosine kinase 3 ligand*), TPO, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF del inglés, *fibroblast growth factor*). Además, son capaces de inducir señalización célula-célula a través de moléculas como ICAM-1 y 2, VCAM-1, L-selectina e integrinas y la producción de moléculas de matriz extracelular, como: colágenas I,III,IV y VI, laminina trombospondina y fibronectina (Fajardo-Orduña et al, 2015)

3. Características del sistema hematopoyético

Las HSCs tienen la capacidad de autorenovarse y son células troncales multipotenciales que dan origen a todas las estirpes celulares que integran el sistema hematopoyético a través de un proceso denominado hematopoyésis, las HSCs residen en el hígado, pulmón, riñón y bazo en la etapa fetal y en la MO a partir del nacimiento (Christensen et al, 2004).

Las células sanguíneas han sido clasificadas en dos linajes: linfoide y mieloide. El linaje linfoide está conformado por las células B, células T, células asesinas naturales (NK, del inglés, *Natural killer*) y algunas categorías de células dendríticas (DC del inglés, *Dendritic Cells*); mientras que el linaje mieloide incluye a los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, y basófilos), monocitos, macrófagos, eritrocitos, megacariocitos, células cebadas y otras categorías de DCs (Pelayo & Vadillo, 2011).

3.1 La Mielopoyesis

La mielopoyesis da inicio con la diferenciación de los progenitores multipotentes (MPP del inglés *multipotent progenitor*) a los progenitores mieloides comunes (CMP del inglés *comon myeloid progenitor*), los cuales poseen más del 98% de la actividad formadora de colonias mielo-eritroides de la MO. Los CMP constituyen la fuente principal de progenitores comprometidos a la producción de granulocitos y macrófagos (GMP del inglés, *granulocyte-macrophage progenitor*) y los progenitores eritroides megacariocíticos (MEP del inglés, *megakaryocyte-erythroid progenitor*) (Figura 2). Cronológicamente la primera bifurcación que ocurre en la ruta de diferenciación mieloide es la de la producción de eritrocitos y megacariocitos (Akashi et al, 2000; Adolfsson et al, 2005). La maduración posterior a cada uno de los linajes hematopoyéticos está definida por la pérdida gradual del potencial de diferenciación múltiple y de la autorrenovación, pero por otro lado va adquiriendo una identidad y función específica. Estos procesos son controlados por programas genéticos en donde los genes que

mantienen la capacidad de autorenovación se apagan, al tiempo que los genes que regulan la diferenciación se encienden. De esta manera, los progenitores hematopoyéticos se diferencian a células precursoras, a través de una serie de eventos en donde grupos alternados de genes en asociación con diversos factores de crecimiento determinan el destino celular en donde cada célula madura tiene una identidad y función definitiva (Mayani et al, 2007).

3.1.1 Diferenciación eritroide-megacariocítica

Los progenitores eritroides más primitivos son denominados unidades formadoras de brotes eritroides (BFU-E del inglés, *burst forming unit-erythroid*), que mantienen una alta tasa de proliferación en respuesta a citocinas, mientras que los progenitores eritroides más maduros, denominados unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E del inglés, *colony forming unit-erythroid*), tienen un limitado potencial de proliferación. Estos progenitores dan lugar a precursores eritroides, dentro de los que se incluyen proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromatófilos, eritroblastos orocromáticos y reticulocitos; estos últimos, a su vez, dan origen a los eritrocitos (Mayani et al, 2007) (Figura 4).

A lo largo de esta ruta de diferenciación, la eritropoyetina (EPO) actúa como una de las principales citocinas reguladoras de la eritropoyesis. Esta molécula es producida por las células intersticiales renales y en menor proporción por células hepáticas. La principal actividad de la EPO es controlar la producción de células eritroides a través de la promoción de la sobrevivencia, proliferación y diferenciación de progenitores eritroides en la MO (Miyajima et al, 1999). Es importante destacar que además de la EPO, citocinas como IL-3, TPO, FLT-3L y SCF participan también en la eritropoyesis; estas citocinas son capaces de sinergizar con EPO y regular la proliferación, diferenciación y sobrevivencia de células progenitoras y precursores eritroides (Schareder et al, 2001).

Con respecto a los progenitores megacariocitos, los progenitores más tempranos son definidos como células formadoras de brotes megacariocíticos (meg-BFC del inglés, *megakaryocyte burst forming cells*). Estos meg-BFC dan lugar a células formadoras de colonias de megacariocitos (meg-CFC del inglés, *megakaryocyte colony forming cells*) que representan a los progenitores tardíos, capaces de formar pequeñas colonias después de 12 días de cultivo. Estos meg-CFC a lo largo de 5 a 7 días, tienen diversas endomitosis (replicación del ADN sin división nuclear), que conducen a la formación de precursores poliploides denominados megacariocitos inmaduros, quienes una vez que desarrollan un citoplasma maduro dan lugar a megacariocitos maduros, que eventualmente darán lugar a las plaquetas (Figura 4). A lo largo de todo el proceso de diferenciación megacariocítica, el elemento regulador clave es la TPO, ya que promueve el crecimiento de los meg-CFC, incrementando sustancialmente la tasa de endocitosis

y estimulando la diferenciación a megacariocitos maduros. Algunas otras citocinas involucradas con este proceso son IL-3, IL-6 e IL-11.

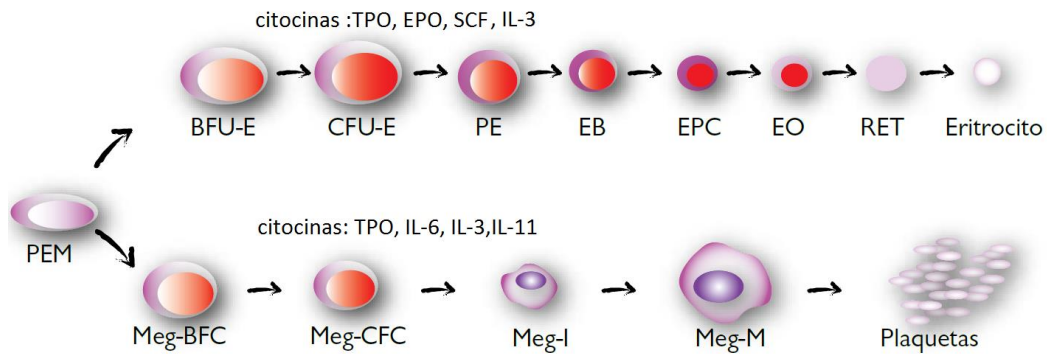


Figura 4. El progenitor eritroide-megacariocítico (PEM), da lugar a Unidades Formadoras de Brote Eritroides (BFU-E), quienes a su vez originan Unidades Formadoras de Colonias Eritroides (CFU-E), para posteriormente dar lugar a proeritroblastos (PE), eritroblastos basofílicos (EB), eritroblastos policromatófilos (EPC), eritroblastos ortocromáticos (EO), reticulocitos (RET) y eritrocitos maduros, en la parte superior se encuentran las citocinas que participan en la diferenciación eritroide. El progenitor eritroide-megacariocítico también puede dar lugar a Células Formadoras de Brotes Megacariocíticos (Meg-BFC), que a su vez, generan Células Formadoras de Colonias Megacariocíticas (Meg-CFC), que posteriormente generarán megacariocitos inmaduros (Meg-I) y maduros (Meg-M), que finalmente liberarán a las plaquetas. Imagen tomada y modificada de Mayani et al, 2007.

3.1.2 Diferenciación granulo-monocítica.

Los progenitores mieloides incluyen unidades formadoras de colonias granulo-monocíticas (CFU-GM del inglés, *colony forming unit-granulocytes and macrophages*), que a su vez dan origen a unidades formadoras de colonias granulocíticas (CFU-G del inglés *granulocytes colony forming units*) y unidades formadoras de colonias de monocitos-macrófagos (CFU-M del inglés *monocyte colony forming units*). Una vez encaminadas en la vía de diferenciación, las CFU-G dan lugar a mieloblastos, promielocitos, mielocitos, metamielocitos y células maduras (eosinófilos, neutrófilos y basófilos) (Figura 5). Mientras que las CFU-M dan lugar a monoblastos, promonocitos, monocitos, y finalmente macrófagos (Figura 5). Estudios recientes han sugerido la existencia de un progenitor intermedio que deriva directamente del progenitor gránulo-monocítico (GMP) y es común para macrófagos y células dendríticas (MDP) (Doulatov et al, 2010; Iwasaki & Akashi, 2007). En humanos el MDP también puede provenir de la población de progenitores multilineales (MLP) (Figura 2). Presumiblemente este MDP constituye un progenitor temprano de las CFU-M (Pelayo & Vadillo, 2011).

Las células de linaje mielóide son reguladas por un amplio número de citocinas entre las que se encuentran: GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-3, IL-6 y SCF. Los factores estimuladores de colonias inducen la sobrevivencia y proliferación de los progenitores, mientras que citocinas como SCF promueven el

crecimiento de las HSC y los progenitores y tienden a tener un mayor efecto cuando actúan en combinación con factores de crecimiento (Mayani et al, 2007). Existen también factores que inhiben la mielopoyesis, como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α por sus siglas en inglés, *Tumor Necrosis Factor*), el factor de crecimiento transformante β (TGF β por sus siglas en inglés, *Transforming Growth Factor*) y los interferones (INFs) entre otros (Broxmeyer, 1992).

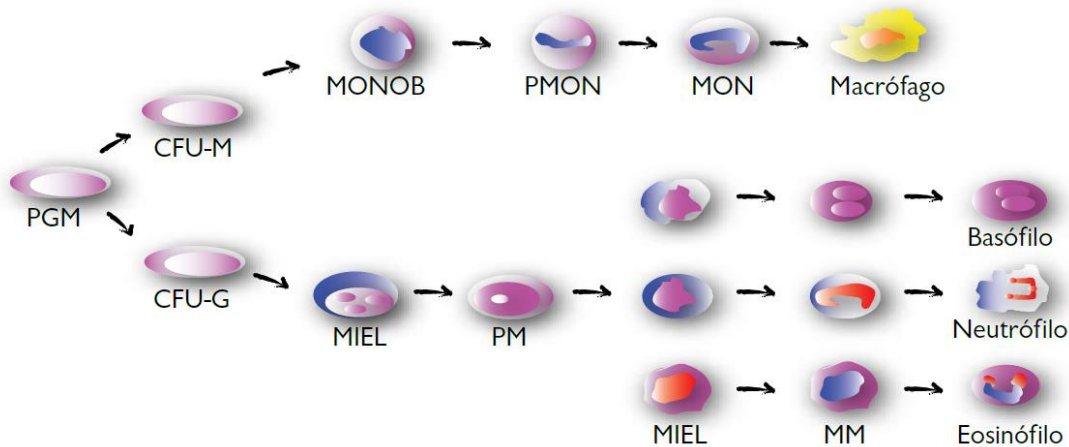


Figura 5. Los progenitores gránulo-monocíticos o Unidades Formadoras de Colonias Gránulo-Monocíticas (CFU-GM), dan lugar a Unidades Formadoras de Colonias Granulocíticas (CFU-G) y Unidades Formadoras de Colonias Monocíticas (CFU-M). Una vez encaminadas en la vía de diferenciación, las CFU-G dan lugar a mieloblastos (MIEL), promielocitos (PM), mielocitos (MIEL), metamielocitos (MM) y células maduras (basófilos, neutrófilos y eosinófilos). Mientras que las CFU-M dan lugar a monoblastos (MONOB), promonocitos (PMON), monocitos (MON) y finalmente macrófagos. Imagen tomada de Mayani et al, 2007.

3.2 La linfopoyesis

El linaje linfoide está conformado por linfocitos B y T, células NK y algunas subpoblaciones de DCs, todas ellas con una función especializada. Con excepción de las células T, todas las células linfoides son originadas en la MO a partir de las HSCs. El conocimiento acerca de la linfopoyesis proviene en gran medida de estudios hechos en ratón.

3.2.1 Progenitores linfoides tempranos

En ratones las HSCs dan origen a una población heterogénea de progenitores multipotentes que exhibe cierto potencial de diferenciación linfoide (LMPP por sus siglas en inglés *lymphoid primed multipotent progenitor*) y contiene progenitores L-selectina⁺ (LSP *L-selectin progenitor*), principales productores de células T y células dendríticas asesinas productoras de interferón (IKDC, del inglés *interferón killer dendritic cells*) (Welner et al, 2007). Simultáneamente, los progenitores linfoides

tempranos (ELP del inglés, *Early lymphoid progenitor*) son producidos e identificados por su capacidad de transcripción del gen de la recombinasa RAG1, hecho que marca formalmente el inicio del programa de diferenciación linfoide (Igrashi et al, 2002).

A pesar de que no ha sido identificada la contraparte del ELP en humanos, investigaciones recientes indican la existencia de LSP, originados por las HSCs y con potencial de diferenciación a todo el linaje linfoide y a monocitos (Kohn et al, 2012). Dada su capacidad multipotente y la nula expresión de los marcadores CD10 Y CD38, esta población parece ser más primitiva que el progenitor multilinfoide (MLP del inglés, *Multi-lymphoid progenitor*) de fenotipo CD45RA⁺, CD7⁺, CD10⁺⁴. Tanto el ELP cómo el MLP dan origen al progenitor linfoide común (CLP del inglés, *common lymphoid progenitor*), reportado como el principal productor de células B en ratón, pero con potencial para generar linfocitos T y NK (Kondo M. et al 1997) y casi nula capacidad mieloide. En humanos el CLP fue identificado por Galy et al. como una fracción celular Lin⁻, CD34⁺, CD45RA⁺, CD10⁺ que produce células B, DCs y T de manera limitada cuando estas son inyectadas en timo fetal murino (Galy et al, 1995; Blom & Spites , 2006). Recientemente Doulatov y Dick demostraron que dicho compartimiento es heterogéneo y contiene una población conspicua de células que expresan CD38 y FLT3, son negativas para CD90 y CD7, y muestran potencial de precursor de células B y NK (Doulatov et al, 2010). La deficiente producción de DC a partir de estos progenitores sugiere fuertemente que este linaje deriva de células más primitivas (Figura 2).

3.2.2 Diferenciación de células B

La transición de CLP hacia precursores de células B depende de factores de transcripción como E2A, EBF y Pax5 (Busslinger, 2004), donde este último, además de ser un factor de transcripción maestro, también es un represor transcripcional muy potente de otros genes no B y de genes mieloides. Un parteaguas en la construcción del mapa de diferenciación linfoide se estableció con los trabajos de Hardy en 1991, en los que se identificaron a las primeras subpoblaciones con participación en linaje B en la MO y propuso un esquema secuencial de diferenciación río debajo de los CLP. El compartimiento celular más primitivo se denominó fracción A. La clasificación con base en el tipo de rearrreglos de los genes de las inmunoglobulinas permite reconocer a las células Pre-pro B dentro de ésta fracción primitiva, contenidas en una población con baja expresión de los genes codificantes de las recombinasas Rag1 y Rag2 y, por lo tanto, sin rearrreglos de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas (IgH e IgL). En este estadio es indispensable el reconocimiento de señales microambientales y, en particular, de aquellas provenientes de la interacción con células reticulares CXCL12^{hi}. Río abajo de la diferenciación se encuentran las células pro B (fracción B de Hardy), que expresan Ig α/β . En este estadio inicia la recombinación de los segmentos DJ y la inactivación de Ikaros que conduce al arresto de su diferenciación y al bloqueo en la señalización del pre-BCR (Schwickert et al, 2008).

El comienzo de la expresión de las recombinasas regulada por los factores de transcripción E2A, EBF y de CD19 regulado por Pax5, determinan el compromiso hacia linaje B (Busslinger, 2004). La recombinación de las cadenas pesadas parece dependiente del contacto con células estromales que expresan IL-7 (Purizaca et al, 2012) y se observa por primera vez la expresión de pro-BCR .

Las células pre-B (contenidas en la fracción C de Hardy) ensamblan la cadena pesada transmembranal (μ HC), las cadenas λ 5 y VpreB e Ig α / β para formar el pre-BCR. Una vez expresado este complejo se inicia la expansión clonal independiente de IL-7. La recombinación de los genes de las cadenas ligeras marca el progreso de las células Pre-B hacia la diferenciación de células B inmaduras, que expresan BCR e IgM pero no IgD que son transportadas a órganos linfoides periféricos donde concluyen su proceso de maduración (Kurosaki et al, 2010) (Figura 6).

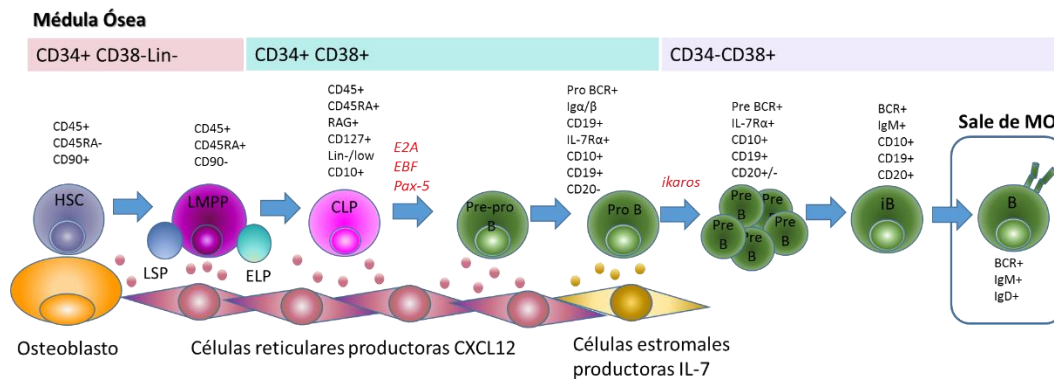


Figura 6. Desarrollo temprano de células B y su regulación extrínseca e intrínseca. En la médula ósea, la transición de los estados de diferenciación linfoides B depende de los programas genéticos en concordancia con señales proporcionadas por el microambiente hematopoyético. Las células estromales altamente productoras de CXCL12 conforman los nichos linfoides tempranos, en tanto que su contraparte, productora de IL-7, sostiene las etapas precursoras proB. Las células preB adquieren independencia de IL-7 concomitante a la formación del pre-BCR, así como para su expansión. La producción de células B inmaduras va acompañada de su migración a la periferia. En letras rojas se muestran algunos de los factores de transcripción que participan más activamente en la vía de diferenciación de linfocitos B y en letras negras moléculas expresadas en la membrana celular que marcan distintos estadios de diferenciación. Tomada y modificada de Ichii, 2014.

3.2.3 Diferenciación de células T

Después del nacimiento la MO exporta células primitivas al timo para colonizarlo e iniciar la diferenciación hacia células T. Aunque todos los estadios desde HSCs hasta CLP son capaces de producir células T inmaduras *in vitro*, solamente las células que expresan los receptores de quimiocinas CCR7, CCR9, CXCR4, y PSLG1 son capaces de colonizar al timo *in vivo*. Los progenitores tímicos tempranos (ETP, del inglés *Early thymic progenitor*) del ratón ingresan al timo y se caracterizan por su fenotipo Lin^{lo} c-kit^{hi}

CD25⁻ IL-7R α ^{-/lo} CD44^{hi} Sca-1⁺ Flt3⁺ y pueden producir células B, T, NK, mieloides y DCs. Su contraparte humana parece ser Lin⁻ CD34⁺ CD38⁺ CD45RA⁺ CD7⁺ y posee el potencial para producir células T, NK y DCs (Blom y Spits, 2006). El potencial múltiple de esta población se pierde de manera gradual por efecto de los ligandos Notch y GATA3, a medida que las células se comprometen hacia linaje T (Bell & Bhandoola, 2008). Los timocitos más primitivos son conocidos como dobles negativos 1 (DN1) por su nula expresión de CD4 y CD8, seguida de la diferenciación hacia timocitos doble negativo 2 (DN2) los cuales son CD4⁻ CD8⁻ CD25⁺ CD44⁺ y han perdido el potencial de producir células B y migran a través de la corteza tímica. En este estadio pueden ya detectarse rearrreglos del receptor de células T (TCR, del inglés *T cell receptor*) y la transición hacia DN3 parece ser crucial para la bifurcación de las rutas de diferenciación de linfocitos T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$. Las células DN3 son CD44⁻ y son seleccionadas por la señalización que genera el reconocimiento de antígenos por el Pre TCR, fenómeno que sucede en la región subcapsular, concomitante a la pérdida de CD25. Tras una fina selección, se origina la población más abundante del timo, la doble positiva (DP) CD4⁺ CD8⁺ (Bhandoola & Sambandam, 2006). La diferenciación final a células TCD4⁺ y células TCD8⁺ se da en dependencia de los factores de transcripción ThPOK y GATA3, y Runx3, respectivamente (Shah & Zuniga-Pflucker, 2014; Gerondakis, 2014).

3.2.4 Diferenciación de células NK

Las células NK se producen principalmente en la MO. Modelos recientes propuestos para el desarrollo de linajes de ILC donde los progenitores de células NK (NKP del inglés *NK progenitor*) representan una rama separada río abajo del CLP, el cual genera únicamente células NK (Diefenbach et al, 2014). Renoux et al, 2015 además de reportar un precursor parecido al CLP humano, con un potencial restringido a linaje linfóide y un fuerte priming génico linfóide con fenotipo Lin⁻CD34⁺CD38⁺CD123⁻CD45RA⁺CD7⁺CD10⁺CD127⁺, también reporta el hallazgo de un progenitor NK, el cual es capaz de generar únicamente células NK tanto *in vitro* como *in vivo*. Inclusive este progenitor es incapaz de generar ILCs CD16⁻ IL-7R⁺, y no solo se encuentra en MO también ha sido identificado en amígdalas, sangre de cordón umbilical, en hígado fetal y MO fetal y presenta el fenotipo Lin⁻CD34⁺CD38⁺CD123⁻CD45RA⁺CD7⁺CD10⁺CD127⁻ (Renoux et al, 2015).

La IL-15 es una citocina clave importante para la diferenciación de NKs en ratón y en humano tanto *in vitro* como *in vivo* y células CD34⁺ responden a esta citocina *in vitro* (Cooper et al, 2002; Freud & Caligiuri, 2006; Ranson et al, 2003). Las NKs se producen en dos etapas consecutivas; la primera es independiente de IL-15 que implica estadios de diferenciación primitivos desde HSC hasta CLP y la expresión de la subunidad β del receptor de IL-15 (CD122) es indetectable en progenitores linfoides humanos cuando se evalúa por citometría de flujo (Freud & Caligiuri, 2006). En esta etapa es importante la expresión de C-kit y de FLT3 para que en la segunda etapa sea expresada la cadena β del receptor de

IL-15 (CD122) y en respuesta a dicha citocina los precursores se diferencian hacia estadios maduros, incluso se ha visto que los NKP mediante experimentos *ex vivo* son CD122⁻, sin embargo, fue detectable después de 4 días en cultivo en presencia de citocinas, lo que indica la importancia de la IL-15 para la maduración de NKs a partir de NKPs.

El modelo propuesto para la diferenciación de NKs (Doulatov et al, 2010), inicia con las HSCs las cuales se diferencian en progenitores multilíneos que dan origen a precursores bipotenciales para células NK-B en la MO. Sin embargo, estudios recientes sugieren que las células NK se originan de un progenitor distinto y restringido a linaje NK (NKP del inglés *NK progenitor*) (Wu C. et al, 2014). Éste progenitor se diferencia a precursores NK, que en humanos presenta un fenotipo Lin⁻CD34^{+/-}CD56⁺CD16⁻CD122⁺CD45RA⁺ y cuya proliferación y diferenciación origina a células NK inmaduras CD56^{hi}CD16⁻CD122⁺ productoras de INF γ (Renoux et al, 2015). Es en este estadio donde comienza la adquisición de receptores de activación e inhibición, los que además pueden ser modulados por el microambiente hematopoyético (Vadillo & Pelayo, 2017). La etapa terminal culmina en células NK citotóxicas CD56^{lo}CD16⁺CD122⁺ que exhiben un repertorio de receptores que le permitirán ejercer su función en estados de emergencia (Freud and Caligiuri, 2006) y células NK reguladoras CD56^{hi}CD16^{lo} que son principalmente productoras de citocinas (Figura 7).

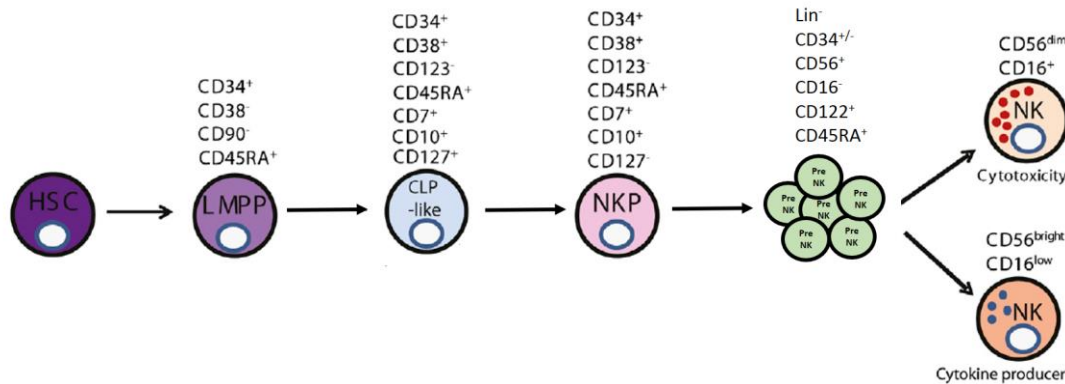


Figura 7. El desarrollo de células NK a partir de las HSC hasta un estadio de maduración como las células NK citotóxicas y reguladoras. En letras negras se muestra el fenotipo de cada una de las células durante el desarrollo. Imagen tomada y modificada de Renoux et al, 2015.

3.2.5 Diferenciación de Células Dendríticas

Las DCs pueden derivar de los linajes linfoides y mieloides, aunque las de linaje mieloides se encuentran en mayor frecuencia. Debido a la frecuencia y actividad proliferativa de los progenitores mieloides, la mayoría de las DC parecen provenir de esta vía en individuos sanos (Pelayo R. & Vadillo E. 2017). Estudios recientes de seguimiento poblacional, a través de código de barras molecular, han confirmado que la

fracción LMPP es altamente heterogénea y en ella pueden distinguirse tres grandes grupos de compromiso, destacando el linaje dendrítico, lo que han sugerido considerar a las DCs como un linaje independiente (Naik S, H. et al, 2013). La reciente identificación de una célula precursora dendrítica común (CDP del inglés como DC progenitor) derivada del progenitor mielóide CMP, que expresa Flt3, c-kit y receptores para el factor M-CSF (Onai et al, 2007; Naik S, H. et al, 2007), le ha dado a la producción de DC convencionales (cDC) una connotación mielóide. Por otro lado el precursor M-CSFR predominantemente produce células dendríticas plasmacitoides (pDCs) aunque su origen aún está en investigación (Shortman et al, 2013), y se encuentra río abajo de los LMPP (Onai, N. et al 2013), lo que refuerza la noción de que el ELP es el principal productor de pDC, mientras que el CLP produce además las DC. Interesantemente, la deficiencia de IL-7, así como de su receptor, inducen al déficit en la producción de pDC, sugiriendo que tienen un origen linfóide. En tanto que Flt3 y STAT3 son esenciales para la producción de DCs, otros factores de transcripción como IRF8, SpiB y E2-2 son indispensables para el desarrollo y mantenimiento de las pDC (Shortman et al, 2013). Finalmente, las IKDC son producidas principalmente por los LSP y son aparentemente, un híbrido de DC-NK que muestra menor expresión de SpiB e IRF8 que las pDC, pero altos niveles de Id-2, GATA-3 y TLR4 (Welner et al, 2007). En humanos, el MLP ha sido propuesto como el principal productor de DCs cuando se compara con el potencial de progenitores mieloides *in vitro* (Doulatov et al, 2010).

3.2.6 Linfopoyesis estudios *in vivo* e *in vitro*

Mucho de nuestro conocimiento sobre linfopoyesis humana viene de estudios realizados en ratón y una de las principales razones es la imposibilidad de poder evaluarla *in vivo*, aunque ciertas anomalías genéticas humanas como los son los pacientes como síndromes de inmunodeficiencia severa (SCID por sus siglas en inglés) han sido de gran contribución al entendimiento de algunos mecanismos de desarrollo de la linfopoyesis humana (Bloom & Spits, 2006). Los modelos de ratones humanizados fueron establecidos en 1990, con el descubrimiento de ratones inmunodeficientes (SCID), y a partir de ahí una variedad de modelos de xenoinjerto incluyendo ratones SCID no obesos diabéticos (NOD-scid) y NOG ó NSG (ratones con una delección en la cadena gamma del receptor de IL-2), han sido generados para mejorar el injerto de HSCs humanas y la reconstitución de células hematopoyéticas a largo plazo, a su vez éstos presentan mutaciones que resultan en anomalías en uno o varios linajes linfoides, lo cual es una herramienta útil para elucidar no solo las vías de desarrollo, si no también los mecanismos involucrados en la diferenciación linfóide, como el rol que presentan algunas citocinas en ciertas poblaciones linfoides.

Patrones de marcadores de superficie han hecho posible resolver, purificar y estudiar ampliamente muchos subgrupos de progenitores linfoides, ésta información junto con los esquemas de

diferenciación derivados de ellos ha provisto un importante punto de apoyo para interpretar los experimentos en ratones transgénicos y *knockout*. Además, mucho del conocimiento acerca de factores de transcripción, citocinas, hormonas, ligando Notch y otras moléculas han servido de apoyo para elucidar la altamente regulada producción de células linfoides (Pelayo et al, 2005).

Uno de los acontecimientos a nivel molecular que marcan a las células que apenas inician el programa de diferenciación hacia la estirpe linfóide es la regulación negativa de la molécula de adhesión VCAM-1 (Lai et al, 2005) y la transcripción del locus de la enzima RAG1 que recombina los segmentos genéticos VDJ de la inmunoglobulina y del TCR (Igarashi et al, 2002). Por ello, los ratones *knockin* RAG1/GFP son una herramienta particularmente útil en la investigación del proceso de linfopoyesis temprana (Igarashi et al, 2002; Welner et al, 2007; Yokota et al, 2003; Perry et al, 2006; Welner et al, 2007) y permitieron el aislamiento y caracterización de los progenitores linfoides más tempranos en el hígado fetal y en MO de los que se tiene conocimiento: los progenitores linfoides tempranos (Balandrán & Pelayo, 2016).

A excepción de los precursores B de ratón, la diferenciación de progenitores linfoides humanos no puede ser detectada en ensayos semisólidos, cómo se ha utilizado para evaluar mielopoyesis y la única manera de evaluar el potencial de un progenitor linfóide humano, es mediante ensayos *in vitro* en co-cultivos con líneas celulares estromales y con capacidad para soportar la diferenciación linfóide a partir de progenitores primitivos humanos (De Wynter & Ploemacher 2001; Pelayo R. et al 2017). Cómo ya mencionamos anteriormente el grupo de Galy, fue quien identificó al CLP en humanos por primera vez, el cual es un hallazgo muy importante para la linfopoyesis ya que marca una vía de diferenciación que diverge de la mieloide y la eritroide (Galy et al, 1995). En ese estudio se aislaron mediante citometría de flujo, células de MO con el fenotipo $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD45RA}^+ \text{C10}^+$ y se co-cultivaron sobre células estromales con medio suplementado con citocinas. Después de varias semanas la población inicial tuvo el potencial para generar células de linaje linfóide B, NK, DC y careció de potencialidad para generar células de origen mieloide, eritroide y megacariocítico (Galy et al, 1995). Por otro lado, con relación a su capacidad para generar linfocitos T, estas células $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD45RA}^+ \text{C10}^+$ fueron inyectadas en timos fetales de ratones SCID y se observó después de varias semanas que esta población había generado una producción limitada de células que expresaban el receptor T $\alpha\beta$ o el $\gamma\delta$, CD4 o CD8.

Otro hallazgo importante dentro de la linfopoyesis temprana en humanos fue la evidencia de la existencia de progenitores multilineales en sangre de cordón umbilical (Hao et al, 2001). En este estudio, se encontró que la subpoblación $\text{CD34}^+ \text{CD38}^- \text{CD7}^+$ posee potencial para generar células B, NK y DCs en cultivos en masa y en cultivos de clonación de células únicas "*single cell clonal culture*". Aunque la producción de células T no fue evaluada en este reporte, estudios posteriores usando FTOC (por sus siglas en inglés *fetal thymic organ cultures*), han revelado el potencial para generar células T a partir de

la población CD34⁺CD38⁻CD7⁺ (Haddad, R. et al. 2004). Análisis inmunofenotípicos del CLP humano han evidenciado que existen similitudes entre el CLP CD10⁺ y el CLP CD7⁺ de sangre de cordón umbilical, dado que ambas poblaciones expresan el antígeno CD34, HLA-DR y CD45 RA y además tienen baja o nula expresión de c-kit y Thy1 (Galy et al, 1995; Hao et al, 2001).

Muchos estudios aún son necesarios para identificar, aislar y evaluar a los distintos progenitores linfoides, así como su regulación. En los últimos años las MSCs de MO se han posicionado como una alternativa a las líneas celulares estromales previamente utilizados para el estudio de la linfopoyesis en los modelos *in vitro*. En éstos nuevos modelos se ha evaluado la participación de las MSCs de MO en la regulación y diferenciación linfóide sobre todo de linaje B (Ichii M. et al, 2008).

4. Células Troncales/Estromales Mesenquimales (MSCs)

4.1 Biología de las MSCs

Las Células Troncales/Estromales Mesenquimales (MSCs) son células primitivas, indiferenciadas que exhiben capacidad de diferenciación multilínea, es decir, bajo condiciones específicas tanto *in vitro* como *in vivo*, pueden dar origen a hueso, cartílago, tejido adiposo, músculo, neuronas y células endoteliales (Pittenger et al, 1999; Sánchez-Ramos et al, 2000; Oswald et al, 2004). La caracterización de las MSCs, ésta basada en tres aspectos principales, su adherencia al plástico, capacidad de diferenciación multilínea y por presentar un fenotipo positivo a los marcadores CD73, CD90 y CD105 y la falta de expresión de marcadores hematopoyéticos tales como CD34, CD38, CD45 and HLA-DR, y antígenos específicos para los diferentes linajes de células sanguíneas como CD11b, CD79a y CD19 (Pittenger et al, 1999; Dominici et al, 2006; Haynesworth et al, 1992; Gronthos et al, 2003).

4.2 Capacidad de soporte hematopoyético de las MSCs

El nicho hematopoyético es un sitio especializado en donde residen las HSCs, en el cual se regula su quiescencia, autorrenovación y diferenciación. Existen al menos tres tipos de nichos: el osteoblástico o endosteal, el vascular y el reticular.

Las MSCs son componentes importantes del estroma hematopoyético de la MO, ya que además de originar a las células estromales, las MSCs producen moléculas de la MEC y citocinas importantes para la hematopoyesis, así como ligandos para moléculas de superficie presentes en las células hematopoyéticas (Tabla 1; Le Blanc, 2009). En modelos murinos se ha observado que distintas subpoblaciones de MSCs se encuentran en los diferentes nichos de las HSCs, indicando la importancia de estas células en la hematopoyesis (Nagasawa et al, 2011).

CITOCINAS	MOLÉCULAS DE LA MEC	RECEPTORES
IL-2	Colagena I,III,IV,VI	rIL-1
IL-4	Laminina	rIL-3
IL-10	Trombospondina	rIL-4
IL-12p170	Tenacina	rIL-6
IL-13	Fibronectina	rIL-7
LIF	Vimentina	r-PDGF
IL-3	Osteopontina	r-NGF
IL-11		r-TNFIgII
GM-CSF		r-IFNg
M-CSF	MOLECULAS DE ADHESION	r-EGF
IL-6	ICAM-1	r-FGF
SCF	ICAM-2	r-IGF
Flt-3L	VCAM-1	r-TGFb-I,II
Tpo	ALCAM	
VEGF-A,-C	L-selectina	
MCP-1	LFA-3	QUIMIOCINAS
PIGF	Endoglina	CCL2, 3, 4, 5, 7, 20, 26
FGF-1	CD44	CX3CL1
Angpt-1,-2		CXCL5
SDF-1		CXCL11
BMP-2	INTEGRINAS	CXCL1
IFN-g	$\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 6$	CXCL8
TNF	A α	CXCL12
MIP-1 ^a	Av	CXCL2
OPG	$\beta 1, \beta 3, \beta 4, \beta 5$	CXCL10
IGFBP-2		

Tabla 1.- Moléculas secretadas por las MSCs que participan en la hematopoyesis. Tabla tomada de Fajardo-Orduña,2015.

El nicho endosteal que está conformado por los osteoblastos, que se pueden diferenciar a partir de las MSCs cómo ya lo vimos anteriormente y las MSCs presentes en este nicho producen osteopontina CXCL12 y N-cadherina involucradas en el mantenimiento de las HSCs, así como moléculas que mantienen su quiescencia como Ang-1 y TPO (Nakamura et al, 2010; Wilson et al, 2009). La secreción de CXCL12 a partir de MSCs humanas es un evento dependiente del contacto entre las MSCs y las HSCs, además ésta molécula participa en el “homing” y mantenimiento de las HSCs en MO (Schajnovitz et al, 2011) (Figura 8).

El nicho vascular reside alrededor de los sinusoides y a través de su endotelio las células hematopoyéticas pueden entrar y salir de la circulación. Este nicho es aparentemente inductor. El ambiente perivascular está conformado por dos diferentes subpoblaciones de células MSCs, unas son las células reticulares altamente productoras de CXCL12 o también conocidas como células CAR, las cuales expresan VCAM-1, CD44 y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α y PDGFR β) (Nagasawa et al, 2011). Las células CAR también son las principales productoras de SCF, molécula requerida para mantener el número de progenitores eritroides, células B e incluso HSCs en un estado indiferenciado (Nagasawa et al, 2011). Las otras MSCs expresan Nestina+, la cual es una proteína de la familia de filamentos intermedios que originalmente fue identificada como un marcador de células progenitoras neurales, esta proteína está asociada con el mantenimiento de HSCs (Ehninger et al, 2011;

Mendez-Ferrer et al, 2010). Se ha visto que la depleción de células que expresan Nestina disminuye el número de HSCs en ratones, lo cual indica la posibilidad de que las células Nestina⁺ estén involucradas en la retención de HSCs en la MO (Nagasawa et al, 2011). Tanto las MSCs Nestina⁺ así como las CAR son consideradas subpoblaciones de MSCs, ya que tienen potencial de diferenciación osteogénica y adipogénica (Nagasawa et al, 2011) (Figura 8).

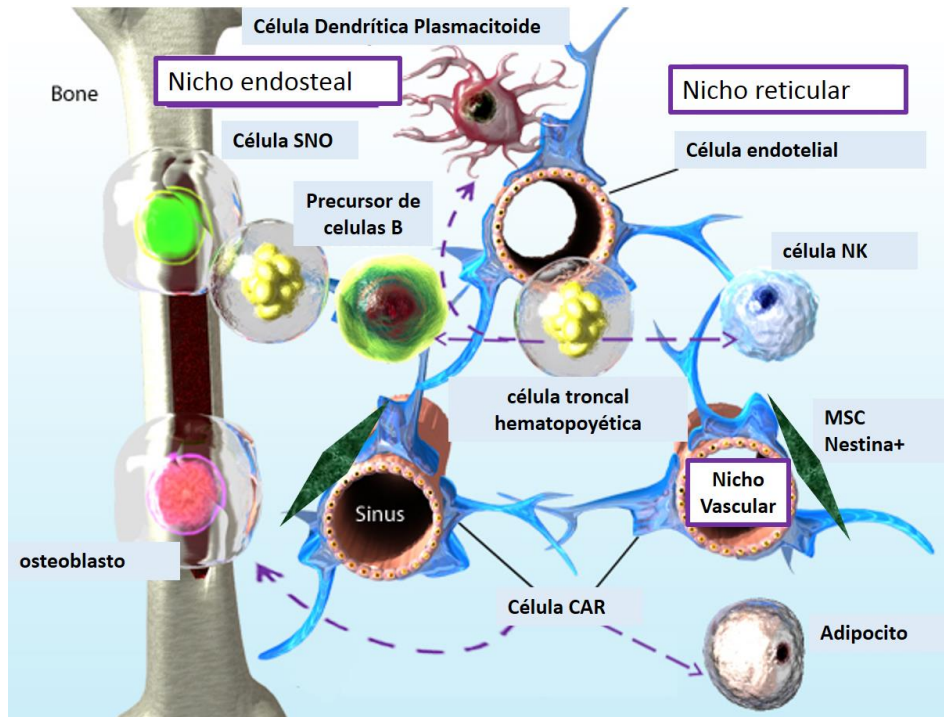


Figura 8. Las MSCs y su distribución en el nicho hematopoyético. Imagen modificada de Sugiyama & Nagasawa 2012.

Las MSCs también producen moléculas como SCF y FLT3-L que favorecen el mantenimiento y expansión de las HSCs, así como citocinas involucradas en el proceso de compromiso y maduración de las células hematopoyéticas como IL-6, IL-3 y M-CSF (Flores-Figueroa et al, 2006).

Además las MSCs pueden interactuar con células hematopoyéticas primitivas mediante el contacto célula-célula a través de moléculas de adhesión como VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2, ALCAM, L-selectina, antígeno asociado a la función leucocitaria (LFA-3 del inglés *Lymphocyte Function Associated Antigen 3*), CD44 e integrinas- β 1, especialmente VLA₄ y VLA₅, juegan un papel importante en la interacción temprana de las HSCs con su nicho en la MO (Texidó et al, 1992; Voura et al, 1997; Papayannopoulou et al, 2001). También están involucradas en la proliferación, sobrevivencia, crecimiento clonogénico y mantenimiento de las HPCs durante su cultivo *ex vivo* (Hurley et al, 1995; Yokota et al, 1998; Schofield et al, 1998) y son necesarias para el homing e injerto de las HSCs y HPCs en modelos murinos (Brakebush et al, 2002; Bungartz et al, 2006).

Dentro de las proteínas de la MEC que producen las MSCs se encuentran la colágena tipo I, III, IV y VI, fibronectina, osteopontina, y varios proteoglicanos, todas moléculas importantes en el mantenimiento de la quiescencia de las HSCs (Gottschling et al, 2007).

4.2.1 Participación de las MSCs en la expansión y proliferación de HSCs (estudios *in vitro*)

La proliferación se refiere al incremento en el número de células totales, mientras que la expansión implica un aumento de la población celular con características similares a las células que las originaron, lo cual es de vital importancia en el contexto de cultivos *ex vivo* de HSCs ya que la proliferación podría llevar a un agotamiento de la población inicial primitiva lo que se considera una pérdida de HSCs/HPCs, cuando lo que se busca en un trasplante de células hematopoyéticas es incrementar dichas poblaciones (Flores-Guzman 2006). Una expansión *in vitro* previo al trasplante de células hematopoyéticas ha sido una estrategia para reducir el tiempo de recuperación hematopoyética después de un trasplante (da Silva et al, 2005; Köhler et al, 1999). Debido al importante papel de las MSCs en el microambiente hematopoyético, diversos estudios han evaluado la capacidad de las MSCs de MO para expandir HSCs (Robinson et al, 2006; Walenda et al, 2010; Zhang et al, 2006, Fajardo-Orduña et al, 2016). En dichos estudios demuestran que el uso de MSCs como capa alimentadora aumenta el número de células nucleadas totales, el número de células formadoras de colonias (CFC) y el número de células CD34+ en contraste al control sin MSCs (Flores-Guzman et al, 2009).

Aunque estas son las principales características de las MSC-MO, se han realizado algunos estudios en donde comparan estas características y propiedades de las MSCs provenientes de diferentes fuentes alternativas a la MO (Fajardo-Orduña et al, 2015, Fajardo-Orduña et al, 2017)

4.2.2 Soporte hematopoyético, estudios en modelos animales

Basado en diferentes estudios en modelos animales (principalmente modelos murinos), la capacidad de las MSCs de mejorar y soportar la hematopoyesis ha sido demostrado. Delalat et al. mostró que trasplantando células CD34+ de sangre de cordón umbilical (SCU) y MSCs de MO en ratones irradiados incrementó significativamente el número de progenitores hematopoyéticos comprometidos a linaje denominados células formadoras de colonias (CFCs) en el bazo de los ratones receptores (Delalat et al, 2009). En otro estudio empleando células CD34+ de sangre periférica y MSCs de MO trasplantadas en ratones subletalmente irradiados NOD/SCID revelaron un incremento en el número de células hematopoyéticas injertadas, caracterizadas por un amplio número de células mieloides en sangre periférica, así como progenitores megacariocíticos y mieloides en MO de ratones (Angelopoulou et al, 2003). Utilizando diferentes proporciones de células CD34+ de MO, HSC:MSC trasplantadas en ratones NOD/SCID se determinó que la tasa de injerto se incrementaba con el número de MSCs, mostrando una

proporción óptima de 1:8 mientras que números más altos de MSCs reducían la eficiencia del injerto (Kim et al, 2006). Asimismo, se ha encontrado que el trasplante con MSCs promueve el injerto de dos unidades de SCU en ratones NOD/SCID, disminuyendo la predominancia de una de las dos unidades e incrementando el injerto total de todas las células hematopoyéticas comparadas con los trasplantes sin MSCs (Kim et al, 2004).

En otro estudio en donde se co-trasplantaron MSCs de MO y células CD34+ de SCU en ratones NOD/SCID vía inyección intramedular, se mostró que de 4-10 semanas después del trasplante las MSCs llegan a injertar dentro del microambiente hematopoyético de los ratones hospederos y que se diferencian a pericitos, células estromales, osteoblastos y células endoteliales, los cuáles son componentes esenciales del microambiente hematopoyético. Además, la presencia de MSCs humanas incrementan la actividad de células hematopoyéticas humanas en MO de ratón (Muguruma et al, 2006). También hay estudios que demuestran la capacidad de soporte hematopoyético de las MSCs en otros modelos animales como ovejas fetales, donde el injerto de células hematopoyéticas es promovido y la presencia de células circulantes del donador son observadas durante la gestación y después del nacimiento (Almeida-Porada et al, 2000). Similarmente, se ha demostrado que co-trasplantes de MSCs y HSCs en macacos *Rhesus* mejora el injerto de células hematopoyéticas (Liu et al, 2005).

4.2.3 Soporte hematopoyético en estudios clínicos

Muchos de los estudios clínicos que hay con MSCs son sobre su uso en el trasplante de células troncales hematopoyéticas (HSCT por sus siglas en inglés *hematopoietic stem cell transplant*). Las HSCs pueden ser derivadas de MO, sangre periférica y SCU. Este puede ser autólogo (trasplante con HSCs del mismo paciente) o alogénico (se utilizan HSCs de un donador). Este tipo de trasplantes es frecuentemente empleado en pacientes con mieloma múltiple o leucemia, en los cuales las células de la MO son destruidas con radiación o quimioterapia antes del trasplante. La infección y enfermedad injerto contra hospedero (GVHD del inglés, *graft versus host disease*) es una de las mayores complicaciones del trasplante alogénico. El éxito de un HSCT depende del número de HSCs/HPCs trasplantadas y de la resistencia del injerto al rechazo del hospedero (Kim et al, 2013). Tomando en cuenta esto y debido a la habilidad de las MSCs para generar células del estroma de la MO, formar parte del nicho hematopoyético y de producir moléculas que regulan la hematopoyesis, así como proveer la capacidad de soporte hematopoyético tanto *ex vivo* como en modelos animales, han sido aplicadas en la clínica para mejorar el HSCT (Tabla 2).

Muchos estudios han reportado que las MSCs favorecen el injerto y la rápida recuperación hematopoyética (número de neutrófilos y plaquetas) en pacientes con HSCT (Tabla 2). El beneficio de su aplicación en facilitar el injerto puede estar relacionado a su capacidad de soporte hematopoyético

particularmente cuando el número de HSCs/HPCs es bajo (Wu KH et al, 2013). Las MSCs también pueden mejorar el HSCT promoviendo la formación de un microambiente anti-inflamatorio, el cual reduce la probabilidad de rechazo al injerto. Interesantemente, en un estudio que fue realizado en 14 pacientes pediátricos con desórdenes hematológicos o deficiencias inmunes, los cuales fueron trasplantados vía intravenosa (IV) con MSCs de MO alógenicas, se compararon con 47 pacientes sujetos a las mismas condiciones de trasplante, pero sin MSCs y se observó que la reconstitución fue más rápida en aquellos pacientes tratados con MSCs (Ball et al, 2007). Resultados similares se han reportado por otros grupos (Le Banc et al, 2007; Meuleman et al, 2009). Sin embargo, también hay reportes en los cuales la rápida reconstitución observada en pacientes MSC-HSCT no es muy diferente a la de aquellos pacientes no trasplantados con MSCs (Macmillan ML et al, 2009; Gonzalo-Daganzo et al, 2009; Bernardo et al, 2011) (Tabla 2). En pacientes con trasplante deficiente (PGF del inglés, *poor graft function*) se encontró que 17 de 20 pacientes posterior al HSCT alogénico respondieron al tratamiento con MSCs, acompañadas con un incremento en el ratio de linfocitos T CD4+ a CD8+ posterior a la administración de MSCs (Liu X. et al, 2014).

Muchas de las diferencias encontradas en los resultados reportados en la aplicación clínica de las MSCs por los diferentes grupos pueden ser debidas a las condiciones de expansión de MSCs a escala clínica e incluso al número de pasajes y dosis utilizadas. Recientemente, muchos grupos han intentado optimizar las condiciones de cultivo para mejorar la expansión y calidad de las MSCs y se han publicado buenos resultados utilizando lisado de plaquetas, sueros autólogos y plasma rico en plaquetas, en contraste con aquellos obtenidos utilizando suero de animales (Fekete et al, 2012; Bara et al, 1999). Otros trabajos han evidenciado el cambio de inmunofenotipo de las MSCs expandidas *in vitro*, así como la pérdida de multipotencia y capacidad de proliferación (Bara et al, 1999). Por lo tanto, las condiciones de cultivo en donde se incluyen medios de cultivo, suplementos o superficie de crecimiento celular empleada, pueden afectar las características biológicas de las MSCs y deberían ser consideradas en la expansión de estas células a escala clínica.

En pacientes con desórdenes hematológicos, el estroma de la MO sufre daño significativo y prolongado debido a las altas dosis de quimioterapia y radioterapia aplicados antes del HSCT, los cuales pueden retrasar el injerto de células hematopoyéticas (Wu KH, et al 2013). Es posible que las MSCs sean capaces de reconstituir el sistema estromal de la MO después de un tratamiento ablativo, como se ha reportado en modelos murinos, niveles de SDF-1, TPO e IL-11 han sido detectada en el suero de pacientes con MSC-HSC, lo cual es importante ya que estas citocinas son esenciales para el mantenimiento de las HSCs/HPCs y son producidas principalmente por las MSCs y las células del estroma (Hou et al, 2010). Es posible que las MSCs estén involucradas en la reconstitución del estroma en pacientes trasplantados dado que se ha observado que MSCs del donador se han encontrado en la MO de pacientes posterior a

las 6 semanas de ser trasplantados con MSCs y HSCs. Hasta ahora existen 33 estudios clínicos de 532 relacionados a la aplicación de MSCs en muchos desórdenes en los cuales se ha reportado que su trasplante promueve el injerto de HSCs así como favorece el tratamiento de la GVHD (ClinicalTrials.gov).

Padecimiento	Fuente de HSCs/ HPCs (CD34 ⁺ , x10 ⁶ /kg)	Fuente de MCSs y tiempo de administración	Recuperación de neutrófilos y plaquetas promedio en días	Observaciones	Referencia
Enfermedades hematológicas	Alogénica MO o SPM	MO alogénica 4 h pre-TCH	14 (11–26) y 20 (15–36)	Rápida recuperación hematopoyética, pero sin diferencia en el injerto comparado con el control	(Lazarus <i>et al.</i> , 2005)
Enfermedades hematológicas	Alogénica MO (2.65–3.39), SPM (7.2–68.9) o SCU (0.21)	MO alogénica 0–4 h post-TCH	12 (10–28) y 12 (8–36)	Rápido injerto y 100% de quimerismo, incluyendo pacientes con falla en el primer trasplante	(Le Blanc <i>et al.</i> , 2007)
Inmuno-deficiencia	Alogénica SPM 21.5 (11.6–38.6)	MO alogénica 4 h pre-TCH	12 (10–17) vs. 13 ^a (9–28) y 10 (9–18) vs. 13 ^a (9–100)	Éxito en el 100% of pacientes trasplantados con rápida reconstitución hematopoyética comparada con los controles históricos (15% de falla en trasplante)	(Ball <i>et al.</i> , 2007)
Enfermedades hematológicas	Alogénica MO 4.27 (0.27–10.11)	MO alogénica 4 h pre-TCH	16 vs. 15 ^a y 30 vs. 27 ^a	Recaída más elevada que en el grupo control	(Ning <i>et al.</i> , 2008)
Leucemia aguda pediátrica	SCU	MO alogénica Al día cero	19 y 53	Sin diferencia en el injerto comparado con los controles históricos	(Mcmillan <i>et al.</i> , 2009)
Deficiencia en recuperación hematológica	Alogénica SPM (2.1–5)	MO Alogénica Post-TCH	5–15 y 12–21	2/6 pacientes mostraron rápida recuperación hematopoyética	(Meutemon <i>et al.</i> , 2009)
Enfermedades hematológicas	Alogénica SPM 2.61 (2.4–3.3), SCU 0.12 (0.037–0.28)	MO alogénica Inmediatamente después del TCH	12 (1–31) vs. 10 ^a (9–36) y 44 (27–98) vs. 32 ^a (13–97)	Sin diferencia en injerto comparado con los controles	(Gonzalo-Daganzo <i>et al.</i> , 2009)
Anemia aplásica pediátrica	Alogénica MO (7.98) y SPM (7.25)	MO alogénica Pre-TCH	12.3 (11–18) y 13.8 (11–22)	Rápida recuperación hematopoyética con sobrevivencia de todos los pacientes en un rango de 6–29 meses	(Wang <i>et al.</i> , 2012)

Tabla 2.- Estudios clínicos con el uso de MSCs de MO para la recuperación hematopoyética en enfermedades hematológicas. Tomada de Fajardo-Orduña y Montesinos 2015.

4.3 Fuentes alternativas a la MO de MSCs

La MO es la principal fuente de donde se obtienen MSCs para la aplicación en HSCT. Sin embargo, muchos grupos de trabajo han mostrado que las MSCs pueden ser obtenidas de otros tejidos u órganos en estado adulto, así como de fuentes fetales (Ullah et al, 2015) y fuentes neonatales tales como cordón umbilical (Wang et al, 2012) sangre de cordón umbilical y placenta (Montesinos et al, 2009). La ventaja de utilizar MSCs de fuentes neonatales es que son de fácil obtención y no resulta invasivo para el

donador, exhibiendo bajo riesgo de transmisiones virales y de fácil accesibilidad. Las MSCs obtenidas de estas fuentes también presentan los criterios que definen a una MSC como su capacidad de adhesión a platos de cultivo, morfología fibroblastoide, expresión de los marcadores característicos de MSCs y su potencial de diferenciación (Montesinos et al, 2009). De manera similar mente ha sido reportado que las MSCs provenientes de fuentes neonatales exhiben la capacidad de producir moléculas que regulan la hematopoyesis (Tabla 3), incrementando la expansión de HPCs *ex vivo* (Jang et al, 2006; Zhang et al, 2004) y favoreciendo el injerto en modelos murinos (Hiwase et al, 2009; Yim et al, 2010). Se han realizado estudios *in vitro* en donde se evaluó la capacidad de las MSCs provenientes de fuentes neonatales para incrementar la proliferación y expansión las HPCs menos primitivas (CFC mieloides y eritroides), así como favorecer el mantenimiento de las HPCs más primitivas (células CD34+ CD38- Lin- y LTC-IC), al igual que las MSCs de MO (Fajardo Orduña, et al 2017; Zhang et al, 2004; Wagner et al, 2007; Wang et al, 2004).

La aplicación de MSCs de recursos neonatales en HSCT ya se ha evaluado en algunos estudios clínicos, tal es el caso de las MSCs de cordón umbilical (MSC-CU) cuya efectividad se ha evidenciado. Así, MSCs-CU han sido utilizadas en HSCT alogénicos de MO, sangre periférica movilizada y SCU en un rango de dosis de $8-10 \times 10^6$ cel/Kg de peso aplicados vía intravenosa horas antes del HSCT. Las MSCs-CU garantizaron el injerto de células hematopoyéticas y promovieron una rápida recuperación de neutrófilos y plaquetas comparadas con los pacientes de HSCT sin previo tratamiento con MSCs. Estos resultados mostraron resultados más homogéneos comparados con los resultados obtenidos con los tratamientos con MSCs de MO, ya que la recuperación hematopoyética fue favorable en muchos de los pacientes tratados. Esta observación sugiere que las MSCs obtenidas de tejidos neonatales son una opción viable para mejorar el HSCT (Wu KH et al, 2013; Bara et al, 2014; Wang et al, 2012).

Moléculas (receptor y ligando)	Fuente de MSC				Efecto en células hematopoyéticas	Referencia
	MO	SCU	PL	CU		
<u>-Citocinas solubles</u>						
CXCL12 (SDF-1)/CXCR4	●	●	●	●	Mantenimiento, quiescencia, supervivencia, homing y expansión de HSCs HPCs .	Nagasawa et al, 2011; Luan X et al, 2013; Schajnovitz A et al 2011; Wagner et al, 2007.
TPO/MLP	●	●	ND	ND	Quiescencia de HSCs dirige al compromiso y diferenciación de trombocitos y liberación de plaquetas.	Yang YK et al, 2006; de Graaf et al, 2011; Li T et al, 2011.
SCF/c-kit (CD117)	●	●	●	●	Mantenimiento y expansión, proliferación de HSCs y diferenciación hacia linajes mieloides y eritroides, en combinación con otros factores.	Luan X et al, 2013; Yang YK et al, 2006; Zhang et al, 2004; Kimura et al, 2011; Mayani H et al 2007; Lo Iacono et al, 2017.
Fit3-L/Fit3	●	●	●	Fit3-L	Supervivencia, mantenimiento de HSCs y autorenovación, proliferación de HPCs y diferenciación hacia linaje mieloides y eritroide, en combinación con otros factores.	Yang YK et al, 2006; Zhang et al, 2004; Mayani H et al 2007; de Kruijff et al, 2010; Lo Iacono et al, 2017.
IL-6/IL-6R	●	●	●	IL-6	Compromiso, proliferación de HSCs y maduración hacia linaje mieloides y megacariocítico.	Luan X et al, 2013; Wagner et al, 2007; Yang YK et al, 2006; Zhang et al, 2004; Lo Iacono et al, 2017.
GM-CSF/GM-CSFR	●	●	Estímulo con IL-1 α , TNF α	GM-CSF	Efectos pleiotropicos en células hematopoyéticas, dirige a las HPC hacia un compromiso de linaje mieloides.	Wagner et al, 2007; Yang YK et al, 2006; Zhang et al, 2004; Barreda et al, 2004; Lo Iacono et al, 2017.
G-CSF/G-MSCR	Estímulo IL-1 α .	ND	Estímulo IL-1 α , TNF α	G-CSF	Proliferación de HPCs, diferenciación y supervivencia, diferenciación terminal y maduración de granulocitos.	Zhang et al, 2004; Barreda et al, 2004; Folores-Figueroa et al, 2006; Lo Iacono et al, 2017.
M-CSF/M-CSFR	●	●	●	M-CSF	Proliferación de HSCs, diferenciación y supervivencia, diferenciación terminal y maduración de macrófagos.	Yang YK et al, 2006; Zhang et al, 2004; Barreda et al, 2004; Lo Iacono et al, 2017.
<u>-Moléculas de adhesión</u>						
N-cadherina/ β -catenina	●	●	ND	ND	Mantiene la troncalidad de las HSCs e interacción con el nicho.	Sacchetti B 2007; Wagner et al, 2007; Wein F et al, 2010.
VCAM-1 (CD106) /Integrina α 4, β 1, β 2	●	●	ND	*	Adhesión estromal de las células hematopoyéticas Homing de las HSCs.	Wagner et al, 2007; Simmons et al, 1992; Majumdar et al, 2003; Prosper F et al 2001; Sarugaser R et al 2002; Lu LL et al 2006.
ICAM-1(CD54) /integrinas β 1, β 2	●	●	●	*	Homing de las HSCs.	Montesinos JJ et al 2009; Chitteti BR et al 2003.
ALCAM(CD166) /ALCAM, CD6	●	●	●	●	Mantenimiento de las HSCs	Majumdar et al 2003; Montesinos JJ et al, 2009.
LFA-3(CD58)/integrinas α L β 2	●	●	●	ND	Adhesión estromal de células hematopoyéticas.	Sacchetti B 2007; Pilz et al, 2011.
MCAM(CD146)/VEGF	●	ND	●	●	Mantenimiento de HSCs y HPCs.	
<u>-Moléculas de la MEC</u>						
Colágeno/integrinas β 1, β 2, CD44	●	ND	ND	integrinas β 1, CD44	Mantenimiento de las HSCs	Li T et al 2011; Prosper F et al 2001; Zuckerman et al, 1985; Moretti 2009.
Fibronectina / integrinas β 1, β 2, CD44	●	ND	●	integrinas β 1, CD44	Promueve e inhibe la proliferación de HSCs, en controversia.	Li T et al 2011; Zhang et al, 2004; Prosper F et al 2001; Hurley et al, 1995.
Laminina/Integrinas α 6, β 1, β 2	●	ND	●	ND	Adhesión estromal de células hematopoyéticas.	Zhang et al, 2004; Folores-Figueroa et al, 2006; Prosper F et al 2001.
Osteopontina/Integrinas β 1, CD44	●	ND	●	integrinas β 1, CD44	Mantenimiento, regulación y homing de las HSCs en la MO.	
<u>-Otras moléculas</u>						
Jagged-1/Notch-1,2	●	ND	ND	ND	Autorenovación de HSCs	Sacchetti B 2007; Fujita et al, 2008

Tabla 3.- Moléculas que regulan la hematopoyésis y que son secretadas y/o expresadas en la membrana de las MSCs.

Tomada y modificada de Fajardo-Orduña 2015.

● Significa expresión de la molécula

* significa que su expresión se encuentra en controversia.

IV ANTECEDENTES

Mucho se sabe acerca de la participación de las MSCs en la mielopoyesis, sin embargo, poco se sabe acerca de su participación en la linfopoyesis. De los pocos trabajos que hay sobre MSCs y linfopoyesis la mayoría se realizaron con MSCs de MO. Los primeros trabajos establecieron un sistema *in vitro* para evaluar la linfopoyesis B a partir de poblaciones CD34⁺ en cocultivo con MSCs de MO, en los cuales se observó la importancia de citocinas como SCF y FLT3-L, que bajo estas condiciones de cultivo, favorecieron la formación de células CD10⁺ a partir de las 2 semanas de cocultivo e incluso aumentaron a las semanas 4 y 5. También se observó que al añadir IL-7 junto con SCF y FLT3-L la producción de células CD10⁺ era limitada en comparación a cuando no se añadía esta citocina y además que después de 4 semanas en cocultivo en presencia de SCF y FLT3-L, generaban células CD19⁺ que expresaban el marcador para IgM (células B inmaduras). No obstante, de manera interesante, cuando se añadía IL-7 se disminuía la generación de células B inmaduras y solo se favorecía la formación de células CD19⁺ (Ichii M. et al, 2008). En otro estudio, se encontró que sobrenadantes de MSCs de MO humanas en combinación con citocinas como SCF, FLT3-L e IL-7 generaron 2x10⁶ células CD10⁺ CD19⁺ a las 4 semanas de cocultivo y más de la mitad de ellas, además, eran CD20⁺. En este estudio, también se evaluó el potencial de diferenciación linfóide B por parte de las MSCs *in vivo* en ratones NOG/SCID subletalmente irradiados, con lo cual se concluyó que bajo estas condiciones de cultivo se favorece la generación de células linfoides B tanto *in vitro* como *in vivo* en ratones quiméricos (Ichii M. et al, 2010). En otro estudio se reportó que MSCs telomerizadas de MO (células transfectadas con el gen hTERT con alta actividad telomérica para alargar su tiempo de vida), así como MSCs de MO de cultivos primarios en presencia de FLT3-L, generaban precursores linfoides tempranos de células B con fenotipo CD19⁺ cyCD79a⁺ y CD19⁻ CD79a⁺, así como de precursores NK/T tempranos con fenotipo CD7⁺ CD56⁻. En este estudio los cocultivos fueron iniciados a partir de la población CD34⁺ CD38^{low/-} CD19⁻ CD10⁻ CD7⁻ y a pesar de que se observó que ambas MSCs generan precursores linfoides tempranos, las MSCs de MO telomerizadas fueron mejores para generarlos (Nakamori et al, 2012). Otro subtipo de MSCs de MO que ha sido reportada que también tiene capacidad de soporte linfopoyético *in vivo* en ratones NOD/SCID-IL2Ry^{null} son las MSCs de MO CD271⁺, en este estudio se demuestra que esta subpoblación de MSCs en comparación con las MSCs totales, mejora el injerto de células troncales hematopoyéticas y además promueve su diferenciación hacia células de linaje mieloide y linfóide B CD19⁺, T CD3⁺ y NKT CD3⁺ CD56⁺ (Kuçi S. et al 2010).

Por otro lado, con respecto a estudios clínicos con mesenquimales y sus efectos en la linfopoyesis hay muy pocos, un estudio reportado por Ball et al, en el cual células MSCs de MO fueron cotrasplantadas con células CD34⁺ en niños con enfermedades hematológicas, encontró diferencias

significativamente mayores en la recuperación linfopoyética de células NK en pacientes cotrasplantados con MSCs, en comparación con aquellos pacientes trasplantados solo con células CD34+, sin embargo a los tres meses a estos mismos pacientes se les evaluó la recuperación de células linfoides y no se encontraron diferencias significativas en la recuperación de células T y NK entre el grupo control y los pacientes cotrasplantados con MSCs, además se encontró que las MSCs modularon el microambiente inflamatorio y subtipos de células T, lo que redujo la probabilidad de rechazar el injerto (Ball LM 2007).

Por último, se evaluó la capacidad de soporte linfopoyético de MSCs provenientes de fuentes alternativas a la MO comparándose la capacidad de recuperación multilínea de MSCs provenientes de placenta y cordón umbilical en un modelo in vivo de ratones NOD/SCID subletalmente irradiados, en el cual se observó que después de 12 semanas posteriores al trasplante de células CD34+ de SCU previamente expandidas tanto con MSCs de placenta como de cordón umbilical, ambas fueron capaces de generar células linfoides humanas CD19+, CD3+ y C56+ en dichos ratones (Kadekar et al, 2015).

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Varios grupos de investigación han estudiado la capacidad de las MSCs para favorecer la hematopoyesis, sin embargo, en la mayoría de estos estudios solo se ha evaluado la capacidad de soporte mielopoyético. En la actualidad poco se sabe de la capacidad de las MSCs para favorecer la linfopoyésis y los escasos estudios que hay se han realizado con MSCs de MO, pero no sabemos si las MSCs de fuentes alternativas a la MO, como las MSCs provenientes de tejidos neonatales tienen capacidad linfopoyética. En el presente trabajo se pretende determinar in vitro, si las MSCs neonatales poseen capacidad linfopoyética y para ello se establecerá la generación de sistemas de cocultivo utilizando MSCs de SCU, PL y CU de manera independiente, así como de aquellas provenientes de MO. Se pretende que al manipular este sistema de cocultivo en combinación con distintas citocinas, se favorezca la generación de un tipo específico de célula linfóide o de varios linajes linfóides. El conocimiento de la biología básica de las MSCs de fuentes alternativas a la MO, puede repercutir en su aplicación a futuro en tratamientos de terapia celular, como el HSCT

VI. HIPÓTESIS:

Las MSCs de MO, PL y SCU tendrán la capacidad de estimular la proliferación y diferenciación de las células de linaje linfóide.

VII.OBJETIVOS

1. Objetivo General

Evaluar la capacidad de estimulación linfopoyética de las MSCs provenientes de tejido adulto y neonatal.

2. Objetivos Particulares

- Caracterizar a las MSCs provenientes de gelatina de Wharton (GW).
- Evaluar el efecto de las MSCs de MO, SCU, PL y GW sobre la proliferación de células hematopoyéticas totales.
- Evaluar el efecto de las MSCs de MO, SCU, PL y GW sobre la diferenciación de progenitores hematopoyéticos hacia células de linaje NK, dendrítico y células B.

VIII. METODOLOGÍA

1. OBTENCIÓN Y CULTIVO DE LAS MSCS

Todas las muestras fueron obtenidas de donadores sanos, bajo los estándares éticos de los hospitales correspondientes. Las muestras de SCU, PL fueron obtenidas de partos a término o cesáreas. Una vez liberada la placenta con el cordón umbilical, la sangre se colectó en una bolsa de colección con anticoagulante, pinchando la vena umbilical con una aguja. Para obtener las muestras de PL, se cortó un trozo de amnios y corion cercano al cordón umbilical y se colocó en un tubo con 20 ml de medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium, Gibco, Carlsbad, USA) adicionado con penicilina-estreptomicina y gentamicina (10ul/ml; 10,000unidades/ml; Gibco, Carlsbad, USA). Las muestras de MO, se obtuvieron por aspirado de donadores sanos. Tanto los aspirados de MO y las muestras de SCU y PL colectadas, se procesaron en condiciones estériles dentro de una campana de flujo laminar.

Para obtener las MSCs de MO, la muestra de aspirado medular se sometió a un gradiente de densidad (<1.077 g/ml) Ficoll-Paque Plus (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suiza). Se tomó la interfase de células mononucleares (CMNs) y se sembraron a una densidad de 1×10^6 de CMNs/cm² en una caja de Petri de 100 mm (Corning) en presencia de 10 ml de medio Eagle Modificado por Dulbeco bajo glucosa (DEMEM-Ig, Gibco, California, USA) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SFB) (Gibco) y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Las MSCs se obtuvieron mediante selección por adhesión. Para ello se cultivaron a las CMNs durante 24 hrs en medio de cultivo para MSCs, posteriormente, se desecharon las células no adherentes y se hicieron dos lavados con PBS a la caja de Petri y se adicionaron 10 ml de medio para MSCs.

Para la obtención de MSCs de SCU, se aislaron las CMNs por un gradiente de densidad usando Ficoll-Paque Plus, una vez obtenida la interfase de CMNs se lavaron con PBS. El botón celular

se resuspendió en 1 ml de medio para MSCs con 8 $\mu\text{l/ml}$ de una combinación de 4 antibióticos (Ciprofloxacina 100 mg/ml, 200 mg/100 ml; Gentamicina 20 mg/ml, 50 mg/ml; Vancomicina 200 mg y Eritromicina 200 mg). Las células se cultivaron en cajas de Petri de 100 mm a una concentración de 1×10^6 a $2 \times 10^6 / \text{cm}^2$ y se incubaron a 37°C con 5% de CO_2 . Cuatro días después, se desechó el medio de cultivo con las células no adherentes, se realizaron dos lavados con PBS a la caja y se adicionó medio de cultivo fresco, esta se incubó una vez más y siete días después se observó bajo el microscopio para determinar la presencia de MSCs.

Para la obtención de MSCs de PL, se cortó una parte de amnios y corion cercana al cordón umbilical, se lavó el tejido con PBS y se cortó en trozos pequeños, se agregaron 15 ml de tripsina (Tripsina-EDTA 0.05%, Gibco) y se colocó el matraz en baño María a 37°C durante 15 min. Posteriormente, se filtró la suspensión con una maya de nylon y se adicionó 1 ml de SFB. Se centrifugó a 1,200 rpm por 8 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1 ml de medio para MSCs. Las células se sembraron en una caja Petri de 100 mm a una densidad de $1 \times 10^6 / \text{cm}^2$ y se incubó a 37°C con 5% de CO_2 . Cuatro días después, se desechó el medio de cultivo con las células no adherentes, se realizaron dos lavados con PBS a la caja y se adicionó medio de cultivo fresco, esta se incubó a 37°C con 5% de CO_2 . Cuatro días después se observó la caja de cultivo bajo el microscopio para determinar la presencia de MSCs adheridas.

Para obtener las MSCs de cordón umbilical se lavó el cordón y la vena con PBS. Posteriormente se retiraron la vena y las arterias. La sección correspondiente a la gelatina de Wharton y se cortó en pedazos pequeños de aproximadamente $3\text{-}5 \text{ mm}^3$ y se distribuyeron en toda la superficie de una caja de Petri previamente tratada con una capa de SFB durante 2 horas. Se agregó medio Eagle Modificado por Dulbecco alto en glucosa (DMEM-HG, por sus siglas en inglés; Gibco), suplementado con 15% de SFB (Gibco), 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina y 2 mM de L-glutamina. Se realizó cambio de medio a los 4 días. Posteriormente mediante adherencia a la caja de cultivo se obtuvieron MSCs.

Una vez que las MSCs provenientes de MO, SCU y PL llegaron al 80% de confluencia, las células se despegaron de la caja de cultivo. Las células obtenidas de este primer cultivo correspondieron a la resiembra cero (R0), las MSCs obtenidas de la R2 a la R5 se utilizaron para analizar su inmunofenotipo, morfología y capacidad de diferenciación hacia adipocitos, osteoblastos y condroblastos.

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MESENQUIMALES DE MO, SCU, PL, GW

Las MSCs de MO, SCU y PL utilizadas para este trabajo, ya habían sido previamente caracterizadas por nuestro grupo de trabajo (Montesinos et al, 2009), sin embargo, las MSCs de GW, no habían sido caracterizadas aún, por lo cual se realizó la caracterización de las muestras de GW que utilizamos para este trabajo.

2.1 Morfología

Para conocer la morfología de las MSCs, se sembraron a una densidad de $50 \times 10^4 / \text{cm}^2$ en cajas de Petri de 35 mm con medio para MSCs, cuando llegaron a una confluencia del 60%, se tomaron fotos de 3 campos a diferentes aumentos 5X, 10X, 20X y 40X.

2.2 Inmunofenotipo de las MSCs

Se analizó la expresión de algunos antígenos de superficie que caracterizan a las mesenquimales mediante citometría de flujo en un citómetro Canto (Beckton-Dickson). Se incubó por 30 min en oscuridad con los siguientes anticuerpos acoplados a los siguientes marcadores: anti-CD13-PE, anti-CD14 PE, anti-CD105-PE, anti-CD31-FITC, anti-CD34-APC, anti-CD45-PE, anti-CD105-PE, anti-HLA-DRE-PE, anti-HLA-ABC-FitC, anti-CD90-APC y anti-CD73-PE.

2.3 Capacidad de diferenciación

2.3.1 Capacidad de Diferenciación Osteogénica.

Las células fueron cultivadas en cajas de Petri de 35mm a una densidad de 30×10^4 por caja con medio de diferenciación osteogénica (StemPro Osteogenesis Differentiation Kit, Gibco), adicionando $10 \mu\text{l}/\text{ml}$ de penicilina-estreptomicina y $10 \mu\text{l}/\text{ml}$ de gentamicina, durante 21 días. Se realizaron cambios de medio cada 3 a 4 días. Pasados los 21 días, se enjuagó con agua destilada y se adicionó metanol (-20°C) durante 5 min, seguido de 1 lavado de 1 min con agua desionizada. Finalmente se agregó el sustrato SIGMA FAST BCIP/NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indonyl phosphate/Nitro blue tetrazolium) (10 mg/350mL) (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos y se realizaron 3 enjuagues con agua destilada.

2.3.2 Capacidad de Diferenciación Adipogénica

Las células fueron cultivadas en cajas de Petri de 35mm a una densidad de 30×10^4 por caja en presencia de medio de diferenciación adipogénica (StemPro Osteogenesis Differentiation Kit, Gibco), durante 21 días con cambios de medio cada 3 a 4 días. Pasados los 21 días la detección de la diferenciación se retiró el medio inductor y se enjuagó con agua destilada, después se adicionó formol

buffer al 10% por 5 min., al término de los 5 min., se desechó el formol buffer y se agregó propilenglicol absoluto por 5 min., después se tiñó con rojo oleoso durante 1 hora a una temperatura de 60°C. Al término, se enjuagó con propilenglicol al 85% durante 2 min y por último se contratiñó con hematoxilina de Harris. Se tomaron fotografías de 3 campos diferentes a distintos aumentos.

2.3.3 Capacidad de Diferenciación Condrogénica.

Células MSCs fueron sembradas a una densidad 30×10^4 en cajas Petri de 35 mm, una vez que alcanzaron confluencia del 60% se les adicionó medio para diferenciación condrogénica (Cambrex Bio Science) suplementado con 10ng de TGF- β (Peprotech) durante 21 días con cambios de medio cada 3 y 4 días. Al concluir los 21 días, se retiró el medio de diferenciación y se añadió 1 mL de ácido acético glacial al 3% por 3 min. Posteriormente, se añadió el colorante azul alciano al 1% por 30 min, al terminar los 30 min se retiró el colorante y se realizaron de 2 a 3 enjuagues con agua desionizada para retirar el exceso de colorante. Se tomaron fotografías de 3 campos diferentes a diferentes aumentos.

3. OBTENCIÓN DE CÉLULAS ENRIQUECIDAS CD34+ CD38- LIN- DE SCU

Se aislaron células mononucleares CMNs de muestras de SCU por un gradiente de densidad empleando Ficoll-Paque Plus. Una vez obtenida la interfase de CMNs, se lavaron dos veces con 10 ml de PBS centrifugando a 1,200 rpm por 5 minutos. El botón celular se resuspendió en medio RPMI suplementado con 10% de SFB y con 10 μ l/ml de penicilina-estreptomina y 10 μ l de gentamicina. Se determinó la viabilidad celular con azul de tripano y el número de células nucleadas con diluyente de Turk. Las células se cultivaron en cajas Petri de 100 mm a una densidad de 2×10^6 a 2.5×10^6 CMN/cm² y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Un día después se enriqueció la población CD34+CD38-Lin- mediante selección negativa utilizando el sistema StemStep (Stem Cells Technologies, Inc., Vancouver, Canadá), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, de 80×10^6 a 120×10^6 de CMNs en 1 ml de medio con sustituto de suero (Stem Line; Sigma) se incubaron con un coctel de anticuerpos dirigidos contra moléculas de superficie (CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD36, CD38, CD45RA, CD56, CD66b y glicoforina A). Seguida de una segunda incubación con un coloide magnético (15 min a temperatura ambiente para cada incubación). Después de la segunda incubación, la suspensión celular fue colocada en una columna magnetizada, a la que previamente se humedeció pasando 10 ml de PBS con 5% de SFB. Una vez colocadas las células en la columna, se lavó con 10 ml de PBS con 5% de SFB, las células que se obtuvieron de la columna se recuperaron en un tubo de plástico de 15 ml, se centrifugaron a 1,200 rpm durante 8 min, se resuspendieron en medio de cultivo Stem Line y se evaluó la viabilidad celular con azul de tripano y el número de células nucleadas con diluyente de Turk. Posteriormente, se analizó el porcentaje de células CD34+CD38-Lin- mediante citometría de flujo.

4. COCULTIVOS DE CÉLULAS CD34+CD38- LIN- CON CÉLULAS MSCS.

Monocapas con MSCs de MO, PL, SCU, PL y GW fueron sembradas dos o tres días previos al cocultivo en placas de 96 pozos a una densidad de $3.5-5 \times 10^5$ células por pozo. Posterior a los dos días y al alcanzar las monocapas una confluencia del 70%, se adicionó 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de mitomicina C (Mitolem, Lemery) para detener su proliferación. Después de 18 a 24 horas, se desechó el medio de cultivo y se realizaron dos lavados suaves con solución salina fisiológica sobre las capas celulares. Una vez estando listas las capas de MSCs provenientes de las tres fuentes se sembraron células CD34+ CD38- Lin- a una densidad de 15×10^4 células por pozo, con 200 μL de medio especial para hematopoyéticas Stem Line[®], con 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de penicilina-estreptomina y 10 ul/ml de gentamicina.

Se manejaron dos sistemas de cultivo, el sistema 1, que fueron los cocultivos para la diferenciación de células NKs, IKDCs, cDCs y monocitos, con una duración de 3 semanas adicionando un coctel de citocinas, IL-7 (5ng/mL), SCF (5ng/mL), Flt3-L (1ng/mL), IL-15 (10ng/mL), el cual se denominó coctel 1 (C1) en medio para hematopoyéticas Stem Line[®]. Por su parte en el sistema 2 de cultivo fue para diferenciar a linfocitos B y contenía las citocinas IL-7 (10 ng/mL), SCF (10ng/mL), Flt3-L (5ng/mL), denominado como coctel 2 (C2) y estos cocultivos tuvieron una duración de 5 semanas. A su vez se manejaron para ambos tipos de cocultivos las siguientes condiciones: condición solo con citocinas C1 y C2 respectivamente, condición solo con MSCs y condición con MSCs más citocinas.

5. PROLIFERACIÓN

Para evaluar la proliferación de células totales generadas, se contó el número de células cosechadas con azul tripano al término de cada cocultivo bajo las diferentes condiciones y se manejó por incremento en veces partiendo de una población de 15×10^4 células.

6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE SOPORTE LINFOPOYÉTICO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Al concluir las semanas de diferenciación se cosecharon las células hematopoyéticas de los cocultivos con las diferentes fuentes estromales y posteriormente se les realizó una tinción de citometría para evaluar subpoblaciones linfoides generadas en los cultivos, para ello se dejaron incubando 30 min con el anticuerpo en oscuridad. Los anticuerpos acoplados a los marcadores de interés fueron los siguientes: para la diferenciación linfoide B se evaluaron los marcadores CD34-APC, CD45-PE, CD10-FITC, CD19-APC Cy7; para la diferenciación NK/DC y monocítica se evaluaron los marcadores CD45-APC, CD56-PE Cy7, CD16-FITC, CD11b Brilliant Violet, CD11c APC Cy7.

7. OBTENCIÓN DEL RENDIMIENTO POR PROGENITOR (Y/I)

Se obtuvo el rendimiento obtenido por progenitor (Yield/Input), de cada una de las subpoblaciones linfoides encontradas en los cocultivos de la siguiente manera:

1) Primero se obtiene el número de células totales con la siguiente formula:

Células Totales = [(# células con fenotipo X) (# de células viables)]/# células linfoides

2) Una vez que se obtiene el número de células totales, se divide entre el input para obtener el rendimiento por progenitor.

Y/I= Células Totales con fenotipo X / Input (# de células que se añadió al inicio del cocultivo)

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software Graph Pad Prism 7, usando el análisis de comparaciones múltiples de Tukey y ANOVA, para determinar si había diferencia significativa entre ellos. La significancia estadística fue asumida cuando los valores de P fueron inferiores a 0.05.

IX. RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE LAS MSCS DE MO, PL, SCU, GW

1.1. Morfología de MO, SCU, PL y GW

Se tomaron fotos de los cultivos de MSCs cuando alcanzaron una confluencia del 60%, para evidenciar que todas las fuentes presentaban una morfología fibroblastoide característica de MSCs. En efecto todas las fuentes evaluadas presentaron morfología fibroblastoide como puede observarse en la figura 9.

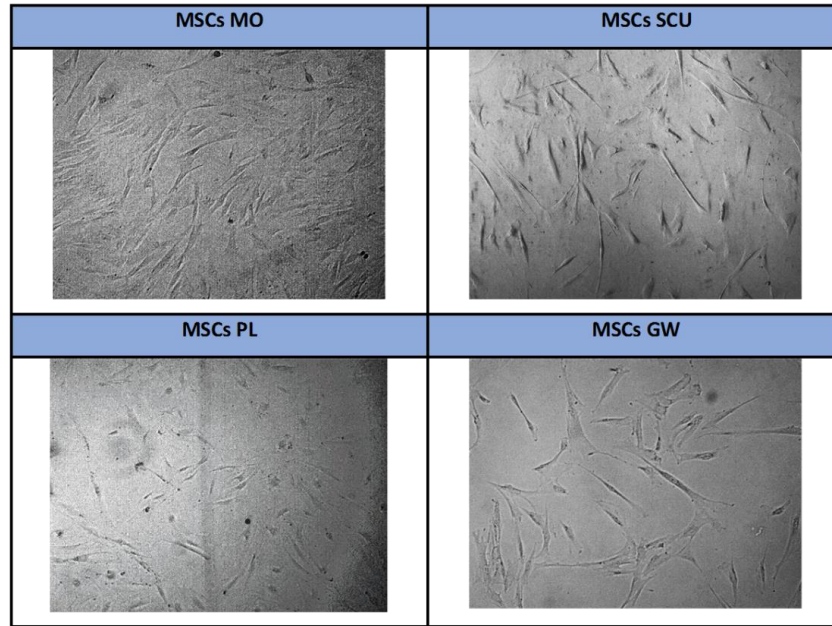


Figura 9.- Fotografías representativas de cultivos de MSCs de MO, SCU, PL, GW a un aumento de 10x, en los cuales puede observarse una morfología fibroblastoide característico de MSCs en las cuatro fuentes que fueron evaluadas.

1.2 Inmunofenotipo de las MSCs de MO, SCU, PL y GW

Se evaluó el inmunofenotipo de las MSCs de MO, PL, SCU y GW mediante la expresión de diferentes marcadores de superficie a través de citometría de flujo. Las células de las cuatro fuentes fueron negativas para los marcadores CD14, CD34 y CD45, CD31 y HLA-DR, y fueron positivas para los marcadores característicos de una MSC como CD105, CD90, CD73 y CD13 (Tabla 2).

Estos resultados indican que las MSCs de SCU, PL y GW que se utilizaron en este trabajo, presentan un patrón similar a las MSCs de MO en la expresión de antígenos de superficie, tal como se reportó anteriormente (Montesinos et al, 2009).

Marcador	MSCs MO	MSCs SCU	MSCs PL	MSCs GW
CD105	98.53 ± 61	92.2 ± 12.63	95.73 ± 3.09	92.25 ± 5.55
CD73	96.50 ± 2.24	97.96 ± 2.23	73.73 ± 29.79	91.18 ± 6.34
CD90	99.60 ± 0.36	74.33 ± 41.33	87.58 ± 12.21	99.23 ± 0.87
CD13	99.60 ± 0.14	97.77 ± 3.16	98.05 ± 2.33	89.88 ± 11.40
HLA-ABC	46.34 ± 26.42	62.26 ± 38.59	89.45 ± 10.10	75.15 ± 16.27
HLA-DR	0.51 ± 0.82	0.97 ± 0.87	1.35 ± 2.04	0.80 ± 0.67
CD 45	0.12 ± 0.21	1.77 ± 3.15	1.36 ± 0.74	3.12 ± 4.14
CD34	0.34 ± 0.51	0.35 ± 0.62	1.62 ± 2.43	3.62 ± 3.99
CD31	0.11 ± 0.14	1.18 ± 1.63	0.68 ± 0.42	2.04 ± 1.28
CD14	0.43 ± 0.26	1.06 ± 1.84	5.10 ± 8.88	0.42 ± 0.70

Tabla 4. Expresión de marcadores de superficie de las MSCs de MO, SCU, PL, GW determinado por citometría de flujo. Los valores se muestran en porcentajes de células positivas para los diferentes marcadores y corresponde a la media y la desviación estándar de los valores a partir de experimentos separados (MO n=4; SCU n=4; PL n=4; GW=6). No se encontraron diferencias significativas en los marcadores cuando se compararon entre las diferentes fuentes.

1.3 Capacidad de diferenciación de las MSCs de MO, SCU, PL, GW

Se evaluaron los potenciales de diferenciación de las MSCs de MO, SCU, PL y GW, después de haberlas cultivado bajo condiciones que favorecen la diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica. Todas las muestras de MSCs tuvieron la capacidad de diferenciarse hacia osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Figura 10). En los cultivos de MSCs de las tres fuentes inducidas hacia diferenciación osteogénica se realizó la tinción de fosfatasa alcalina para evidenciar la presencia de esta enzima que se encuentra altamente expresada en hueso (Figura 10). Por otro lado, para evaluar la diferenciación adipogénica se realizó la tinción de rojo oleoso, la cual evidenció la adipogénesis mediante la formación de vacuolas lipídicas, siendo las MSCs de MO las que generaron las vacuolas más grandes y un mayor número de adipocitos, comparada con las otras fuentes de MSCs (Figura 10). Por último, para evaluar la diferenciación condrogénica las células se tiñeron con azul alciano, que tiñe glucosaminglicanos y colágena principales productos de los condroblastos, todas las fuentes de MSCs presentaron capacidad diferenciación condrogénica al igual que las MSCs de MO (Figura 10).

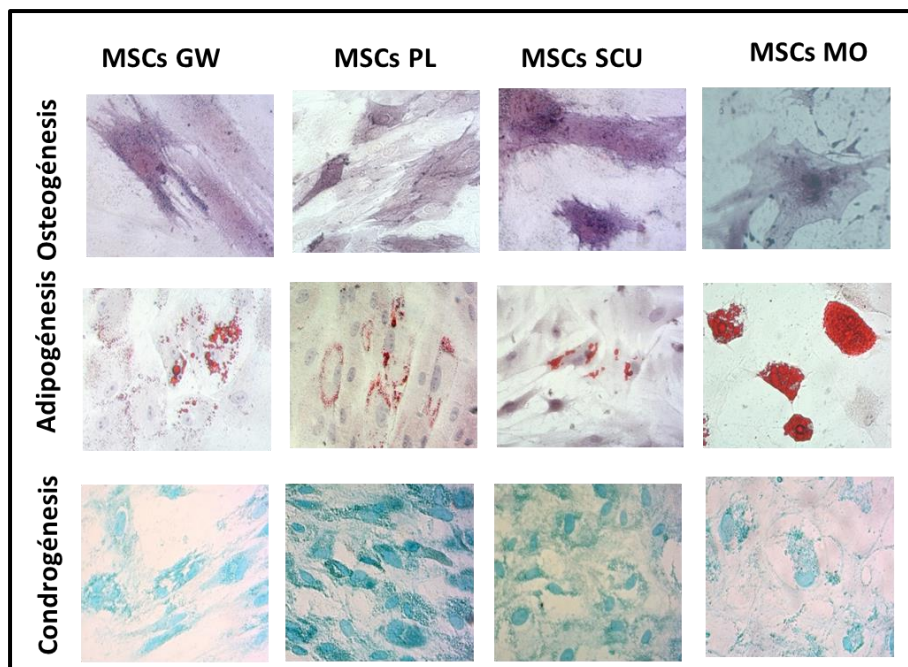


Figura 10. Diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica de las MSCs de MO, SCU, PL y GW. La diferenciación osteogénica se indica por la tinción de fosfatasa alcalina; la positividad se observa en color morado, la diferenciación adipogénica se indica por la positividad a la tinción con Rojo Oleoso y la diferenciación condrogénica se indica por la presencia de colágena y glucosaminglicanos teñidos con azul alciano; la positividad se observa de color azul, todas las fotos fueron tomadas a un aumento de (40x).

2.- COCULTIVOS CON CÉLULAS ENRIQUECIDAS CD34+CD38- EN CONTACTO CON MSCS

2.1 Muestras de SCU procesadas y obtención de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-

En la siguiente tabla se muestran los porcentajes de enriquecimiento para la población CD34+CD38- Lin-, obtenidos posterior al enriquecimiento en las muestras de SCU, el cual se evaluó mediante citometría de flujo (Tabla 5)

Muestras	Porcentaje de enriquecimiento
SCU 1	40%
SCU 2	59%
SCU 3	96%
SCU 4	27%
SCU 5	62%
SCU 6	24%
SCU 7	40%
SCU 8	31%
Promedio % Enriquecimiento	47%

Tabla 5. Porcentajes de enriquecimiento para la población CD34+CD38-Lin- obtenidos de las muestras de SCU enriquecidas.

2.2 Evaluación de poblaciones linfoides maduras en muestras enriquecidas de SCU

Con la finalidad de corroborar la inexistencia de poblaciones linfoides en muestras enriquecidas de SCU de manera basal (sin estar bajo condiciones de cultivo), se realizó una tinción de citometría con todos los marcadores linfoides que se iban a evaluar en todos los experimentos, las dos muestras de SCU que se evaluaron, tuvieron un porcentaje de enriquecimiento del 33.4 % que a pesar de ser bajo, las subpoblaciones linfoides no se encontraban presentes o se expresaban muy poco, siendo las DCs mieloides las que más se expresaban con un 18% (Figura 11).

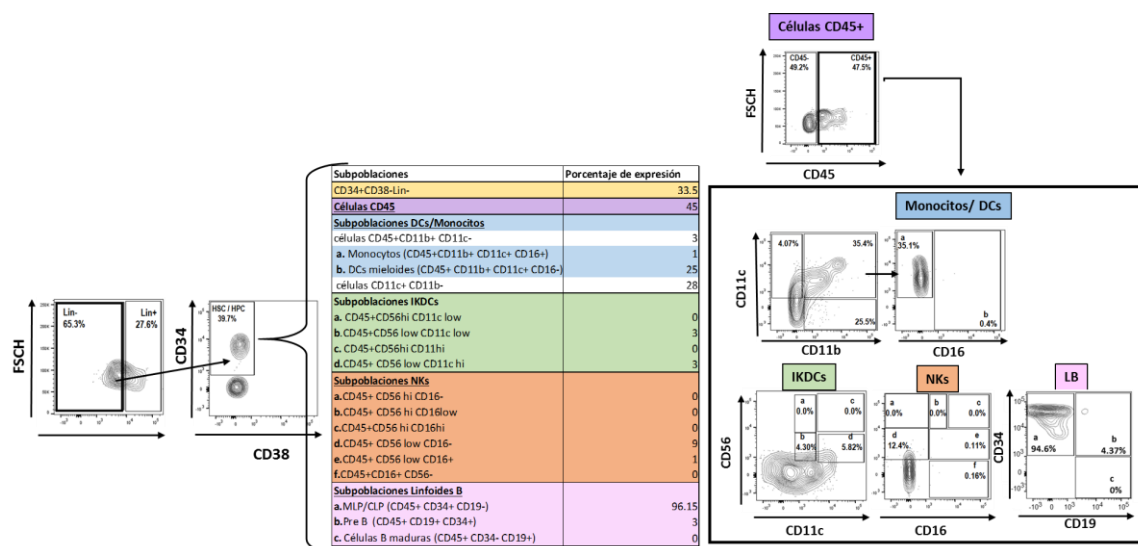


Figura 11. En la tabla se muestra el promedio del porcentaje de expresión de las subpoblaciones linfoides evaluadas en muestras enriquecidas de SCU n=2. Del lado derecho se muestran los plots representativos de cada una de las subpoblaciones evaluadas en las muestras enriquecidas.

2.3 PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS TOTALES

Para determinar la capacidad de las MSCs de MO, SCU, PL y GW para mantener la proliferación de células hematopoyéticas a partir de la población enriquecida CD34+ CD38- Lin-, se evaluó el número de células hematopoyéticas totales tanto en el sistema 1 de cultivo como en el sistema 2 de cultivo. Como puede observarse en la figura 12, aquellos cultivos que tenían ambos estímulos tanto citocinas como MSCs aumentaron el número de células hematopoyéticas bajo el sistema 1 y sistema 2 de cultivo y no hubo diferencias significativas entre fuentes de MSCs, sin embargo, cuando se comparó la condición de cultivo doble estimulada (MSCs más citocinas) con la condición que solo tenían citocinas, el número de células hematopoyéticas totales fue significativamente mayor en ambos sistemas de cultivo con todas las fuentes de MSCs. Cuando se comparó la condición que tenían los dos estímulos contra la condición

que sólo tenían MSCs se encontraron variaciones en los resultados dependiendo de la fuente de MSCs y del tipo de sistema de cultivo ya que en el sistema 1 de cultivo las MSCs de GW y MSCs de MO incrementaron el número de células aún sin tener citocinas, pero es importante mencionar que esto no se vió en todos los experimentos y a excepción de las MSCs de GW+ C1, todas las demás fuentes de MSCs en presencia de citocinas del coctel 1 (C1) aumentaron el número de células hematopoyéticas significativamente con respecto a su condición que solo tenía MSCs. Por otro lado en el sistema 2, cuando se compararon éstas mismas condiciones con doble estímulo, con aquellas que solo tenían MSCs, las GW-MSCs y SCU-MSCs sin citocinas, aumentaron el número de células hematopoyéticas aunque con variaciones en sus resultados y en ambas fuentes de MSCs no se encontraron diferencias significativas con su respectiva condición doble estimulada, sin embargo las MSCs de PL y MO en presencia de citocinas del coctel 2 (C2), sí presentaron un aumento significativo comparadas con su respectiva condición que solo tenía MSCs (Figura 12A y B). De manera interesante, las MSCs de MO con y sin citocinas bajo el sistema 1 mantuvieron número de células hematopoyéticas totales más altos comparadas con en el sistema 2 (Figura 12 A y B).

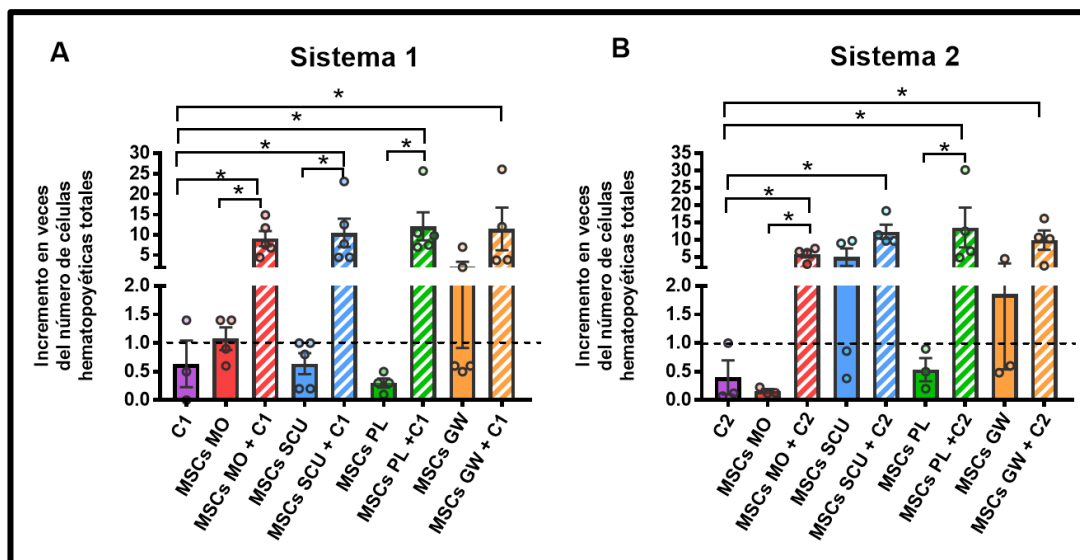


Figura 12. Proliferación de células hematopoyéticas totales generadas bajo el sistema 1 de cultivo (A), sistema 2 de cultivo (B), las barras en morado representan la condición que únicamente tiene citocinas; barras en colores solidos representan aquellas que sólo tienen MSCs; barras con rayas en diagonal representan la condición que tuvieron ambos estímulos (MSCs + coctel de citocinas 1 (C1) ó coctel 2 (C2) respectivamente). Cada círculo representa un experimento independiente. El gráfico muestra el incremento en veces del número de células hematopoyéticas tomando en cuenta la línea punteada que representa el valor de 1 que correspondiente las células con las que se inició el cocultivo, los asteriscos indican diferencias significativas con una $p < 0.05$. Las barras muestran la media \pm SEM.

2.4 CAPACIDAD DE SOPORTE LINFOPOYÉTICO DE LAS MSCS DE MO, SCU, PL Y GW

Presencia de células CD45⁺

Todas nuestras poblaciones evaluadas partieron de una población CD45⁺, ya que es una proteína que está presente en todos los leucocitos, pero con mayor expresión en los linfocitos, este marcador nos permitió ubicar y analizar a nuestra población de interés, por tal motivo se analizó la expresión y la presencia de células positivas para este marcador independientemente de los demás marcadores en los dos sistemas de cocultivos (Figura 13). En el sistema 1 de cultivo en presencia de ambos estímulos (MSCs+C1), no encontramos diferencias significativas en los rendimientos por progenitor de células CD45⁺ entre las diferentes fuentes de MSCs (Figura 13 A y C), contrario a lo que se observó en el sistema 2 de cultivo, en donde las MSCs de PL+C2 y MSCs SCU+C2 tuvieron rendimientos significativamente mayores comparados con los cultivos con MSCs de GW+C2 y MO+C2 (Figura 13 B). Cuando se compararon los cultivos que tenían los dos estímulos (MSCs+C1) contra la condición de cultivo que sólo tenía uno de los dos estímulos, citocinas o MSCs, en el sistema 1 todas las fuentes de MSCs+C1 tuvieron rendimientos significativamente mayores comparadas con su respectiva fuente de MSCs que solo tenía citocinas, a excepción de las MSCs de GW+C1 que no fueron significativamente mayores con respecto a su condición que sólo tenía MSCs-GW (Figura 13 A y C). Por su parte bajo el sistema 2 de cultivo, las MSCs de SCU+C2 y las MSCs de PL+C2 generaron rendimientos significativamente mayores de células CD45⁺ con respecto las MSCs de MO+C2 y MSCs de GW+C2 y también fueron significativamente mayores con respecto a aquellos cultivos que solo tenían el coctel 2 o solo MSCs respectivamente (Figura 13 B y C).

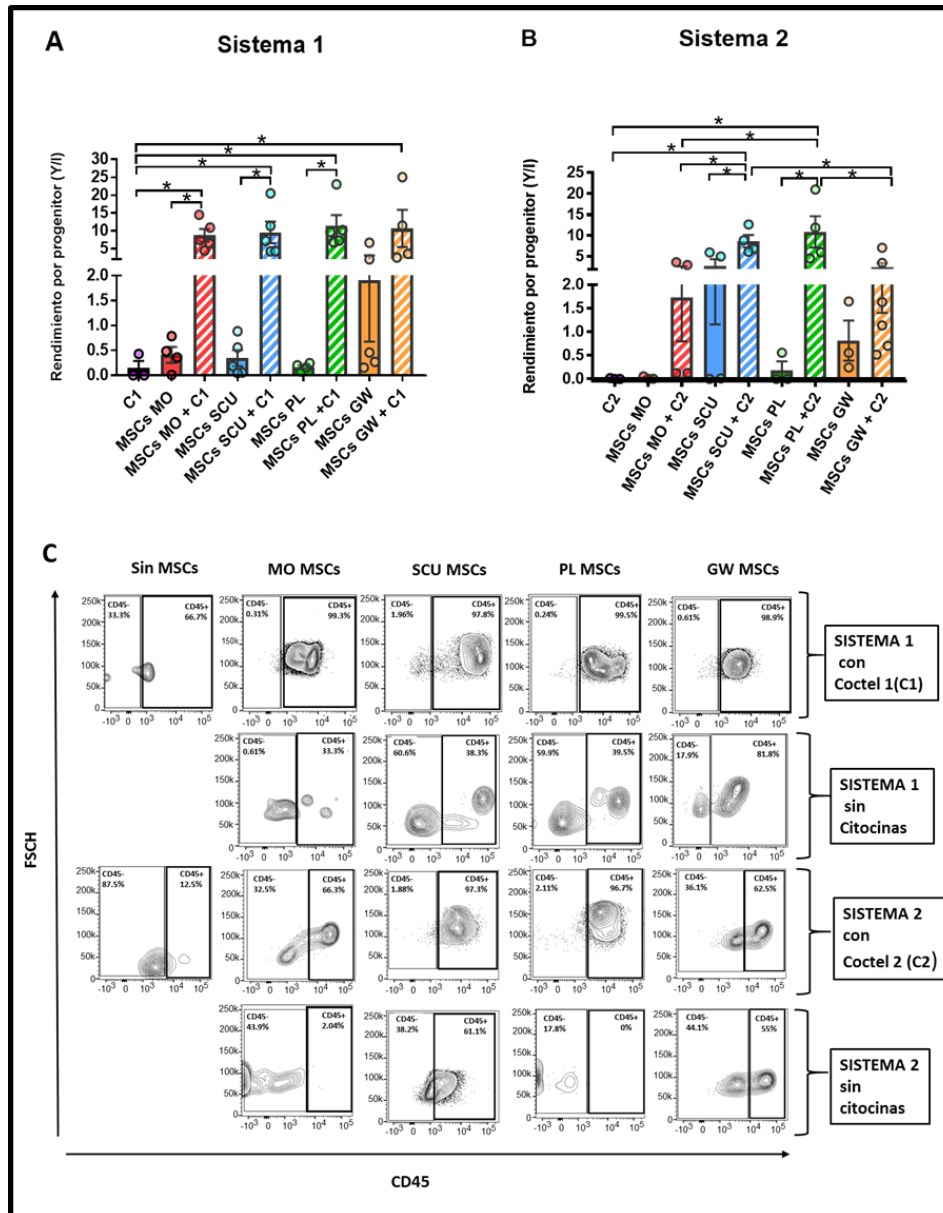


Figura 13. Presencia de células CD45+ bajo diferentes condiciones de cultivo, sistema 1 de cultivo A), sistema 2 de cultivo B). Las gráficas muestran los rendimientos por progenitor (Y/I) de células CD45+, los asteriscos indican diferencias significativas con una $p < 0.05$, las barras muestran la media \pm SEM y cada círculo representa un experimento independiente. En C) se muestran los plots representativos de los porcentajes de expresión de células CD45+.

Diferenciación dendrítico-monocítica (sistema 1 de cultivo)

Para evaluar estas subpoblaciones se utilizaron los marcadores CD16, CD11c y CD11b. Para el caso de las células DCs convencionales con fenotipo CD45⁺CD11c⁺CD11b⁺CD16⁻ (Figura 14C), no fueron generadas por las MSCs de GW en ninguna condición, sin embargo en los cocultivos con MSCs de MO+C1, MSCs de PL+C1 y MSCs de SCU+C1 si hubo generación de células dendríticas con rendimientos Y/I=1.05,

Y/I= 1.2 y PL Y/I=0.8 respectivamente; de las tres fuentes solo las MSCs de SCU generaron buenos rendimientos prácticamente en todos los experimentos. A su vez, las MSCs de MO+C1, MSCs SCU+C1 y las MSCs PL+ C1 fueron significativamente mayores en cuanto a la generación de cDCs cuando se compararon con su respectiva condición de cultivo que sólo tenía mesenquimales y con la que sólo tenían citocinas (Figura 14 A y C). Por otro lado, para la población de monocitos con fenotipo CD45⁺ CD11c⁺ CD11b⁺ CD16⁺ (Figura 14B y C), solo los cocultivos que tenían MSCs de SCU+C1 y MSCs de PL+C1 lograron generarlos, sin embargo las MSCs de PL generaron rendimientos mayores a 1, lo cual indica que hubo una expansión de monocitos (Y/I= 2.42 para las MSCs de PL+C1 contra un Y/I= 1.1 para las MSCs de SCU+C1) y ambas fuentes generaron rendimientos en la generación de monocitos significativamente mayores respecto a los cultivos que tenían MSCs de MO+ C1 y MSCs de GW+ C1, y significativamente mayores con su condición de cultivo que sólo contenía MSC y la condición que sólo tenía el coctel 1 de citocinas, los cuales tuvieron rendimientos muy bajos o no los generaron (Figura 14B y C).

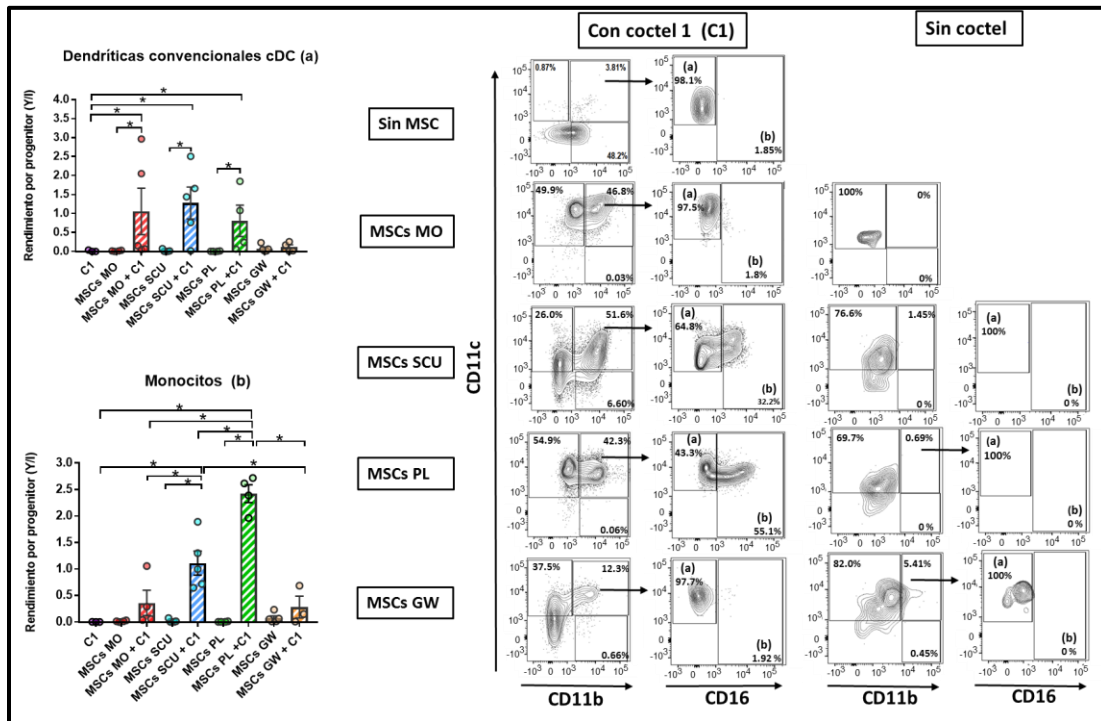


Figura 14. Diferenciación dendrítico-monocítica (sistema 1 de cultivo). Los gráficos de la izquierda muestran los rendimientos por progenitor (Y/I) de las células dendríticas (a), y de los monocitos (b) respectivamente, los asteriscos indican diferencias significativas con una $p < 0.05$, las barras muestran la media \pm SEM y cada círculo representa un experimento independiente. Del lado izquierdo se muestran los plots representativos de los porcentajes de expresión de células dendríticas convencionales (a) y monocitos CD16⁺ (b) bajo las diferentes condiciones de cultivo, tanto las dendríticas convencionales como los monocitos provenían de la población doble positiva para los marcadores CD11c y CD11b.

Diferenciación NK (sistema 1 de cultivo)

Las diferentes subpoblaciones de NKs evaluadas en este trabajo las cuales en su mayoría ya han sido reportadas en sangre periférica de humanos, se basaron en los niveles de expresión de los marcadores CD56 y CD16 y fueron las siguientes: a) CD56^{hi} CD16⁻ b) CD56^{hi} CD16^{low} c) CD56^{hi} CD16^{hi} d) CD56^{low} CD16⁻ e) CD56^{low} CD16⁺ f) CD56⁻ CD16⁺ (Figura 15). Con respecto a las subpoblaciones de NKs que expresaban altos niveles de CD56 (CD56^{hi}) (Figura 15A, gráficos superiores). Sólo para la subpoblación CD56^{hi} CD16⁻ se generaron rendimientos promedio mayores a 1 o cercanos a 1 y solo bajo la condición de cultivo que tenía ambos estímulos con casi todas las fuentes de MSCs, a excepción de las MSCs de GW+C1, a pesar de esto no se encontraron diferencias significativas al comparar entre fuentes de MSCs bajo la condición de doble estímulo, pero al comparar ésta condición doble estimulada con la condición que sólo tenía MSCs, las MSCs de MO+C1, MSCs de SCU+C1 y MSCs de PL+C1 generaron rendimientos significativamente mayores de células CD56^{hi} CD16⁻ comparada con su condición que solo tenía citocinas, no así para las MSCs de GW ya que con o sin citocinas sus rendimientos fueron muy bajos y por lo tanto fue poca la generación de células CD56^{hi} CD16⁻ (figura 15A inciso a y 15B). Para el caso de la subpoblación b) CD56^{hi} CD16^{low}, su generación fue casi nula, y sólo los cultivos con MSCs de PL+C1 que generaron un rendimiento promedio bajo $Y/I= 0.02$, fue significativamente mayor comparada con su condición que sólo tenía MSCs de PL, pero no fue significativo con respecto a aquella condición que solo tenía C1 (figura 15A inciso b y 15B). Respecto a población CD56^{hi} CD16^{hi} no se encontraron diferencias significativas en los resultados bajo ninguna condición, las MSCs de MO+C1 y las MSCs de SCU+C1 fueron las únicas fuentes que lograron generar ésta población, aunque por presentar variaciones en sus resultados, ambas generaron rendimientos promedio bajos ($Y/I= .14$, $Y/I=.09$ respectivamente) (figura 15A inciso c y 15B).

Por otro lado, para el caso de las poblaciones de NKs con baja expresión para el marcador CD56 (CD56^{low/-}) (Figura 15A gráficos inferiores), la subpoblación d) CD56^{low} CD16⁻ fue la que más se generó, sobretodo bajo la condición de cultivo que tenía ambos estímulos (MSCs+C1), donde las MSCs de fuentes neonatales PL+C1, MSCs GW+C1 y MSCs SCU+C1 se comportaron muy parecidas, con rendimientos promedio $Y/I= 4.5$, $Y/I=4.5$ y $Y/I=4.2$ respectivamente, los cuales fueron significativamente mayores con respecto a las MSCs de MO+ C1 que tuvo un rendimiento promedio de $Y/I= 1.9$. Al comparar todas las fuentes que tenían ambos estímulos MSC+C1 con su respectiva condición que sólo tenía MSCs, todas tuvieron rendimientos significativamente mayores, a excepción de las MSCs de GW+C1, que no presentaron diferencias significativas con su condición que sólo tenían MSCs, ya que en algunos de los cocultivos que solo tenían MSCs-GW sí se logró generar esta subpoblación CD56^{low}CD16⁻ con buenos rendimientos, por lo cual generó un rendimiento promedio de $Y/I=1.5$, por otro lado cuando estaban presentes ambos estímulos y todas las fuentes de MSCs tenían citocinas se generaron rendimientos

significativamente mayores comparadas con la condición que sólo tenía citocinas C1 (figura 15A inciso d y 15B). Para la población e) CD56^{low}CD16⁺ al comparar las fuentes bajo la condición que tenía los dos estímulos, los cocultivos con MSCs de SCU+C1 y MSCs de PL+C1 generaron rendimientos promedio de $Y/I=1.0$ y $Y/I=.6$, respectivamente, los cuales fueron significativamente mayores con respecto a las MSCs de MO+C1 y MSCs de GW+C1 cuyos rendimientos promedio para la generación de la población CD56^{low}CD16⁺ fueron bajos ($Y/I=.06$ y $Y/I=.1$ respectivamente), y también las MSCs de SCU+C1 y MSCs PL+C1 fueron significativamente mayores comparadas con los cocultivos que sólo tenían uno de los dos estímulos, mientras que las MSCs de MO+C1 y las MSCs de GW+C1 no tuvieron diferencias significativas con su condición que solo tenía MSCs ni con la que sólo tenía citocinas (figura 15A inciso e y 15B). Finalmente para la subpoblación f) CD56⁻CD16⁺, los cultivos con MSCs de SCU+C1 y los de PL+C1 fueron las únicas fuentes que generaron ésta subpoblación bajo la condición doble estimulada, siendo las MSCs de PL+C1 las que generaron los rendimientos promedio más altos, mayores a 1 ($Y/I=1.5$), aunque observamos variación en los resultados con las MSCs de PL+C1 y no se comportaron de manera homogénea, al comparar si había diferencia entre las fuentes de MSCs bajo la condición doble estimulada, las MSCs de PL+C1 tuvieron rendimientos significativamente mayores al compararla con las demás fuentes de MSCs, aunque los cultivos que tenían MSCs de SCU+ C1 tuvieron rendimientos muy bajos para la generación de ésta población CD56⁻CD16⁺, con (Y/I)=.16, también fueron significativamente mayores con respecto a las MSC de MO+C1 y las MSCs de GW+C1 que prácticamente no las generaron con rendimientos de (Y/I)=.019 y (Y/I)=.014 respectivamente, al comparar la condición doble estimulada con la condición que solo tenía MSCs, las MSCs de PL+C1 y las MSCs de SCU+C1 fueron significativamente mayores a su condición que solo tenían MSCs, y también ambas fueron significativamente mayores a cuando solo estaba presente el coctel 1 en los cultivos (figura 15A inciso f y 15B).

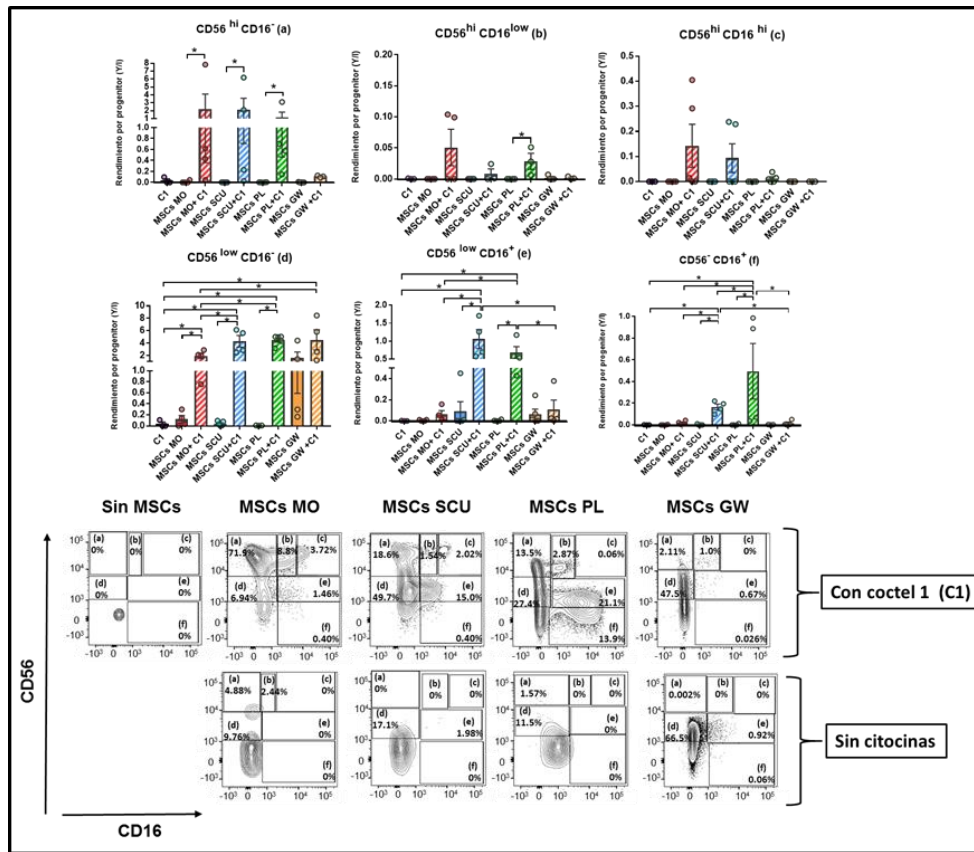


Figura 15. Diferenciación NK (condición 1 de cultivo). Las gráficas superiores muestran los rendimientos por progenitor (Y/I) de las subpoblaciones de NKs con base en la expresión de los marcadores CD56⁺ CD16⁻ : (a) CD56^{hi} CD16⁻ (b) CD56^{hi} CD16^{low} (c) CD56^{hi} CD16^{hi} (d) CD56^{low} CD16⁻ (e) CD56^{low} CD16⁺ (f) CD56^{lo} CD16⁺, los asteriscos indican diferencias significativas con una p<0.05, cada círculo representa un experimento independiente, las barras muestran la media \pm SEM. En la parte inferior se muestran los plots representativos en porcentajes de expresión para cada una de las subpoblaciones de NKs.

Diferenciación IKDC (sistema 1 de cultivo)

También fue evaluada la generación de células IKDCs bajo el sistema 1 de cultivo, las subpoblaciones de IKDCs fueron clasificadas con base en los niveles de expresión de CD56 y CD11c, analizando la presencia de las siguientes subpoblaciones a) CD56^{hi}CD11c^{low} b) CD56^{low}CD11c^{low} c) CD56^{hi}CD11c^{hi} d) CD56^{low}CD11c^{hi}. Para la población a) CD56^{hi}CD11c^{low}, solo fueron generadas con las MSCs de MO+C1, MSCs de SCU+C1 y MSCs de PL+C1 aunque debido a que se comportaron de manera muy heterogénea no fueron significativamente diferentes con las MSCs de GW+C1 cuya producción fue casi nula en todos los experimentos Y/I=0.02 (Figura 16A). A pesar de lo anterior, las MSCs de SCU+C1 fueron la fuente que generó los rendimientos por progenitor más altos con una media de Y/I=2.4. Cuando se comparó la condición (MSCs+C1) con su respectiva condición que sólo tenía MSCs, todas las fuentes

de MSCs fueron significativamente mayores ya que bajo la condición que sólo tenía MSCs no se generó esta subpoblación, no así, cuando se comparó con la condición que sólo tenía el coctel 1 a pesar de que esta condición tuvo un rendimiento promedio muy bajo $Y/I=.02$ (Ver figura 16A inciso a y 16B). La población c) $CD56^{hi}CD11c^{hi}$, prácticamente no se generó bajo ninguna condición, aunque se encontraron diferencias significativas entre los cocultivos que tenían MSCs neonatales más el coctel 1 (con rendimientos MSCs SCU+C1 $Y/I=.04$, MSCs PL+C1 $Y/I=.05$, MSCs GW+C1 $Y/I=.02$) comparadas con su respectiva condición de cultivo que sólo tenían MSCs o C1, en los cuales esta población no fue generada $Y/I=0.00$ (Ver figura 16A inciso c y 16B). La población b) $CD56^{low} CD11c^{low}$ fue la subpoblación de IKDCs que más se generó en nuestros cocultivos, generando los rendimientos por progenitor más altos bajo la condición de cultivo dónde había MSCs+C1, dónde las mejores fuentes para generar esta subpoblación fueron las MSCs provenientes de fuentes neonatales con rendimientos: $Y/I=2.6$ para las MSCs de SCU+C1, $Y/I=4$ para las MSCs de PL+C1 y $Y/I=2.8$ para las MSCs de GW+C1, es decir bajo estas tres fuentes con citocinas hubo expansión de esta subpoblación, de las cuales solo las MSCs de PL+C1 y las MSCs de SCU+C1, fueron significativamente mayores con respecto a los cultivos que tenían MSCs de MO+C1 con rendimiento de $Y/I=0.8$. Por otro lado, cuando se comparó la condición que tenía ambos estímulos (MSCs+ C1) con la condición que sólo tenía MSCs, sólo las MSCs de PL+C1 y las MSC de SCU+C1 tuvieron rendimientos significativamente mayores comparadas con sus condición que sólo tenía MSCs, en dónde su generación fue nula con rendimientos $Y/I=0.04$ y $Y/I=0.003$ respectivamente, lo mismo ocurrió cuándo se comparó la condición doble estimulada con la condición que sólo tenía el coctel 1, aunque las MSCs de GW sin citocinas generaron a esta población con un rendimiento $Y/I=0.3$, no se comparó a cuando se tenían ambos estímulos (Ver figura 16A inciso b y 16B). Por último, para la población de IKDCs con fenotipo d) $CD56^{low} CD11c^{hi}$, todos los cultivos que tenían ambos estímulos MSCs+C1, generaron esta subpoblación y todas las fuentes de MSCs+C1 fueron significativamente mayores con respecto a aquellas que sólo tenían MSCs o coctel 1, pero los cultivos con MSCs de PL+C1 fueron las únicas que fueron capaces de expandir esta subpoblación, con un rendimiento promedio $Y/I=3.1$ lo que fue significativamente mayor con respecto a las demás fuentes bajo la misma condición MSCs +C1 (Ver figura 16A inciso d y 16B)

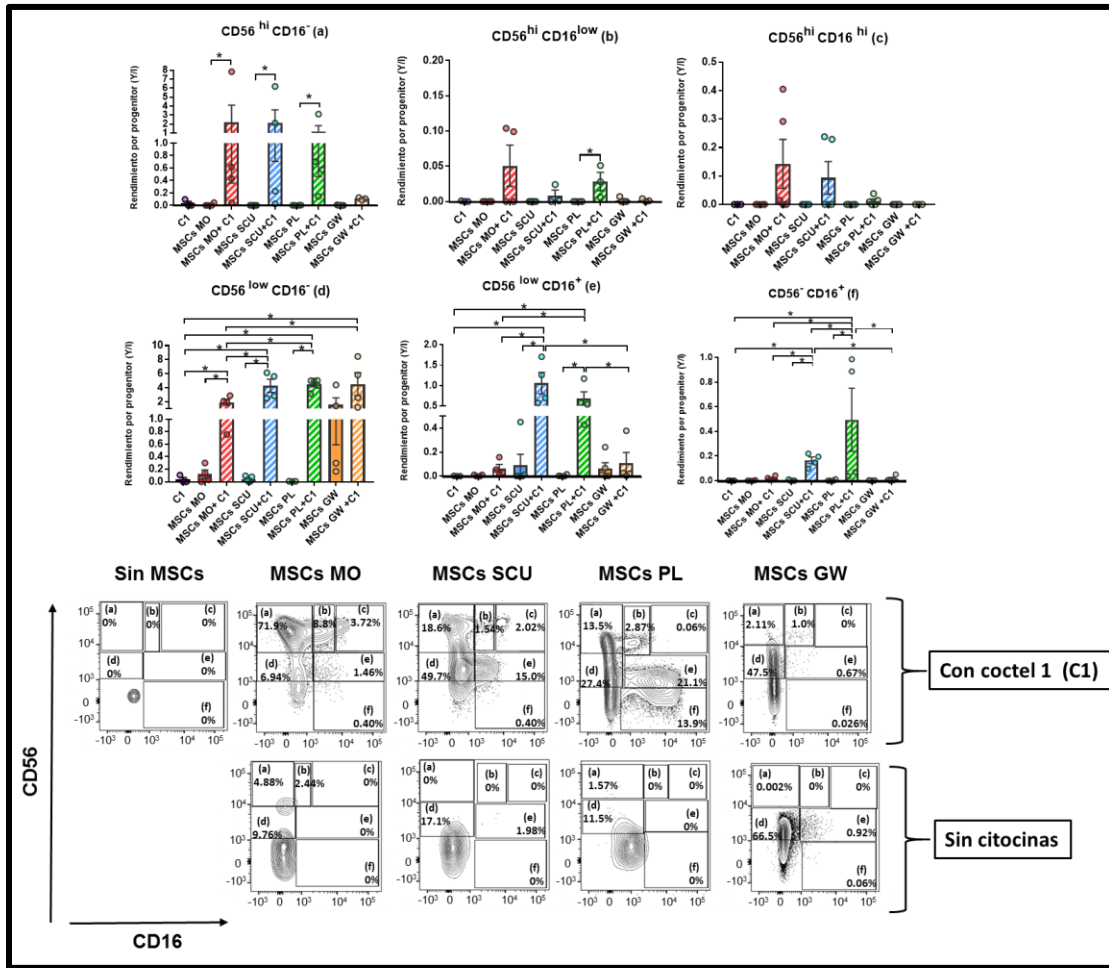


Figura 16. Diferenciación IKDC (sistema 1 de cultivo). Las gráficas superiores muestran los rendimientos por progenitor (Y/I) de las subpoblaciones de IKDCs con base en la expresión de los marcadores CD56+ CD11c: a) CD56^{hi} CD11c^{low} b) CD56^{low} CD11c^{low} c) CD56^{hi} CD11c^{hi} d) CD56^{low} CD11c^{low}, los asteriscos indican diferencias significativas con una p<0,05, cada círculo es un experimento independiente; las barras muestran la media ± SEM. En la parte inferior se muestran los plots representativos en porcentaje de expresión para cada una de las subpoblaciones de IKDCs, cada letra corresponde a su respectiva subpoblación representada en las gráficas.

Diferenciación linfoide B (sistema 2 de cultivo)

Para evaluar la diferenciación de las células B se manejó el sistema de cultivo 2 y las poblaciones a evaluar fueron las siguientes: a) CD45+CD34+CD19- HPCs b) CD45+ CD34+ CD19+ progenitores de células B (pro B) y c) CD45+ CD34- CD19+ que engloba a las poblaciones de precursores B, células B inmaduras (iB) y células B maduras (mB) denominada como (Pre B/iBmB) (Figura 17). Con respecto a la población más primitiva CD34+CD45+CD19- de HSC/HPC solo fueron encontradas en los cocultivos con MSCs de SCU en presencia del coctel 2 y sin citocinas, sin embargo, solo se encontraron diferencias significativas cuando se compararon los rendimientos generados con la condición MSCs de SCU+C2 y la

condición que solo tenía el coctel 2 (Figura 17A y B inciso a). Para el caso de la población Pro B ocurrió algo similar, a pesar de que solo los cultivos que tenían MSCs de MO+C2 generaron un rendimiento promedio alto ($Y/I=1.3$), los valores obtenidos fueron variables y no se encontraron diferencias significativas con respecto a las demás condiciones de cultivo (Ver figura 17A y B inciso b). Por último, para la población Pre B/iB-mB, los cultivos que tenían MSCs de PL+C2 y MSCs de SCU+C2 fueron las únicas fuentes que expandieron a esta subpoblación, siendo las MSCs de SCU+C2 la fuente que generó los rendimientos más altos ($Y/I=1.8$ y $Y/I= 3.8$ respectivamente), siendo significativamente mayores a las MSCs de PL+C2. A su vez ambas fuentes bajo esta condición fueron significativamente mayores con respecto a las demás fuentes bajo la condición doble estimulada y comparadas con aquella condición que solo tenía uno de los estímulos MSCs o el coctel 2 (Ver figura 17A y B inciso c).

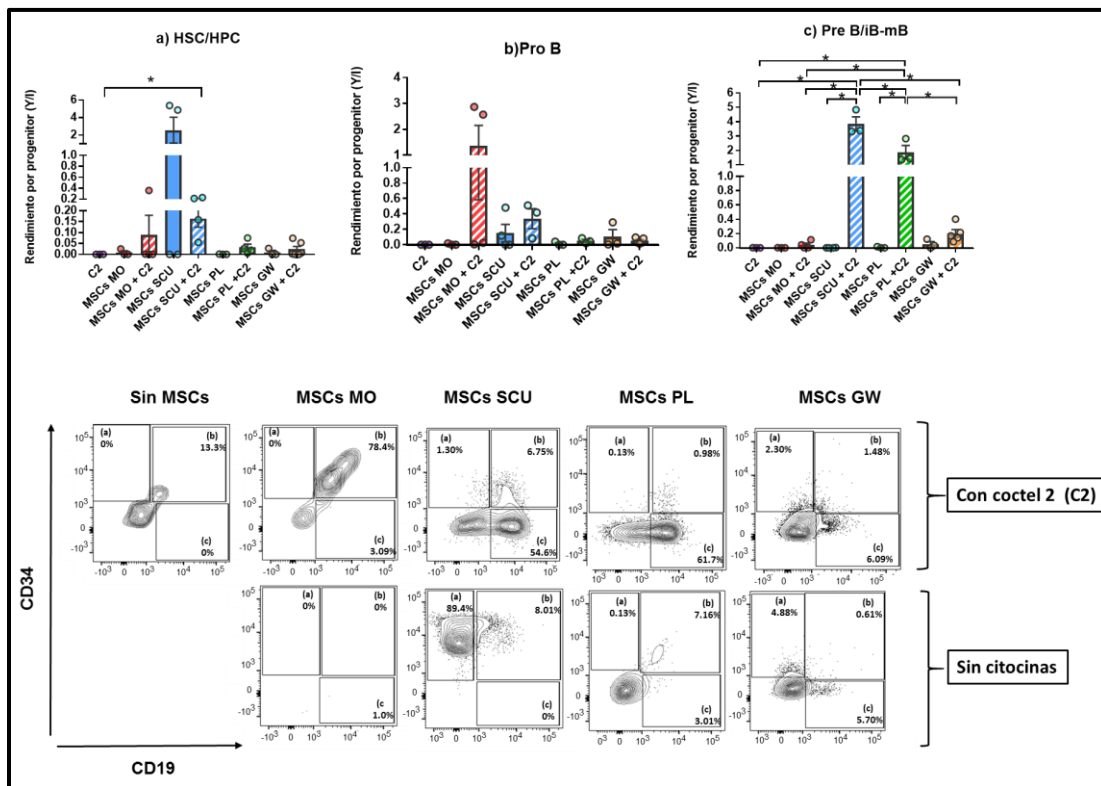


Figura 17. Diferenciación Linfoide B (condición 2 de cultivo). Las gráficas superiores muestran los rendimientos por progenitor (Y/I) de las subpoblaciones de linfocitos B con base en la expresión de los marcadores CD45 CD34 y CD19: (a) HSCs/HPCs con fenotipo CD34+ CD45+ CD19-; (b) proB con fenotipo CD34+ CD45+ CD19+ y (c) preB/iB-mB con fenotipo CD34- CD45+ CD19+; los asteriscos indican diferencias significativas con una $p<0.05$; cada círculo es un experimento independiente; las barras muestran la media \pm SEM. En la parte inferior se muestran los plots representativos en porcentaje de expresión para cada una de las subpoblaciones evaluadas, cada letra corresponde a su respectiva subpoblación representada en las gráficas.

X DISCUSIÓN:

Muy poco se sabe acerca de la linfopoyesis en humanos, y mucho de lo que se ha dilucidado es mediante el uso de modelos ratón humanizados y cocultivos con células hematopoyéticas sobre células estromales en presencia o ausencia de citocinas, de las cuales las células más utilizadas son las líneas celulares estromales de ratón OP9 y MS5 (Nishihara et al, 1998). No obstante, ello, hay pocos estudios en dónde se utilicen células estromales humanas como soporte para evaluar linfopoyesis y hay solo algunos trabajos que han evaluado el papel de las MSCs de MO de humanos en la linfopoyesis de células B (Ichii M. et al, 2008 y 2010; Yoshioka, et al 2014), así como en células estromales de MO fetal (Dittel & LeBien, 1995; Prieyl & LeBien, 1996, Kurosaka et al, 1999). Mientras que en otros trabajos únicamente evalúan precursores linfoides tempranos (Nakamori et al, 2012). Muy poco se sabe del papel de las MSCs de MO con respecto al soporte de otros linajes linfoides y sus diferentes subpoblaciones como las células NKs. De igual manera no se han realizado trabajos en donde se evalúen MSCs provenientes de fuentes alternativas a la MO como las neonatales, cuya obtención es accesible debido a que se obtienen de tejidos considerados como desecho biológico y cuya obtención no implica métodos invasivos como en el caso de la obtención de aspirados de MO. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue generar nuevos sistemas de cocultivos para evaluar linfopoyesis humana de diversos linajes linfoides, además del linaje B, utilizando fuentes de MSCs de tejidos neonatales (SCU, PL y GW) como alternativa a la MO.

Con respecto a la caracterización de las MSCs de las fuentes neonatales, observamos aspectos biológicos similares a los obtenidos previamente para SCU y PL (Montesinos et al, 2009). De igual manera las MSCs de GW en todas las muestras evaluadas, presentaron morfología fibroblastoíde, capacidad de diferenciación adipogénica, osteogénica, condrogénica e inmunofenotipo característico de las MSCs, lo cual ya ha sido reportado por diversos autores (Kim D. 2013; Weiss et al, 2006; Lu et al, 2006). Las MSCs de GW, así como las demás fuentes de MSCs neonatales formaron menor número de adipocitos y sus vacuolas fueron más pequeñas comparadas con las MSCs de MO, siendo las MSCs de SCU las que menos adipocitos generaron, lo cual ya ha sido reportado por otros autores (Prasanna et al, 2010; Montesinos et al, 2009; Kern et al, 2006). Con respecto a la diferenciación osteogénica no encontramos diferencias entre las fuentes de MSCs de fuentes neonatales y las MSCs de MO, lo que concuerda con lo que ya se ha reportado que las MSCs de fuentes neonatales como PL, SCU y CU presentan la misma capacidad de diferenciación osteogénica que las MSCs de MO (Parolini et al 2008, JJ Montesinos 2009, Lee ok et al, 2004). Tampoco observamos diferencias con respecto a la diferenciación condrogénica con respecto a las MSCs de MO, sin embargo, hay estudios que han sugerido que las MSCs de MO muestran mejor capacidad de diferenciación condrogénica comparadas con las MSCs de PL (Bernardo et al, 2007),

mientras que en otro estudio se observó que las MSCs de SCU tienen un fuerte potencial osteogénico comparado con las MSCs derivadas de MO, lo cual indica diferencias funcionales entre estas fuentes (Chang et al, 2006).

Es importante mencionar que a pesar de no obtener porcentajes de enriquecimiento elevados para la población CD34+CD38-Lin- en las muestras de SCU utilizadas para nuestros experimentos (con un promedio del porcentaje de enriquecimiento del 47%), al evaluar la presencia de subpoblaciones linfoides iniciales, en las muestras ya enriquecidas de SCU, no se encontraron o era mínima la presencia de subpoblaciones de linfocitos, sin embargo, si se encontró la presencia de poblaciones mieloides CD11c+, con porcentajes de expresión del 25% para la subpoblación CD11c+ CD11b+ CD16- y del 28% para la población CD11c+ CD11b- (Figura 11). Estos porcentajes de expresión concuerdan con los reportados por Borràs et al 2001, en el que encontró que DC mieloides CD11c+ se encuentran en muestras de SCU con una expresión aproximadamente del 25% y que además son HLADR++ CD133+, aunque no evalúan presencia del marcador CD11b en este trabajo (Borràs et al, 2001). Por otro lado, hay estudios que observan una subpoblación de DCs mieloides en sangre periférica con fenotipo CD1c+ CD11b+ CD11c+ en humanos, la cual reportan como cCDs tipo 2 aunque esta población no ha sido reportada como tal en SCU (Collin & Bigley, 2017) pero será discutida más adelante.

Proliferación de células Hematopoyéticas totales

Se sabe que la proliferación y expansión de células hematopoyéticas *in vitro*, depende de muchas variables, entre ellas la presencia de células estromales y la combinación de citocinas (Poloni et al, 1997; Douay 2001; Mayani 2017). En nuestros cultivos sólo bajo la condición que tenía ambos estímulos, tanto citocinas como MSCs (MSCs+C1), se incrementó hasta 13 veces el número de células hematopoyéticas totales; sin embargo, cuando sólo se tenían uno de los estímulos, el número de células hematopoyéticas disminuyó significativamente y sólo en algunos experimentos en los que había MSCs de GW ó de SCU sin citocinas, se logró aumentar el número de células totales, pero nunca en igual número que teniendo ambos estímulos, lo cual concuerda con lo que ya ha sido ampliamente reportado, que las mesenquimales de MO, PL, SCU y GW en combinación con citocinas inducen la proliferación de células hematopoyéticas (Flores-Guzmán et al, 2009; Fajardo-Orduña et al, 2015; Fajardo-Orduña et al, 2016; Lo lacono et al, 2017).

Diferenciación de células dendrítico-monocítica

Aunque nuestro principal objetivo para este trabajo fue evaluar soporte linfopoyético, también se evaluaron algunas subpoblaciones de origen mieloides, cómo, la monocítica y células dendríticas convencionales, para evaluar si había alguna tendencia en cuánto a la diferenciación mieloides sobre la

linfoide por parte de alguna fuente de MSCs ya que nuestros cocultivos además de tener citocinas que participan en la linfopoyesis principalmente, también participan en la formación de ambos linajes como SCF y flt3-L (Mayani et al, 2007; Shortman et al, 2013; Pelayo et al, 2017; Merad et al, 2013).

Se han reportado dos tipos de células dendríticas convencionales en humanos definidas como CD141+ y CD1c+ (MacDonald et al, 2002; Ziegler-Heitbrock et al, 2010) y las derivadas de los monocitos (mo-DC). Las células dendríticas CD1c+ coexpresan los marcadores mieloides CD11c y CD11b y se han clasificado como células dendríticas mieloides tipo2 (cDC2), a pesar de que es difícil distinguir entre cDC2, los monocitos y las dendríticas derivadas de monocitos (mo-DC) debido a que comparten muchos marcadores entre ellos el CD11c, recientemente se ha utilizado la combinación de diversos marcadores, así como su nivel de expresión para poderlas distinguir mediante citometría de flujo. El marcador CD14 ha sido utilizado para distinguir a las mo-DCs y el CD16 para diferenciarlas de los monocitos no clásicos que además de expresar CD16 son CD11b^{low} y CD11c^{hi}, mientras que las moDCs son CD11c⁺ CD14⁺ pero no se reportan como CD11b⁺ (Collin & Bigley, 2017), con base en esto y en nuestros marcadores evaluados, podemos decir que las subpoblaciones mieloides encontradas en nuestros cultivos muy probablemente se tratan de células dendríticas comunes de tipo2 cDC2 con fenotipo CD11c⁺CD11b⁺CD16⁻ y de monocitos no clásicos.

Existen trabajos que han evaluado el efecto que tienen las MSCs en la diferenciación de células dendríticas en específico de las mo-DCs y se ha reportado que las MSCs de MO y de CU inhiben la diferenciación y maduración de monocitos a dendríticas (Jiang et al, 2005), así como la diferenciación de HPCs CD34⁺ en dendríticas inmaduras y maduras (Nauta et al, 2006; YP Li et al, 2008). Este efecto negativo coincide con lo observado con MSCs de GW, ya que los cocultivos con ésta fuente los rendimientos de cDC2 fueron muy bajos, sin embargo con MSCs de MO, los resultados fueron muy heterogéneos, y con base en éste efecto negativo reportado con MSCs de MO sobre la diferenciación de HPCs a dendríticas (Nauta et al, 2006; YP Li et al, 2008), creemos que en los dos experimentos en dónde se observó un alto rendimiento de cDC2 (ver figura 14) fue debido a la proliferación o mantenimiento de las células dendríticas cDC2 que ya se contenían de manera basal las muestras de SCU utilizadas en esos experimentos, más que a una diferenciación a partir de HPCs. Con respecto a las MSCs de PL y SCU, al no haber reportes de efectos negativos de éstas fuentes para generar DCs a partir de HPCs, y a que nosotros observamos generación de cDC2 en nuestros cocultivos con citocinas y estas fuentes, sobre todo con MSCs de SCU, no podemos descartar la idea de que éstas dos fuentes, sí puedan mantener y generar cDC2 a partir de HPCs (ver Figura 14). Por otro lado, la población CD11c⁺ CD11b⁺ CD16⁺ de monocitos no clásicos, que se encontraban presentes en un 1% a pesar de que las muestras de SCU tenían bajos porcentajes de enriquecimiento CD34⁺CD38⁻Lin⁺ (ver Figura 11), en cultivo sí fueron observadas con altos niveles de expresión bajo la condición con MSCs de SCU+C1 y de PL+C1. Con las

MSCs de SCU+C1 se obtuvieron rendimientos de $Y/I= 1.1$, lo que indica que el 100% de los progenitores comprometidos a este linaje se diferenciaron, sin embargo, con las MSCs de PL+C1 los rendimientos fueron significativamente mayores con $Y/I= 2.4$, lo que indica que además de tener una diferenciación del 100% de los progenitores hubo una expansión de dicha población. Se ha reportado que esta subpoblación de monocitos no clásicos presenta propiedades inflamatorias y en diversas patologías inflamatorias se incrementa, por lo tanto, se considera que la expansión de monocitos CD16+ determina una condición inflamatoria (Mukherjee R et al, 2015). Debido a lo anterior, podemos decir que en nuestros cocultivos con MSCs de PL+C1 y de SCU+C1, muy probablemente semejaban a un ambiente proinflamatorio que favoreció la expansión y generación de éstas células, lo que no se presentó en aquellos con MSCs de MO+C1 y de GW+C1.

Diferenciación de células IKDCs

Actualmente no se ha reportado la presencia de ésta subpoblación en humanos y sólo ha sido reportada en ratón, existen trabajos en donde evalúan su generación *in vitro* con fuentes estromales murinas MS5 (Ramírez-Ramírez 2016), por esta razón nosotros evaluamos si había generación de IKDCs en cultivo con MSCs de MO y MSCs de fuentes neonatales, además evaluamos diferentes subpoblaciones de IKDCs basados en la intensidad de los marcadores CD11c y CD56. Decidimos evaluar subpoblaciones de IKDCs, dado que de inicio observamos subpoblaciones hi y low para ambos marcadores. Es importante mencionar que esta población tampoco se encontraba de manera basal en nuestras muestras de SCU a pesar de tener bajos enriquecimientos y fueron generadas únicamente bajo la condición que tenían ambos estímulos MSCs+C1. Observamos que las subpoblaciones de IKDCs CD56^{hi}, prácticamente no fueron generadas por ninguna de las fuentes de MSCs+C1, contrario a las subpoblaciones de IKDCs CD56^{low} que fueron generadas en dicha condición a excepción de aquellas con MSCs de MO que presentaron un comportamiento heterogéneo. Respecto a las subpoblaciones de IKDCs CD56^{low}, las CD56^{low} CD11c^{low} fueron las que más se generaron en nuestros cultivos bajo la condición MSCs+C1, siendo las MSCs de MO+C1 las que generaron los menores rendimientos comparados con las MSCs de fuentes neonatales. Las IKDCs son una subpoblación que no ha sido formalmente descrita en humanos, se sabe que la expresión de CD11c en células de linaje NK es inducida por combinación de IL-15 y de citocinas inflamatorias (Aranami T. et al, 2006). El hecho de que las MSCs de MO+C1 fueran las que menos produjeran las IKDCs a pesar de que los cocultivos contenían IL-15, nos indica que la producción de citocinas pro inflamatorias por parte de las MSCs de MO no es suficiente para expandirlas. Recientemente la búsqueda de condiciones experimentales para la expansión de este tipo de células ha sido de gran interés, ya que es un subtipo celular que participa en una variedad de mecanismos, cómo la producción de INF γ , citotoxicidad hacia células tumorales y la capacidad para inducir la proliferación de

linfocitos $\gamma\delta$ que funciona como componente coadyuvante en la respuesta inmune innata contra células tumorales ó células infectadas con virus. (Ramírez -Ramírez et al, 2016). En nuestros cocultivos aunque las tres fuentes de MSCs de neonatales en presencia del coctel 1 fueron buenas para genera a las IKDC $CD56^{low}$, de las tres las MSCs de PL+C1 fueron las mejores para expandir a estas células teniendo los rendimientos por progenitor más altos, considerando a esta fuente de MSCs la mejor alternativa para la generación de células IKDC y su posible uso en inmunoterapia.

Diferenciación de células NK

En nuestros cultivos las subpoblaciones de NKs $CD56^{hi}$ no fueron generadas bajo las condiciones en las que sólo había citocinas o MSCs, únicamente con la condición MSCs+C1 a excepción de las MSCs de GW+C1. las demás fuentes de MSCs bajo ésta condición generó al menos una de las subpoblaciones de NKs $CD56^{hi}$ y de esta subpoblaciones la que generó los mayores rendimientos fueron las NKs con fenotipo $CD56^{hi} CD16^{-}$, cuya principal función es la de producir citocinas y es considerada cómo precursora de la subpoblación de NKs $CD56^{low} CD16^{+}$ de mayor capacidad citotóxica y ontogénicamente en un estadio más avanzados de maduración (Poli et al, 2009; Amand et al, 2017; Ramírez-Ramírez et al, 2016; Abel et al, 2018). Con respecto a esta última subpoblación, en un trabajo reciente, se subdividió a las NKs $CD56^{low} CD16^{+}$ en dos subpoblaciones diferentes, una nueva subpoblación identificada con el fenotipo $CD56^{low} CD16^{low}$, la cual presenta características más inmaduras, aunque con capacidad de degranulación e independiente a la subpoblación $CD56^{low} CD16^{hi}$, que tiene características de mayor capacidad citotóxica y que se encuentra en un estadio propiamente maduro (Amand et al, 2017). No obstante, en este trabajo no hicimos esta separación y se consideró solo como una población $CD56^{low} CD16^{+}$, al revisar los gráficos de citometría encontramos que la mayoría corresponden a una población $CD56^{low} CD16^{low}$ que fue favorecida únicamente bajo la condición con MSC de PL+C1 y SCU+C1 y con rendimientos significativamente mayores comparadas con los cultivos con MSCs de MO+C1 y GW+C1, aunque las de SCU+C1 fueron las que generaron rendimientos de 1, lo cual nos dice que el 100% de los progenitores lograron diferenciarse. Se ha publicado que esta población podría ser una población intermedia previa a la población $CD56^{low} CD16^{hi}$ y que está en vías de perder el marcador CD16 bajo activación dando lugar a la población $CD56^{low} CD16^{-}$, la cual también presenta capacidad de degranulación incluso mayor que las NKs $CD56^{low} CD16^{low}$ y las $CD56^{low} CD16^{hi}$ cuándo estan en presencia de células K562 (Amand M. et al, 2017).

Con respecto a la subpoblación de NKs $CD56^{low} CD16^{-}$, fue la que más se generó en nuestros cocultivos bajo la condición con MSCs+C1, sin embargo, sería importante evaluar funcionalidad de las NKs para asegurar que sea la subpoblación inmadura con función de degranulación descrita por Amand M. et al, 2017, ya que también podrían tratarse de IKDCs $CD56^{low} CD11c^{+}$, ya que estas subpoblaciones

de NKs evaluadas no provenían de la población CD11c⁻. Es importante mencionar que al comparar los rendimientos de las subpoblaciones de NKs CD56^{low} CD16⁻ y las poblaciones CD56^{low} CD11c^{low}, solo las MSCs de PL+C1 coinciden en los rendimientos para ambas subpoblaciones (Y/I=4.5 Y/I=4.02, respectivamente) y probablemente en este caso sí podría tratarse de la misma subpoblación, sin embargo para las demás condiciones con MSCs+C1 los rendimientos no fueron parecidos y difieren mucho, lo cual nos indica que a excepción de las MSCs de PL+C1, las subpoblaciones CD56^{low}CD16⁻ generadas en estas condiciones de MSC+C1 muy probablemente sean NKs inmaduras. También se ha reportado otra subpoblación de NKs con fenotipo CD16⁺ CD56⁻, las cuales no son funcionales y son frecuentemente observadas en pacientes con VIH, se caracterizan por la alta expresión de receptores NKs inhibitorios y una baja expresión de receptores citotóxicos naturales, así como una baja producción de citocinas (Amand M. et al, 2017), la cual en nuestros cocultivos con MSCs de SCU+C1 y de PL+C1 fue generada con rendimientos de (Y/I=.2) (Y/I=.5).

Se sabe que la generación de células NKs a partir de HPCs requiere de IL-15, Flt3-L, SCF e IL-7 (Colucci et al, 2003; Abel et al, 2018), además se ha demostrado la importancia en MO del nicho reticular abundante en CXCL12 secretado por células CAR, esta quimiocina estimula a los progenitores NKP o NKs inmaduros a un estado funcionalmente maduro vía CXCR4 (Abel et al, 2018) y más aún la IL-15 es altamente producida por las células CAR (Ramírez-Ramírez et al, 2016), en consecuencia la interacción de células estromales y citocinas para una correcta diferenciación de células NKs es evidente, lo cual explica que en nuestros cocultivos la mejor condición para producir las subpoblaciones de NKs haya sido en presencia de MSCs+C1.

Por su parte, también se ha publicado que las células MSCs de MO, así como las MSCs de PL, SCU y GW secretan moléculas que participan en la diferenciación de NKs, cómo CXCL12, FLT3-L, SCF e incluso IL-15 en MSCs de MO (Balandrán et al, 2017). A pesar de que todas las fuentes de MSCs secretan factores que promueven la maduración y generación de células NKs, en este estudio observamos que la expansión de NKs CD56^{low} fue mejor con las MSCs provenientes de fuentes neonatales, lo cual indica que las MSCs de fuentes neonatales podrían secretar otros factores además de los mencionados, que favorecen la expansión de células NK. Se han identificado diferentes nichos que regulan la biología de las NKs, dentro de ellos están los nichos de estrés o inflamatorios, tumorales y los del embarazo, los cuales son controlados por células no hematopoyéticas que proveen señales que desencadenan la producción de moléculas de adhesión, quimiocinas y citocinas/factores de crecimiento (Nagasawa 2015, Purizaca et al, 2012, Noda et al, 2011). Estos antecedentes aunados a nuestros resultados obtenidos con IKDCs y monocitos CD16⁺, cuya expansión fue mayor en presencia de MSCs de fuentes neonatales, las cuales están relacionadas con ambientes proinflamatorios (Aranami et al, 2006; Ramírez-Ramírez et al, 2016;

Mukherjee et al, 2015), nos sugiere que dichas MSCs pudieran estar secretando una mayor cantidad de citocinas proinflamatorias comparadas con las MSCs de MO.

Estudios recientes han señalado que durante las últimas etapas del embarazo y durante el parto, hay una infiltración de macrófagos y neutrófilos al miometrio y un aumento de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-8 e IL-6 en los tejidos materno-fetales, así como también cambios transcripcionales en la decidua, incluyendo un aumento en la vía de señalización de TNF y activación de NF-Kb, este ambiente proinflamatorio promueve la contracción del útero, expulsión del bebé y un rechazo a la placenta (Mor et al, 2011; Yockey & Iwasaki, 2018). Además, en otro estudio se demostró la expresión del RNAm de citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-1 β en tejido corio-decidual y de IL-18 e IL-1 β en el amnios (Osman et al, 2003). También se ha reportado la presencia de citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-8 y niveles de citocinas antiinflamatorias como IL-10 en muestras de SCU, tomadas al término de labor de parto en pacientes que no presentan algún proceso infeccioso, las cuáles muy probablemente provienen de los tejidos placentarios y se infiltran en la circulación umbilico/fetal (Chan et al, 2013).

Por su parte se ha demostrado que las MSCs de CU son diferentes a las de MO en el perfil de expresión de citocinas (Weiss et al, 2006) y se encontró que las MSCs de CU secretan niveles significativamente mayores de IL-1 α , IL-6 e IL-8 comparadas con las MSCs de MO que producen más VEGF y SDF1 β (Friedman et al, 2007). Con estos antecedentes aunados a nuestros resultados, podemos decir que las MSCs de tejidos neonatales provienen de microambientes proinflamatorios, los cuales confieren a estas células la capacidad de secretar citocinas inflamatorias, contribuyendo a dicho microambiente, esta cualidad les confiere la capacidad de influir en la decisión y destino final de las HPCs hacia linajes linfoides específicos. Por último, aunque las MSCs de GW fueron las únicas que aún sin tener citocinas generaron células NKs CD56^{low} CD16- e IKDCs CD56^{low} CD11c^{low}, es necesario incrementar el número de muestras de GW a evaluar, para determinar ello de manera fehaciente.

Diferenciación de células linfoides B

Dentro de la ontogenia del sistema inmune, las células de la respuesta inmune adaptativa son las últimas en diferenciarse, hay citocinas como IL-7, SCF, FLT-3L y CXCL12 que son secretadas por los nichos linfoides dentro de la MO (Pelayo et al, 2019) y que son importantes tanto para la diferenciación de linaje NK como de linaje B. En este estudio evitamos favorecer la formación del linaje NK sobre el linfoide B, utilizando un sistema de cultivo diferente en ausencia de IL-15 y con duración de 5 semanas para favorecer la diferenciación de linfocitos B (sistema 2). Con este sistema de cultivo, únicamente las MSCs de PL+C2 y las MSCs de SCU+C2 fueron capaces de generar altos rendimientos para la población de linfocitos B en estadios de preB/iB-Mb, una población que se caracteriza por la pérdida de CD34, pero que mantiene la expresión del marcador CD19, y que fue expandida en presencia de MSCs de SCU+C2.

No obstante, aunque las MSCs de GW+C2 también fueron capaces de generar esta población, sus rendimientos fueron muy bajos, mientras que las MSCs de MO+C2 en presencia de citocinas no las generaron, pero parecen mantener a las células hematopoyéticas en estadios más tempranos de diferenciación linfocítica B, logrando expandir progenitores de linfocitos B (ProB) aunque debido a que esto no se observó en todos los experimentos y los resultados fueron muy heterogéneos no podríamos concluir si las MSCs de MO bajo nuestras condiciones de cultivo son una buena fuente para mantener la linfopoyesis B, por otro lado aunque las MSCs de SCU+C2 generaron principalmente subpoblaciones linfocíticas B en estadios más tardíos de maduración también seguía manteniendo una baja proporción de células con fenotipos más inmaduros CD34+CD19+ (pro B), y una mínima generación de poblaciones aún más primitivas con fenotipo CD45+ CD34+ CD19-, aunque esta población primitiva se detectó en algunos experimentos con MSCs de SCU sin C2, estos resultados indican que las MSCs de SCU tienen la capacidad de favorecer la maduración de linfocitos B, pero también son capaces de mantener fenotipos hematopoyéticos inmaduros.

Con respecto al comportamiento retardado o negativo en la maduración de linfocitos B por parte de las MSCs de MO observada bajo este sistema de cultivo al solo generan células en estadio proB, podría estar relacionado con dos factores que ya han sido reportados con MSCs de MO, uno es la presencia de IL-7 ó a la presencia de componentes de la familia del TGF β como la activina A, ambos reguladores negativos en el desarrollo de linfocitos B ya que disminuyen la producción de células CD10⁺ y CD19⁺ (Ichii M. et al, 2008), en este mismo trabajo también se reporta la presencia del TGF β 1 y activina A en el sobrenadante de cocultivos para diferenciación linfocítica B a partir de células HPCs CD34+ en presencia de MSCs de MO. El hecho de que las MSCs de GW tampoco pudieran generar subpoblaciones de linfocitos B podría estar relacionado también con la presencia de TGF- β , ya que se ha reportado que las MSCs de GW secretan altas cantidades de TGF β en comparación con las MSCs de MO (Kim et al, 2013).

Por otra parte, la importancia y la participación de IL-7 en la diferenciación de linfocitos B es controversial (Ichii M. et al, 2014), y aunque se ha visto que es una citocina importante para el desarrollo temprano de la linfopoyesis B en humanos, no pareciera ser esencial en estadios tardíos de maduración ya que se ha observado que hay una disminución significativa de células B de estadios tardíos de maduración como lo son las células B IgM⁺ cuando hay presencia de SCF, FLT3-L e IL-7 (coctel de citocinas utilizadas en este sistema de cultivo), en comparación a cuando solo se añade SCF y FLT3-L en cocultivos con MSCs de MO, incluso se observó que en los cultivos con MSCs de MO y el coctel de citocinas que contenía IL-7 la transición a células B inmaduras IgM⁺ ocurre hasta la sexta semana (Ichii M. et al, 2007). Aunque con MSCs de GW no se ha reportado capacidad de soporte linfopoyético de células B, sería importante evaluar su capacidad de soporte linfopoyético de células B sin la presencia de IL-7 para saber si esta citocina pudiera ser la causa de su efecto negativo. Con todos estos resultados

podemos concluir que las las MSCs de SCU+C2 y de PL+C2, no se ven afectadas por la presencia de IL-7 en nuestro sistema de cultivo, como fue observado con MSCs de MO+C2, y posiblemente con las MSCs de GW+C2, por lo tanto, el coctel de citocinas como la fuente de MSCs es importante para la diferenciación linfoide B.

XI CONCLUSIONES:

Siendo éste el primer trabajo en reportar la capacidad de soporte linfopoyético de las MSCs de fuentes neonatales de PL SCU y GW en comparación con las MSCs de MO de tejido adulto, pudimos comprobar que bajo nuestro sistema 1 de cocultivo las MSCs de fuentes neonatales fueron las únicas en expandir a las IKDCs, mientras que en el caso de las NKs las MSCs de PL y SCU en presencia de citocinas generaron a las NK CD56low CD16+, se ha reportado que ambas poblaciones presentan propiedades citotóxicas y antitumorales, además las MSCs de PL y las MSCs de SCU en presencia de citocinas generaron monocitos no clásicos CD16+ reportada con función presentadora de antígeno, fagocítica e inflamatoria, por otro lado también bajo el sistema 2 de cultivo las MSCs de PL y las MSCs de SCU en presencia de citocinas lograron soportar la diferenciación hacia células B en estaíos de maduración tardíos con fenotipon CD45+CD34+CD19+. Con todos estos resultados podemos concluir que las MSCs de fuentes neonatales especialmente las MSCs de PL Y SCU soportan la linfopoyesis y por lo tanto las proponemos como una fuente alternativa a las MSCs de MO ya que pueden generar y expandir células de linaje linfoide y mieloide con características importantes que pudieran ser beneficiosas para el paciente trasplantado, como un respuesta injerto contra tumor en el caso de pacientes con leucemias, además podrían promover una rápida recuperación y activación del sistema inmunológico para para controlar infecciones por virus y bacterias, confiriéndoles también un posible uso en inmunoterapia.

XII PERSPECTIVAS

Para comprobar que las subpoblaciones de NKs, IKDCs y de monocitos no clásicos CD16+ se expanden por efecto de un microambiente proinflamatorio por efecto de las MSCs, sería necesario medir presencia de citocinas proinflamatorias en los sobrenadantes de los cocultivos bajo todas las condiciones de cultivo con MSCs.

-Evaluar la diferenciación de linfocitos B sin añadir IL-7 al coctel de citocinas del sistema 2, y medir la presencia de TGF β y activina A en los sobrenadantes de los cocultivos con MSCs de GW y MSCs de MO para poder comprobar el efecto negativo que pudieran estar provocando en los cocultivos con estas fuentes de MSCs.

-Sería interesante evaluar la diferenciación linfoide bajo una condición sin contacto en ambos sistemas, de esta manera se podría dilucidar si la diferenciación hacia algún linaje linfoide requiere del contacto célula-célula o sólo de un estímulo por citocinas y moléculas secretadas por las MSCs.

-Evaluar funcionalidad de las subpoblaciones de NKs, IKDCs y la población monocitos CD16+ generados en los cocultivos, ya que algunas de las subpoblaciones evaluadas en este trabajo son poblaciones recientemente descritas en la literatura y cuya funcionalidad se encuentra en estudio, además algunos trabajos se basan también en la funcionalidad para determinar madurez y ontogenia de las células.

-Finalmente evaluar la recuperación y repoblación del linaje mieloide y linfoide con las diferentes fuentes de MSCs usadas en éste trabajo en un modelo in vivo en ratón ya que si se se observa el mismo comportamiento con respecto a la linfopoyesis podríamos reforzar nuestra propuesta de usar a las fuentes de MSCs neonatales como alternativa para su uso en el trasplante de células troncales hematopoyéticas y su uso en inmunoterapia.

XIII LITERATURA CITADA:

- Abel, A.M., Yang, C., Thakar, M. S., & Malarkannan, S. (2018). Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front. Immunol.*, 9, 1869. doi:10.3389/fimmu.2018.01869
- Adolfsson, J., Månsson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.J., Thoren, L.A., Anderson, K., Sitnicka, E., Sasaki, Y., Sigvardsson, M., Jacobsen, S.E. (2005). Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*, 121,295-306. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.013
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*,404, 193-7.doi: 10.1038/35004599
- Almeida-Porada, G., Porada, C. D., Tran, N., & Zanjani, E. D. (2000). Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood*, 95, 3620-3627. PMID: 10828053
- Amand, M., Iserentant, G., Poli, A., Sleiman, M., Fievez, V., Sanchez, I. P., Sauvageot, N., Michel T., Aouali N., Janji B., Trujillo-Vargas C.M., Seguin-Devaux C., Zimmer, J. (2017). Human CD56dimCD16dim Cells as an Individualized Natural Killer Cell Subset. *Front Immunol.*, 8, 699. doi:10.3389/fimmu.2017.00699
- Angelopoulou, M., Novelli, E., Grove, J.E., Rinder, H.M., Civin C., Cheng, L., Krause D.S. (2003). Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. *Exp. Hematol.*, 31, 413e420. doi:10.1016/S0301-472X(03)00042-0
- Anthony, B. A., & Link, D. C. (2014). Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends in immunology*, 35, 32–37. doi:10.1016/j.it.2013.10.002
- Aranami T, Miyake S, Yamamura T. (2006). Differential expression of CD11c by peripheral blood NK cells reflects temporal activity of multiple sclerosis. *J Immunol*, 177,5659-67. doi: 10.4049/jimmunol.177.8.5659
- Baladrán, J.C. & Pelayo, R. (2016). Ontogenia de los linfocitos B., de *Rev Alerg. Méx.*63,71-79
- Baladrán, J. C., Purizaca, J., Enciso, J., Dozal, D., Sandoval, A., Jiménez-Hernández, E., Alemán-Lazarini L., Perez-Koldenkova V., Quintela-Núñez Del Prado H., Rios de Los Ríos J., Mayani H., Ortiz-Navarrete V., Guzman M.L, Pelayo, R. (2017). Pro-inflammatory-Related Loss of CXCL12 Niche Promotes Acute Lymphoblastic Leukemic Progression at the Expense of Normal Lymphopoiesis. *Front Immunol*, 7, 666. doi:10.3389/fimmu.2016.00666
- Ball, L.M., Bernardo, M.E., Roelofs, H., Lankester A., Cometa A., Egeler R.M., Locatelli F., & Fibbe W.E. (2007). Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood*, 110, 2764-2767. doi:10.1182/blood-2007-04-087056
- Bara, J.J., Richards, R.G., Alini & Stoddart, M.J. (2014), Concise Review: Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Change Phenotype Following in Vitro Culture: Implications for Basic Research and the Clinic. *Stem Cells*, 32, 1713-1723. doi:10.1002/stem.1649
- Bell, J.J. & Bhandoola, A. (2008). The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature*. 452,764-767. doi:/10.1038/nature06840

- Bernardo, M.E., Ball, L.M., Cometa, A.M., Roelofs, H., Zecca, M., Avanzini, M.A., Bertaina, A., Vinti, L., Lankester, A., Maccario, R., Ringden, O., Le Blanc, K., Egeler, R.M., Fibbe, W.E., Locatelli, F. (2011). Co-infusion of ex vivo expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 46,200e207. doi:10.1038/bmt.2010.87
- Bernardo, M.E., Emons, J.A.M., Karperien, M., Nauta A.J., Willemze, R., Roelofs, H., Romeo, S., Marchini, A., Rappold, G. A., Vukicevic, S., Locatelli, F. & Fibbe, W.E. (2007). Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow Display a Better Chondrogenic Differentiation Compared with Other Sources, *Connective Tissue Res.*, 48,3, 132-140, doi: 10.1080/03008200701228464
- Bhandoola, A. & Sambandam, A. (2006). From Stem Cell to T cell: one route or many? *Nat. Rev. Immunol.*, 6,117-126. doi:10.1038/nri1778
- Bianco, P. , Riminucci, M. , Gronthos, S. and Robey, P. G. (2001). Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. *Stem Cells*, 19: 180-192. doi:10.1634/stemcells.19-3-180
- Blom, B., & Spits, H. (2006). Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol.*, 24, 287-320. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090612
- Borràs, F. E., Matthews, N. C., Lowdell, M. W. and Navarrete, C. V. (2001), Identification of both myeloid CD11c+ and lymphoid CD11c- dendritic cell subsets in cord blood. *British Journal of Haematology*, 113, 925-931. doi:10.1046/j.1365-2141.2001.02840.x
- Brakebush, C., Filatreau, S., Potocnik, A. J., Bungartz, G., Wilhelm, P., Sevansson, M., Kearney, P., Körner, H., Gray, D., Fässler, R. (2002) $\beta 1$ integrin is not essential for hematopoiesis but is necessary for the T cell-dependent IgM antibody response. *Immunity*, 16,465-477. doi:10.1016/S1074-7613(02)00281-9
- Broxmeyer, H.E. (1992) Suppressor cytokines and regulation of myelopoiesis. Biology and possible clinical uses. *Am J Ped Hematool/Oncol*, 14,22-30. PMID: 1372489
- Bungartz, G., Stiller, S., Bauer, M., Müller, W., Schippers, A., Wagner, N., Fässler, R., & Brakebusch, C. (2006). Adult murine hematopoiesis can proceed without $\beta 1$ and $\beta 7$ integrins. *Blood*, 108, 1857-1864. Accessed May 09, 2019. doi:10.1182/blood-2005-10-007658
- Busslinger, M. (2004) Transcriptional control of early B cell development. *Ann Rev Immunol.*, 22,55-79. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104807
- Cawthorn, W.P., Scheller, E.L., Learman, B.S., Parlee, S.D., Simon, B.R., Mori, H., Ning, X., Bree, A.J., Schell, B., Broome, D.T., Soliman, S.S., DelProposto, J.L., Lumeng, C.N., Mitra, A., Pandit, S.V., Gallagher, K.A., Miller, J.D., Krishnan, V.2., Hui, S.K., Bredella, M.A., Fazeli, P.K., Klibanski, A., Horowitz, M.C., Rosen, C.J., MacDougald, O.A. (2014) Bone marrow adipose tissue is an endocrine organ that contributes to increased circulating adiponectin during caloric restriction. *Cell Metab.*,20,368-375.doi: 10.1016/j.cmet.2014.06.003.
- Chan C.J., Summers K.L., Chan N.G., Hardy D.B., Richardson B.S. (2013). Cytokines in umbilical cord blood and the impact of labor events in low-risk term pregnancies. *Early Hum Dev*, 89,1005-10. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2013.08.017

- Chang, Y., Shih, D. T., Tseng, C., Hsieh, T., Lee, D. and Hwang, S. (2006), Disparate Mesenchyme-Lineage Tendencies in Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow and Umbilical Cord Blood. *STEM CELLS*, 24: 679-685. doi:10.1634/stemcells.2004-0308
- Christensen, J.L., Wright, D.E., Wagers, A.J., Weissman, I.L.n (2004). Circulation and Chemotaxis of Fetal Hematopoietic Stem Cells. *PLoS Biol*, 2, e75. doi:10.1371/journal.pbio.0020075
- Chute, J. P., Muramoto, G. G., Dressman, H. K., Wolfe, G., Chao, N. J. and Lin, S. (2006), Molecular Profile and Partial Functional Analysis of Novel Endothelial Cell-Derived Growth Factors that Regulate Hematopoiesis. *STEM CELLS*, 24,1315-1327. doi:10.1634/stemcells.2005-0029
- Civin, C.I. & Gore, S.D. Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. (1993) *J Hematother.*, 2, 137-144 doi: 10.1089/scd.1.1993.2.137
- Collin, M. & Bigley, V. (2018), Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*, 154: 3-20. doi:10.1111/imm.12888
- Colucci, F., Caligiuri, M.A., Di Santo, J.P. (2003). What does it take to make a natural killer?. *Nat Rev Immunol*. 2003 May 3,413-25. doi: 10.1038/nri1088
- Cooper, M.A., Bush, J.E., Fehniger, T.A., VanDeusen J. B., Waite R. E., Liu Y., Aguila H. L., & Caligiuri, M. A. (2002). In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood*, 100, 3633-3638. doi:10.1182/blood-2001-12-0293
- Corre, J., Planat-Benard, V., Corberand J. X., Pénicaud, L., Casteilla, L., & Laharrague, P. (2004). Human bone marrow adipocytes support complete myeloid and lymphoid differentiation from human CD34 cells. *British Journal of Haematology*, 127, 344–347. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05198.x
- Da Silva, C.L, Goncalves, R., Crapnell, K.B. , Cabral, J.M.S., Zanjani, E.D., Almeida-Porada G. (2005). A human stromal-based serum-free culture system supports the ex vivo expansion/ maintenance of bone marrow and cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Exp Hematol.*,33, 828–85. doi:10.1016/j.exphem.2005.03.017
- De Wynter E, Ploemacher RE. (2001). Assays for the assessment of human hematopoietic stem cells. *J Biol Regul Homeost Agents*,15:23–7
- Delalat B., Pourfathollah, A.A., Soleimani, M., Mozdarani, H., Ghaemi, S.R., Movassaghpoou, A.A., Kaviani, S. (2009). Isolation and ex vivo expansion of human umbilical cord blood-derived CD34+ stem cells and their cotransplantation with or without mesenchymal stem cells. *Hematology*, 14,125e132. doi:10.1179/102453309X402250
- Di Mascio, L., Voermans, C., Uqoezwa, M., Duncan, A., Lu, D., Wu, J., Sankar U., Reya, T. (2007). Identification of adiponectin as a novel hemopoietic stem cell growth factor. *The Journal of Immunology*, 178, 3511–3520. doi:10.4049/jimmunol.178.6.3511
- Diefenbach, A., Colonna, M., and Koyasu, S. (2014). Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. *Immunity*,41, 354–365. doi: 10.1016/j.immuni.2014.09.005
- Ding, L., Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*, 481, 457–462. doi:10.1038/nature10783

- Dittel, B.N., & LeBien T.W. (1995). The growth response to IL-7 during normal human B cell ontogeny is restricted to B-lineage cells expressing CD34. *J Immunol.* 154,58-67 PMID: 7527823
- Douay, L., (2001) Experimental culture conditions are critical for ex vivo expansion of hematopoietic cells,10,341-6. doi:10.1089/152581601750288948
- Dominici, M, Le Blanc, K., Mueller, I., I. Cortenbach, S., Marini, F.C, Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., Horwitz, E.M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8,315-317. doi: 10.1080/14653240600855905
- Doulatov, S., Notta, F., Epper, K., Nguyen, L.T, Ohashi, P. S & Dick J. (2010). Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol*, 11,585-593. doi: 10.1038/ni.1889
- Ehninger, A. & Trump, A. (2011) The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J Exp Med*, 208,421-428.doi:10.1084/jem.20110132
- Fajardo-Orduña, G.R., Mayani, H. & Montesinos, J.J. (2015). Hematopoietic Support Capacity of Mesenchymal Stem Cells: Biology and Clinical Potential. *Arch Med Research*, 46,589-596. doi:10.1016/j.arcmed.2015.10.001
- Fajardo-Orduña, G.R, Mayani, H., Castro-Manrreza, Flores-Figueroa, E., Flores-Guzmán, Arriaga-Pizano, L., Piña-Sánchez, P., Hernández-Estevez, E., Castell-Rodríguez, E., Chávez-Rueda A., Legorreta-Haquet, Santiago-Osrio E., Montesinos, JJ. (2016) Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Clinical Scale Culture: In vitro Evaluation of Their Differentiation, Hematopoietic Support, and Immunosuppressive Capacities. *Stem Cells Develop*, 25,1-12. doi:10.1089/scd.2016.0071
- Fajardo-Orduña, G.R., Mayani, H., Flores-Guzmán, P., Flores-Figueroa, E., Hernández-Estévez, E., Castro-Manrreza, M.E., Piña-Sánchez, P., Arriaga-Pizano, L., Gómez-Delgado, A., Alarcón-Santos, G., Balvanera-Ortiz, O., & Montesinos, J.J. (2017). Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells from Umbilical Cord Blood and Placenta Exhibit Similar Capacities to Promote Expansion of Hematopoietic Progenitor Cells In Vitro. *Stem cells int*, 2017,6061729.doi:10.1155/2017/6061729
- Fekete, N., Rojewski, M.T, Fürst, D., Kreja, L., Ignatius, A., Dausend, J., Schrezenmeier, H. (2012) GMP-Compliant Isolation and Large-Scale Expansion of Bone Marrow-Derived MSC. *PLoS ONE* 7, e43255. doi:10.1371/journal.pone.0043255
- Flores-Figueroa, E. , Montesinos, JJ, & Mayani, H. (2006). Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Rev Inv clin*, 58, 498-511
- Flores-Guzman, P. (2006) Proliferación y expansión in vitro de células progenitoras hematopoyéticas humanas presentes en la sangre de cordón umbilical. Tesis de doctorado;21-22
- Flores-Guzman, P., Flores-Figueroa, E., Montesinos JJ, Martínez-Jaramillo, G. and Mayani H. (2009). Individual and combined effects of mesenchymal stem cells and recombinant stimulatory cytokines on the in vitro growth of primitive hematopoietic cells from human umbilical cord blood. *Cytotherapy*, 11, 886-896. doi:10.3109/14653240903180076

- Freud, A. G. & Caligiuri, M. A. (2006), Human natural killer cell development. *Immunol Rev.*, 214, 56-72. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00451.x
- Friedman, R., Betancur, M.L., Boissel, L., Tuncer, H.H., Cetrulo, C.L., & Klingemann, H.G. (2007). Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation, Biol Blood Marrow Transplant.*13,1477-86. doi: 10.1016/j.bbmt.2007.08.048
- Fujita, S., Toguchida, J., Morita, Y., & Iwata, H. (2008). Clonal Analysis of Hematopoiesis-Supporting Activity of Human Mesenchymal Stem Cells in Association with Jagged1 Expression and Osteogenic Potential. *Cell Transplant.* 17, 1169–1179. doi:10.3727/096368908787236611
- Galy, A., Travis, M., Cen D., Chen, B. (1995). Human T, B, natural Killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity*, 3,459-473. doi:10.1016/1074-7613(95)90175-2
- Gainsford, T., Willson, T. A., Metcalf, D., Handman, E., McFarlane, C., Ng, A., Nicola NA, Alexander WS, Hilton, D. J. (1996). Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14564–14568. doi: 10.1073/pnas.93.25.14564
- Gerondakis, S., Fulford, T.S., Messina, N.L., Grumont, R.J. (2014) NK-kappaB control of T cell development. *J. Immunol*, 15,15-25. doi: 10.1038/ni.2785
- Gonzalo-Daganzo, R., Regidor, C., mart_in-Donaire, T., Rico, M.A, Bautista, G., Krsnik, I., Forés, R., Ojeda, E., Sanjuán, I., García-Marco J.A, Navarro, B., Gil, S., Sánchez, R., Panadero, N., Gutiérrez, Y., García-Berciano, M., Pérez, N., Millán, I., Cabrera, R., Fernández, M.N. (2009). Results of a pilot study on the use of third-party donor mesenchymal stromal cells in cord blood transplantation in adults. *Cytotherapy*, 11,278-288. doi: 10.1080/14653240902807018
- Gottschling, S., Saffrich, R., Seckinger, A., Krause, U., Horsch, K., Miesala, K. and Ho, A. D. (2007), Human Mesenchymal Stromal Cells Regulate Initial Self-Renewing Divisions of Hematopoietic Progenitor Cells by a β 1-Integrin-Dependent Mechanism. *STEM CELLS*, 25,798-806. doi:10.1634/stemcells.2006-0513
- Gronthos, S., Zannettino, A.C, Hay, S.J., Shi, S., Graves, S.E., Kortessidis, A., Simmons, P.J. (2003). Molecular and celular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*,116, 1827-1835; doi: 10.1242/jcs.00369
- Grigor'eva, E.V., Shevchenko, Al., Zhelezova, Al., Shilov, A.G., Mazurok, N.A., Dyban, P.A., Dyban, A.P., Zakian, SM.(2011). Stem cells giving rise to extraembryonic tissues. *Bull Exp Biol Med*,150,504–514.doi:10.1007/s10517-011-1179-1
- Haddad, R., Guardiola, P., Izac, B., Thibault, C., Radich, J.P., Delezoide, A., Baillou, C., Lemoine, F.M., Gluckman, J.C., Pflumio, F., & Canque, B. (2004). Molecular characterization of early human T/NK and B-lymphoid progenitor cells in umbilical cord blood. *Blood*, 104, 3918-26. doi: 10.1182/blood-2004-05-1845
- Hao, Q., Zhu, J., Price, M. A., Payne, K. J., Barsky, L. W., & Crooks, G. M. (2001). Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood. *Blood*, 97, 3683-3690. doi:10.1182/blood.V97.12.3683.
- Haynesworth, S.E., Baber, M.A., Caplan, A.I. (1992). Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*, 13, 69-80. doi:10.1016/8756-3282(92)90363-2

- Hou, R.Q., Wang, J., Kong, Y., Chen, Y.H., Huang, X.J., Zeng, Y., Ge, J., Liu, Q.H., Zhao, C.H., Liu, K.Y. (2010). Transfusion of mesenchymal stemcells combined with haploidentical HSCT improves hematopoietic microenvironment. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*; 18, 155–160. PMID: 20137138
- Hurley, R.W., McCarthy, J. B., & Verfaillie, C. M. (1995). Direct adhesion to bone marrow stroma via fibronectin receptors inhibits hematopoietic progenitor proliferation. *J Clin Invest*, 96, 511–519. doi:10.1172/JCI118063
- Ichii M., Oritani K., Yokota T., Nishida M., Takahashi I., Shirogane T., Ezoe S., Saitoh N., Tanigawa R., Kincade P.W., Kanakura Y. (2008) Regulation of human B lymphopoiesis by the transforming growth factor- β superfamily in a newly established coculture system using human mesenchymal stem cells as a supportive microenvironment. *Exp Hematol*, 36,587-97. doi: 10.1016/j.exphem.2007.12.013
- Ichii, M., Oritani, K., Yokota, T., Schultz, D.C., Holter, J.L., Kanakura, Y., Kincade, P.W. (2010). Stromal cell-free conditions favorable for human B lymphopoiesis in culture. *J Immunol Methods*. 2010 Jul 359,47-55. doi: 10.1016/j.jim.2010.06.002
- Ichii, M., Oritani, K., Kanakura, Y. (2014). Early B lymphocyte development: Similarities and differences in human and mouse. *World J Stem Cells*, 26,421-31. doi: 10.4252/wjsc.v6.i4.421
- Igarashi H., Gregory, S.C., Yokota, T., Sakaguchi, N. y Kincade, P.W. (2002). Transcription from RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity*, 17,117–130. doi:10.1016/S1074-7613(02)00366-7
- Iwasaki, H., & Akashi, K. (2007). Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity*, 26,726-40. doi: 10.1016/j.immuni.2007.06.004
- Jang, Y.K., Jung, D.H., Jung, M.H. (2006). Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol.*, 85,212-25. doi:10.1007/s00277-005-0047-3
- Jiang, X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S., Wu, Y., Yu, X., & Mao, N. (2005). Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 105, 4120-4126. doi: 10.1182/blood-2004-02-0586
- Kadekar, D., Kale, V., & Limaye, L. (2015). Differential ability of MSCs isolated from placenta and cord as feeders for supporting ex vivo expansion of umbilical cord blood derived CD34(+) cells. *Stem cell research & therapy*, 6, 201. doi:10.1186/s13287-015-0194-y
- Karsunky H, Merad M, Cozzio A, Weissman IL, Manz MG. (2003). Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J Exp Med*, 198,305-313. doi: 10.1084/jem.20030323
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüte, H., Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*.,24,1294-301.doi: 10.1634/stemcells.2005-0342
- Köhler, T., Plettig, R., Wetzstein, W., Schaffer, B., Ordemann, R., Nagels, H., Ehninger, G. and Bornhäuser, M. (1999), Defining Optimum Conditions for the Ex Vivo Expansion of Human Umbilical Cord Blood Cells.

Influences of Progenitor Enrichment, Interference with Feeder Layers, Early-Acting Cytokines and Agitation of Culture Vessels. *Stem Cell*, 17, 19-24. doi:10.1002/stem.170019

-Kim, D.H., Yoo, K.H., Yim, Y.S., Choi, J., Lee, S.H., Jung, H.L., Sung, K.W., Yang, S.E., Oh, W.I., Yang, Y.S., Kim, S.H., Choi, S.Y., Koo, H.H. (2006) Cotransplanted Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells (MSC) Enhanced Engraftment of Hematopoietic Stem Cells in a MSC-dose Dependent Manner in NOD/SCID Mice. *J Korean Med Sci*, 21,1000-1004. doi:10.3346/jkms.2006.21.6.1000

-Kim, D., Chung, Y., Kim, T., Kim, Y., & Oh, I. (2004). Cotransplantation of third-party mesenchymal stromal cells can alleviate single-donor predominance and increase engraftment from double cord transplantation. *Blood*, 103, 1941-1948. doi:10.1182/blood-2003-05-1601

-Kim, D.W., Staples, M., Shinozuka, K., Pantcheva, P., Kang, S.-D., Borlongan, C.V. (2013). Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications. *Int. J. Mol. Sci*, 14, 11692-11712. doi:10.3390/ijms140611692

-Kim, E.J., Kim, N., Cho, S.G. (2013). The potential use of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Mol Med*, 45, e2. doi: 10.1038/emm.2013.2

-Koç, O.N., Gerson, S.L., Cooper, B.W., Dyhouse, S.M., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., & Lazarus, H.M. (2000). Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol*, 18, 307-16. doi: 10.1200/JCO.2000.18.2.307

-Kohn, L.A., Hao, Q.L., Sasidharan, R., Parekh, C., Ge, S., Zhu, Y., Mikkola, H.K., Crooks, G.M. (2012). Lymphoid priming in human bone marrow beings before expression of CD10 with upregulation of L-selectin. *Nat. Immunol*, 13,963-71. doi: 10.1038/ni.2405

-Kondo, M., Weissman, I.L y Akashi K. (1977). Identificación of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, 91, 666-672. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80453-5

-Kondo, M., Wagers, A.J., Manz, M.G., Prohaska, S.S., Scherer, D.C., Beilhack, G.F., Shizuru, J.A., Weissman, I.L. (2003). Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol.*, 21:759-806. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141007

-Kuçi, S., Kuçi, Z., Kreyenberg, H., Deak, E., Puetsch, K., Huenecke, S., Amara, C., Koller, S., Rettinger, E., Grez, M., Koehl, U., Latifi-Pupovci, H., Henschler, R., Mittelbronn, M., Laer, D.V., Klingebiel, T., & Bader, P. (2010). CD271 antigen defines a subset of multipotent stromal cells with immunosuppressive and lymphohematopoietic engraftment-promoting properties. *Haematologica*, 95, 651-9. doi:10.3324/haematol.2009.015065

-Kurosaka, D., LeBien, T.W., Pribyl, J.A. (1999). Comparative studies of different stromal cell microenvironments in support of human B-cell development. *Exp Hematol*. Aug;27,1271-81.doi: 10.1016/s0301-472x(99)00067-3

-Kurosaki, T., Shinohara, H., Baba, Y. (2010). B cell signaling and fate decision. *Ann. Rev. Immunol*, 28,21-55. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132541.doi:10.1016/S0301-472X(99)00067-3

-Laharrague, P., Larrouy, D., Fontanilles, A. M., Truel, N., Campfield, A., Tenenbaum, R., Galitzky J., Corberand J.X., Pénicaud L, Casteilla, L. (1998). High expression of leptin by human bone marrow adipocytes in primary culture. *FASEB J.*, 12, 747–752. doi:10.1096/fasebj.12.9.747

- Lai, A.Y., Lin, S.M., Kondo, M. (2005). Heterogeneity of Flt3-expressing multipotent progenitors in mouse bone marrow. *J Immunol*,175, 5016-5023. doi:10.4049/jimmunol.175.8.5016
- Lanza, R. & Atala, A. (2009). *Essentials of stem cells Biology*. Academic Press 2^a Edition, pg 23-24.
- Le Blanc, K., Samuelsson, H., Gustafsson, B., Remberger, M., Sundberg, B., Arvidson, J., Ljungman, P., Lönnies, H., Nava, S., Ringdén, O. (2007). Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia*,21,1733-8. doi: 10.1038/sj.leu.2404777
- Le Blanc, K. (2009). Hematopoiesis does not always get support from MSC. *Cytherapy*, 11,674-5. doi: 10.3109/14653240903332115
- Lee, O.K., Kuo, T.K., Chen, W.M., Lee, K.D., Hsieh, S.L., Chen, T.H.(2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*,103,1669-75. doi: 10.1182/blood-2003-05-1670
- Li, T., Wu, Y. (2011). Paracrine molecules of mesenchymal stem cells for hematopoietic stem cell niche. *Bone Marrow Res.*,2011:353878. doi: 10.1155/2011/353878. Epub 2011 Sep 22
- Li XH, Gao CJ, Da WM, Li , Cao YB1, Wang ZH1, Xu LX1, Wu YM1, Liu B1, Liu ZY1, Yan B1, Li SW1, Yang XL1, Wu XX1, Han ZC. (2015). Reduced intensity conditioning, combined transplantation of haploidentical hematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells in patients with severe aplastic anemia. *PLoS one*, 10, e0117641. doi:10.1371/journal.pone.0117641
- Liu, L.H., Sun, Q.Y., Hu, K.X., Huang, Y.J., Fan, C.B., Sun, Z., Yao, B., Guo, M., Zhao, C.H., Ai, H.S. (2005). Establishment of a rhesus haploidentical hematopoietic stem cell and mesenchymal stem cell transplantation model by nonmyeloablative conditioning. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 26,385-8. PMID: 16251015
- Liu, X., Wu, M., Peng, Y., Chen, X., Sun, J., Huang, F., Fan Z, Zhou H, Wu X, Yu G, Zhang X, Li Y, Xiao Y, Song C, Xiang AP, Liu, Q. (2014). Improvement in Poor Graft Function after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation upon Administration of Mesenchymal Stem Cells from Third-Party Donors: A Pilot Prospective Study. *Cell Transplant.*, 23, 1087–1098. doi:10.3727/096368912X661319
- Lo Iacono, M., Anzalone, R., La Rocca, Baiamonte, E., Maggio, A., Acuto, S. (2017) Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells as a Feeder Layer for the Ex Vivo Expansion of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells: A Review, *Stem Cell Rev and Rep.*, 13, 35-49. doi:10.1007/s12015-016-9702-4
- Lu, L.L., Liu, Y.J., Yang, S.G., Zhao, Q.J., Wang, X., Gong, W., Han, Z.B., Xu, Z.S., Lu, Y.X., Liu, D., Chen, Z.Z., Han, Z.C. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*.91,1017-26. PMID: 16870554
- MacDonald,K.P., Munster, D. J., Clark, G. J., Dzionek, A., Schmitz, J., & Hart, D. N. (2002). Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood*, 100(13), 4512-4520. doi:10.1182/blood-2001-11-0097
- Macmillan, M.L., Blazar, B.R, DeFor, T.E., Wagner, J.E. (2009). Transplantation of ex-vivo culture-expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I-II clinical trial. *Bone Marrow Transplant.*, 43,447-54. doi: 10.1038/bmt.2008.348

- Marin-Llera Jessica & Chimal Monroy. (2017). Células Troncales Biología y aplicaciones en biomedicina, cap 1, 1ª ed., pg 15-33
- Mattiucci, D, Maurizi, G, Izzi, V, Cenci L, Ciarlantini M, Mancini S, Mensà E, Pascarella R, Vivarelli M, Olivieri A, Leoni P, Poloni A. (2018) Bone marrow adipocytes support hematopoietic stem cell survival. *J Cell Physiol*, 233,1500– 1511. doi:10.1002/jcp.26037
- Mayani, H., Flores-Figueroa, E., Pelayo, R., Montesinos, JJ, Flores-Guzmán & Chávez-González. (2007). Hematopoyesis. *Cancerología*, 2, 95-107
- Mayani, H. (2017). Células Troncales/Progenitoras Hematopoyéticas de la Sangre de Cordón Umbilical: Diferencias biológicas con las células hematopoyéticas en sujetos adultos. En *Células Troncales: Biología y sus aplicaciones en Biomedicina*. Chávez González María Antonieta, Chimal-Monroy Jesús, Flores-Figueroa Eugenia, Lamas Mónica (editores). Grañén Porrúa
- Mendez-Ferrer, S., Michurina, T., Ferraro, F., Mazloom, A., Macarthur, B., Lira, S., Scadden, D., Ma'ayan, A., Enikolopov, G., Frenette, P. (2010). Mesenchymal and hematopoietic stem cells from a unique bone marrow niche. *Nature*, 466, 829-834. doi:10.1038/nature09262
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol.*, 31, 563-604. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074950
- Meuleman, N., Tondreau, T., Ahmad, I., Kwan, J., Crokaert, F., Delforge, A., Dorval, C., Martiat, P., Lewalle, P., Lagneaux, L., Bron, D. (2009). Infusion of mesenchymal stromal cells can aid hematopoietic recovery following allogeneic hematopoietic stem cell myeloablative transplant: a pilot study. *Stem Cells Dev.*, 18, 1247-52. doi: 10.1089/scd.2009.0029
- Miyajima, A., Ito, Y., Kinoshita, T. (1999). Cytokine signaling for proliferation, survival and death in hematopoietic cells. *Int J Hematology*, 69, 137-46. PMID: 10222650
- Mor, G., Cardenas, I., Abrahams, V., & Guller, S. (2011). Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci.*, 1221, 80–87. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05938.x
- Muguruma, Y., Yahata, T., Miyatake, H., Sato, T., Uno, T., Itoh, J., Kato, S., Ito, M., Hotta, T., & Ando, K. (2006). Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*, 107, 1878-1887. doi:10.1182/blood-2005-06-2211
- Mukherjee, R., Kanti-Barman, P., Kumar-Thatoi P., Tripathy, R., Kumar-Das, B., Ravindran, B. (2015). Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep.*, 5, 13886. doi: 10.1038/srep13886
- Naik, S.H., Sathe, P., Park, H.Y., Metcalf, D., Proietto, A.I., Dakic, A., Carotta, S., O'Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., Kwak JY, Wu L, Shortman K. (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat. Immunol.*, 8, 1217–1226. doi: 10.1038/ni1522
- Naik S, H. Perié L, Swart E, Gerlach C, van Rooij N, de Boer RJ, Schumacher TN. (2013). Diverse and heritable lineage imprinting of early haematopoietic progenitors. *Nature*, 496, 229-32. doi: 10.1038/nature12013

- Nagasawa, T., Omatsu, Y., Sugiyama, T. (2011). Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends Immunol.*, 32, 315-20. doi: 10.1016/j.it.2011.03.009
- Nagasawa, T. (2015). CXCL12/SDF-1 and CXCR4. *Front Immunol*, 6, 301. doi:10.3389/fimmu.2015.00301
- Nakamori, Y., Liu, B., Ohishi, K., Suzuki, K., Ino, K., Matsumoto, T., Masuya, M., Nishikawa, H., Shiku, H., Hamada, H., Katayama, N.(2012) Human bone marrow stromal cells simultaneously support B and T/NK lineage development from human haematopoietic progenitors: a principal role for flt3 ligand in lymphopoiesis. *Br J Haematol.*, 157,674-86. doi: 10.1111/j.1365-2141.2012.09109.x.
- Nakamura, Y., Arai, F., Iwasaki, H., Hosokawa, K., Kobayashi, I., Gomei, Y., Matsumoto, Y., Yoshihara, H., & Suda, T. (2010). Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells. *Blood*, 116, 1422-1432. doi:10.1182/blood-2009-08-239194
- Nauta, A.J., Kruisselbrink, A.B., Lurvink, E., Willemze, R., Fibbe, W.E.(2006). Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+ -derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 177,2080-7. doi: 10.4049/jimmunol.177.4.2080
- Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P. L., Hauschka, P. V., Fahey, F., & Daley, G. Q. (2009). Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*,460, 259-63. doi: 10.1038/nature08099
- Nickkholgh, B, Mizrak SC, Korver CM, van Daalen SK, Meissner A, Repping S, van Pelt AM.(2007). Enrichment of spermatogonial stem cells from long term cultured human testicular cell compartments in mouse spermatogenesis. *Fertil Steril.*,102,558-565.e5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.04.022.
- Nishihara, M., Wada, Y., Ogami, K., Ebihara, Y., Ishii, T., Tsuji, K., Ueno, H., Asano, S., Nakahata, T., Maekawa, T.(1998). A combination of stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor enhances the growth of human progenitor B cells supported by murine stromal cell line MS-5. *Eur J Immunol.*,28,855-64.doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199803)28:03<855::AID-IMMU855>3.0.CO;2-X
- Noda, M., Omatsu, Y., Sugiyama, T., Oishi, S., Fujii, N., & Nagasawa, T. (2011). CXCL12-CXCR4 chemokine signaling is essential for NK-cell development in adult mice. *Blood*, 117, 451-458. doi:10.1182/blood-2010-04-277897
- Omatsu, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K., Nagasawa, T. (2010). The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*, 33,387-99. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.017
- Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M.A., Ohteki, T., Jarrossay, D., and Manz, M.G. (2007). Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat. Immunol.* 8, 1207–1216.doi: 10.1038/ni1518
- Onai, N., Kurabayashi, K., Hosoi-Amaiike, M., Toyama-Sorimachi, N., Matsushima, K., Inaba, K., Ohteki, T. (2013). A clonogenic progenitor with prominent plasmacytoid dendritic cell developmental potential. *Immunity*, 23,943-57. doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.006
- Osman, I., Young, A., Ledingham, M.A., Thomson, A.J., Jordan, F., Greer, I.A., Norman, J.E. (2003). Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term, *Mol Hum Reprod.*,9,41-5. doi:10.1016/j.jsrg.2005.12.002

- Oswald, J. , Boxberger, S. , Jørgensen, B. , Feldmann, S. , Ehninger, G. , Bornhäuser, M. and Werner, C. (2004), Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated Into Endothelial Cells In Vitro. *STEM CELLS*, 22,377-384. doi:10.1634/stemcells.22-3-377
- Parolini, O., Alviano, F., Bagnara, G.P., Bilic, G., Bühring, H.J., Evangelista, M., Hennerbichler, S., Liu, B., Magatti, M., Mao, N., Miki, T., Marongiu, F., Nakajima, H., Nikaido, T., Portmann-Lanz, C.B., Sankar, V., Soncini, M., Stadler, G., Surbek, D., Takahashi, T.A., Redl, H., Sakuragawa, N., Wolbank, S., Zeisberger, S., Zisch, A., Strom, S.C. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells.(2008)*Stem Cells*,26,300-11. doi:10.1634/stemcells.2007-0594
- Papayannopoulou, T., Priestley, G. V., Nakamoto, B., Zafiropoulos, V., & Scott, L. M. (2001). Molecular pathways in bone marrow homing: dominant role of $\alpha\beta 1$ over $\beta 2$ -integrins and selectins. *Blood*, 98, 2403-2411. doi:10.1182/blood.V98.8.2403
- Pelayo, R., Hirose, J., Huang, J., Garrett, K. P., Delogu, A., Busslinger, M., & Kincade, P. W. (2005). Derivation of 2 categories of plasmacytoid dendritic cells in murine bone marrow. *Blood*, 105, 4407–4415. doi:10.1182/blood-2004-07-2529
- Pelayo, R. & Vadillo, E. (2011). El sistema hematopoyético a partir de células troncales. En: *Células troncales y medicina regenerativa*. Pelayo R, Santa-Olalla J, Velasco I,(editores). UNAM
- Pelayo, R., Balandrán J, Enciso J. (2017). El sistema hematopoyético como paradigma de la diferenciación celular. En *Células troncales biología y aplicaciones en biomédicina*. Chávez González María Antonieta, Chimal-Monroy Jesús, Flores-Figueroa Eugenia, Lamas Mónica (editores). Grañén Porrúa
- Pelayo, R., Balandrán, J.C., Ruiz, A. (2019). Ontogenia de la Inmunity. *La Medicina es Así, Ac Nal Med*, En Linea <https://www.asieslamedicina.org.mx/ontogenia-de-la-inmunity/>
- Perry, S.S., Welner, R.S., Kouro, T., Kincade, P.W., Sun, X.H. (2006). Primitive lymphoid progenitors in bone marrow with T lineage reconstituting potential. *J Immunol*, 177, 2880-2887. doi: 10.4049/jimmunol.177.5.2880
- Pittenger, M.F., MacKay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284,143-7. doi: 10.1126/science.284.5411.143
- Poli, A., Michel, T., Thérésine, M., Andrès, E., Hentges, F., & Zimmer, J. (2009). CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*, 126, 458–465. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x.
- Poloni, A., Giarratana, M.C., Firat H, Kobari L, Gorin NC, Douay L. (1997). The ex vivo expansion capacity of normal human bone marrow cells is dependent on experimental conditions: role of the cell concentration, serum and CD34+ cell selection in stroma-free cultures. *Hematol Cell Ther.*, 39,49-58. doi: 10.1007/s00282-997-0049-9
- Poloni, A., Maurizi, G., Foia, F., Mondini, E., Mattiucci, D., Ambrogini, P., Lattanzi D., Mancini S., Falconi M., Cinti S., Olivieri A, Leoni, P. (2015). Glial-like differentiation potential of human mature adipocytes. *J Mol Neurosci.*, 55, 91–98. doi: 10.1007/s12031-014-0345-0

- Prasanna, S.J., Gopalakrishnan, D., Shankar, S.R., Vasandan, A.B. (2010). Pro-Inflammatory Cytokines, IFN γ and TNF α , Influence Immune Properties of Human Bone Marrow and Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells Differentially. *PLoS ONE*, 5, e9016. doi: 10.1371/journal.pone.0009016
- Prieyl, J.A. & LeBien, T.W. (1996). Interleukin 7 independent development of human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93,10348-53. doi: 10.1073/pnas.93.19.10348
- Purizaca, J., Meza, I., & Pelayo R. (2012). Early lymphoid development and microenvironmental cues in B-cell acute lymphoblastic leukemia," *Arch Med Res.*, 43,89-101. doi: 10.1016/j.arcmed.2012.03.005.
- Ramírez-Ramírez, D., Vadillo, E., Arriaga-Pizano, L. A., Mayani, H., Estrada-Parra, S., Velasco-Velázquez, M. A., Pérez-Tapia SM, Pelayo, R. (2016). Early Differentiation of Human CD11c⁺NK Cells with $\gamma\delta$ T Cell Activation Properties Is Promoted by Dialyzable Leukocyte Extracts. *J Immunol Res.*, 2016, 4097642. doi:10.1155/2016/4097642
- Ranson, T., Vosshenrich, C. A., Corcuff, E., Richard, O., Müller, W., & Di Santo, J. P. (2003). IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood*, 101, 4887-4893. doi:10.1182/blood-2002-11-3392
- Renoux, V.M., Zriwil, A., Peitzsch, C., Michaëlsson, J., Friberg, D., Soneji, S., Sitnicka, E. (2015). Identification of a Human Natural Killer Cell Lineage-Restricted Progenitor in Fetal and Adult Tissues *Immunity*. 43, 394–407. doi:10.1016/j.immuni.2015.07.011
- Robinson, S., Ng J, Niu, T., Yang, H., McMannis, J., Karandish, S., Karu, I., Fu, P., Del Angel, M., Messinger, R., Flagge, F., de Lima, M., Decker, W., Xing, D., Champling, R., Shpall, E. (2006). Superior ex vivo coord blood expansión follow co-culture with bone marrow-derived mesenchyma stem cells. *Bone Marrow Transplant.*, 37, 359-66. doi: 10.1038/sj.bmt.1705258
- Rossi, M. I., Yokota, T., Medina, K. L., Garrett, K. P., Comp, P. C., Schipul, A. H., & Kincade, P. W. (2003). B lymphopoiesis is active throughout human life, but there are developmental age-related changes. *Blood*, 101, 576-584. doi:10.1182/blood-2002-03-0896
- Sánchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T.B, Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D.R, Sanberg, P.R. (2000). Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol.*, 164,247-56. doi: 10.1006/exnr.2000.7389
- Schajnovitz, A., Itkin, T., D'Uva G, Kalinovich, A., Golan, K., Ludin, A., Cohen, D., Shulman, Z., Avigdoer, A., Nagler, A., Kollet, O., Seger, R., Lapidot, T. (2011). CXCL12 secretion by bone marrowstromal cells is dependent on cell contact and mediated by connexin-43 and connexin-45 gap junctions. *Nat Immunol*, 12,391-8. doi: 10.1038/ni.2017
- Schofield, K. P., Humphries, M. J., de Wynter, E., Testa, N., & Gallagher, J. T. (1998). The Effect of $\alpha 4\beta 1$ -Integrin Binding Sequences of Fibronectin on Growth of Cells from Human Hematopoietic Progenitors. *Blood*, 91, 3230-3238. doi: 10.1182/blood.V91.9.3230.3230_3230_3238
- Schwickert, T.A, Tagoh, H., Gültekin, S., Dakic, A., Axelsson, E., Minnich, M., Ebert, A., Werner, B., Roth, M., Cimmino, L., Dickins, R.A., Zuber, J., Jaritz, M., Busslinger, M. (2008). Stage-specific control of early B cell development. *Ann Rev Immunol*,15, 283-93. doi: 10.1038/ni.2828
- Shah, D. & Zuniga-Pflucker J. C. (2014). An overview of intrathymic intricacies of Tcell development. *Nat Immunol.*, 192,4017-23. doi: 10.4049/jimmunol.1302259

- Schareder J. IL-3. En: A compendium of cytokines and other mediators of host defense. (2001) Joost J, Oppenheim J, & Feldmann M, eds. AP Press. pp 899
- Shortman, K., Sathe, P., Vremec, D., Naik, S., O'Keeffe, M. (2013). Plasmacytoid dendritic cells development. *Adv Immunol*, 120,105-26. doi: 10.1016/B978-0-12-417028-5.00004-1
- Storms, R. W., Goodell, M. A., Fisher, A., Mulligan, R. C., & Smith, C. (2000). Hoechst dye efflux reveals a novel CD7+CD34- lymphoid progenitor in human umbilical cord blood. *Blood*, 96, 2125-2133
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., Nagasawa, T. (2006). Maintenance of hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrowstromal cell niches. *Immunity*, 25,977-988. doi: 10.1016/j.immuni.2006.10.016
- Taichman, R., Reilly, M., & Emerson, S. (1996). Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. *Blood*, 87, 518-524
- Texidó, J., Helmer, M., Greenberger, J., Anklesaria, P. (1992). Role of $\beta 1$ and $\beta 2$ integrins in the adhesion of human CD34hi stem cells to bone marrow stroma. *J Clin Inves.*, 90,358-367. doi:10.1172/JCI115870
- Todaro, M., D'Asaro, M., Caccamo, N., Iovino F, Francipane, M.G., Meraviglia, S., Orlando, V., La Mendola, C., Gulotta, G., Salerno, A., Dieli, F., Stassi, G. (2009). "Efficient killing of human colon cancer stem cells by $\gamma\delta$ T lymphocytes. *J Immunol.*, 182, 7287-7296; doi:10.4049/jimmunol.0804288
- Tuljapurkar, S. R., McGuire, T. R., Brusnahan, S. K., Jackson, J. D., Garvin, K. L., Kessinger, M. A., Lane, J.T., O' Kane, B.J, Sharp, J. G. (2011). Changes in human bone marrow fat content associated with changes in hematopoietic stem cell numbers and cytokine levels with aging. *J Anatomy*, 219, 574-581. doi: 10.1111/j.1469-7580.2011.01423. x
- Ullah, I., Baregundi-Subbarao, R., Rho, G.J. (2015). Human mesenchymal stem cells— current trends and future prospective. *Biosci Rep*,35, pii: e00191. doi: 10.1042/BSR20150025
- Voura, E., Billia, F., Iscove, N., Hawley, R. (1997). Expression mapping of adhesion receptor genes during differentiation of individual hematopoietic progenitors. *Exp Hematol.*,25,1172-9. PMID: 9328454
- Walenda, T. , Bork, S. , Horn, P. , Wein, F. , Saffrich, R. , Diehlmann, A. , Eckstein, V. , Ho, A. D. and Wagner, W. (2010). Co-culture with mesenchymal stromal cells increases proliferation and maintenance of haematopoietic progenitor cells. *J Cellular and Molecular Med.*, 14, 337-350. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00776.x
- Wang, H., Yan, H., Wang, Z., Zhu, L., Liu, J., Guo, Z. (2012). Cotransplantation of allogeneic mesenchymal and hematopoietic stem cells in children with aplastic anemia. *Pediatrics*, 129,e1612ee1615. doi: 10.1542/peds.2011-2091
- Weiss, M. L., & Troyer, D. L. (2006). Stem cells in the umbilical cord. *Stem cell Rev.*, 2, 155-162. doi: 10.1007/s12015-006-0022-y
- Welner, R.S., Kincade, P.W., Pelayo, R. (2007). Linfopoyesis temprana en médula ósea adulta. *Inmunología*, 26, 135-144. doi: 10.1016/S0213-9626(07)70083-5

- Welner, R. S., Pelayo, R., Garrett, K. P., Chen, X., Perry, S. S., Sun, X., Kee, B. L., & Kincade, P. W. (2007). Interferon-producing killer dendritic cells (IKDCs) arise via a unique differentiation pathway from primitive c-kit^{hi}CD62L⁺ lymphoid progenitors. *Blood*, 109, 4825-4931. doi:10.1182/blood-2006-08-043810
- Wilson, A., Laurenti, E., Trumpp, A. (2009). Balancing dormant and self-renewing hematopoietic stem cells. *Curr Op Genet Devel*, 19,461-8. doi: 10.1016/j.gde.2009.08.005. Epub 2009 Oct 5.
- Winkler, I.G., Barbier V, Nowlan B, Jacobsen, R.N, Forristal, C.E, Patton, J.T, Magnani, J.L, Lévesque, J.P. (2012). Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nat. Med*,18,1651-7. doi: 10.1038/nm.2969. Epub 2012 Oct 21
- Wognum, A., Eaves, A.C., Thomas, T.E. (2003). Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res.*; 34,461-75. doi: 10.1016/j.arcmed.2003.09.008
- Wu, C., Li, B., Lu, R., Koelle, S. J., Yang, Y., Jares, A., Krouse, A.E., Metzger, M., Liang, F., Loré, K., Wu, C, O., Donahue, R.E., Chen, I.S.Y., Weissman, I., Dunbar, C. E., Dunbar, C.E. (2014). Clonal tracking of rhesus macaque hematopoiesis highlights a distinct lineage origin for natural killer cells. *Cell stem cell*, 14, 486–499. doi: 10.1016/j.stem.2014.01.020
- Wu, K.H, Tsai, C., Wu, H.P., Sieber, M., Peng, C.T., Chao, Y.H. (2013). Human application of ex vivo expanded umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: enhance hematopoiesis after cord blood transplantation. *Cell Transplant.*, 22,2041e2051. doi: 10.3727/096368912X663533
- Wu, K.H., Wu, H.-P., Chan, C.-K., Hwang, S.-M., Peng, C.-T., & Chao, Y.-H. (2013). The Role of Mesenchymal Stem Cells in Hematopoietic Stem Cell Transplantation: From Bench to Bedsides. *Cell Transplant.*, 22, 723–729. doi:10.3727/096368912X655217
- Yim, Y.S, Noh, Y.H., Kim, D.H., Lee, M.W., Cheuh, H.W., Lee, S.H., Yoo, K.H., Jung, H.L., Sung, K.W., Choi, S.J., Oh, W.I., Yang, Y.S., Koo, H.H. (2010). Correlation between the immature characteristics of umbilical cord blood-derived mesenchymal Stem cells and engraftment of hematopoietic stem cells in NOD/SCID mice. *Transplant Proc.*,42,2753-2758. doi: 10.1016/j.transproceed.2010.05.146
- YP Li., Paczesny, S., Lauret, E., Poirault, S., Bordigoni, P., Mekhloufi, F., Hequet, O., Bertrand, Y., Ou-Yang YP, Stoltz JF., Miossec, P., Eljaafari, A. (2008), Human Mesenchymal Stem Cells License Adult CD34⁺ Hemopoietic Progenitor Cells to Differentiate into Regulatory Dendritic Cells through Activation of the Notch Pathway. *J Immunol*, 180, 1598-1608. doi:10.4049/jimmunol.180.3.1598
- Yockey, L.J., & Iwasaki, A. (2018). Interferons and Proinflammatory Cytokines in Pregnancy and Fetal Development. *Immunity*, 49, 397-412. doi: 10.1016/j.immuni.2018.07.017
- Yokota, T., Oritani, K., Mitsui, H., Aoyama, K., Ishikawa, J., Sugahara, H., Matsumura, I., Tsai, S., Tomiyama, Y., Kanakura, Y., & Matsuzawa, Y. (1998). Growth-Supporting Activities of Fibronectin on Hematopoietic Stem/Progenitor Cells In Vitro and In Vivo: Structural Requirement for Fibronectin Activities of CS1 and Cell-Binding Domains. *Blood*, 91, 3263-3272. 2019. PMID: 9558382
- Yokota, T., Kouro, T., Hirose, J., Igarashi, H., Garrett, K.P., Gregory S.C., Sakaguchi N., Owen J., Kincade P.W. (2003). Unique properties of fetal lymphoid progenitors identified according to RAG1 gene expression. *Immunity*, 19, 365-375. doi:10.1016/S1074-7613(03)00231-0

- Yoshioka, S. , Miura, Y. , Yao, H. , Satake, S. , Hayashi, Y. , Tamura, A. , Hishita, T. , Ichinohe, T. , Hirai, H. , Takaor-Kondo, A. and Maekawa, T. (2014). CCAAT/Enhancer-Binding Protein β Expressed by Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Regulates Early B-Cell Lymphopoiesis. *Stem Cells*, 32: 730-740. doi:10.1002/stem.1555
- Wu, Y.L, Ding, Y.P, Tanaka, Y., Shen, L.W., Wei, C.H., Minato, N., Zhang, W. (2014). $\gamma\delta$ T Cells and Their Potential for Immunotherapy. *Int J Biol Sci*; 10,119-135. doi:10.7150/ijbs.7823
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., Harris, S., Wiedemann, L.M., Mishina, Y., Li, L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. (2003). *Nature*, 425,836-41. doi: 10.1038/nature02041
- Zhang, Y., Li, C., Jiang, X., Zhang, S., Wu, Y., Liu, B., Tang, P., Mao, N. (2004). Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34+ cells. *Exp Hematol.*, 32,657-64. doi: 10.1016/j.exphem.2004.04.001
- Zhang Y, Chai Ch, Jiang X, Teoh S and Leong. (2006). Co-culture of umbilical cor blood CD34+ cells with human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.*, 12,2161-2170. doi: 10.1089/ten.2006.12.2161
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., Leenen, P. J., Liu, Y., MacPherson, G., Randolph, G. J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J. M., & Lutz, M. B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116, e74-e80. doi:10.1182/blood-2010-02-258558
- Zuckerman, K.S, Rhodes, R.K, Goodrum, D.D, Patel, V.R., Sparks, B., Wells, J., Wicha, M.S., Mayo, L.A. (1985). Inhibition of collagen deposition in the extracellular matrix prevents the establishment of a stroma supportive of hematopoiesis in long-term murine bone marrow cultures. *J Clin Invest*, 75,970–975. doi:10.1172/JCI111798